

**NUEVOS PÉPTIDOS
PENETRANTES PARA LA
ENTREGA INTRACELULAR DE
ÁCIDOS NUCLEICOS**

*Intracellular delivery of nucleic acids using
a new type of cell penetrating peptides*

IRENE ADÁN BARRIENTOS

CURSO ACADÉMICO 2017-2018



Índice

Resumen y palabras clave	3
Abstract and keywords	4
Introducción	5
Objetivos	15
Materiales y métodos	16
1. Síntesis de los CPPS	17
2. Caracterización estructural de los anfifilos	24
3. Ensayos de transfección y citotoxicidad	26
Resultados y discusión	29
1. Diseño y síntesis de los péptidos	29
2. Caracterización estructural de los anfifilos	32
3. Ensayos de transfección y citotoxicidad	35
Conclusiones	39
Referencias	40
Agradecimientos	44

Resumen

La terapia génica ha cautivado a la comunidad científica debido a su potencial para tratar las enfermedades genéticas: si un gen se expresa en exceso se inactiva, y si se expresa poco o de forma incorrecta se reemplaza por un gen funcional. Asimismo, también se puede emplear para tratar enfermedades tan prevalentes como el cáncer, lo que incrementa su interés. Su fundamento parece muy sencillo, pero la realidad es que el diseño de vehículos transportadores que permitan hacer llegar esta terapia al lugar de acción supone un gran desafío: es necesario superar todas las barreras fisiológicas de forma eficiente, sin causar toxicidad, y preferentemente de forma selectiva sobre el tejido diana.

En este trabajo se presentan nuevos vectores basados en péptidos penetrantes de membrana para la entrega intracelular de plásmidos y RNA interferente. Estos péptidos tienen una carga neta positiva, presentan una estructura anfipática secundaria, y han sido modificados químicamente mediante el acoplamiento de aldehídos de cadena larga a través de un enlace hidrazona. Se realizó su síntesis y caracterización, y se realizaron ensayos de transfección y de citotoxicidad *in vitro*. Además, se analizó la influencia que ejercía la naturaleza del cargo y la posición de los aldehídos del péptido penetrante sobre la eficiencia de transfección.

Palabras clave

Terapia génica; vectores no virales; péptidos penetrantes; entrega; ácidos nucleicos.

Abstract

Gene therapy has attracted the interest of the scientific community, due to its potential to treat genetic diseases: it works by inactivating overexpressed genes or by replacing malfunctioning ones. In addition, this therapy can be used to cure other diseases such as cancer. However, its strong potential is hindered by the delivery problem: designing vehicles that allow the efficient transportation of therapeutic nucleic acids to its target tissue is a considerable challenge, since many physiological barriers must be overcome in an efficient way, and without causing cytotoxicity.

A new type of cell penetrating peptide-based vectors for the intracellular delivery of plasmids and short interfering RNAs (siRNAs) is presented in this work. These vectors have an amphiphilic secondary structure, are positively charged, and are chemically modified by coupling long chain aliphatic aldehydes through a hydrazone bond. They have been synthesized and characterized in the laboratory; and *in vitro* assays have been performed in order to study their transfection efficiency and cytotoxicity. Furthermore, the influence of different factors on transfection efficiency has been studied, such as the position of the aldehyde pendants and the nature of the nucleotide cargo.

Keywords

Gene therapy; cell penetrating peptides; nucleic acids; delivery; non-viral vectors.

Introducción

La terapia génica consiste en la modificación de forma intencionada de la expresión génica en ciertas células con el fin de tratar una enfermedad (1,2), mediante la introducción de material genético (dsDNA, ssDNA, mRNA, siRNA, oligonucleótidos...) (1,3), o bien mediante la entrega intracelular de plataformas de edición génica, como pueden ser sistemas basados en CRISPR-Cas9, Nucleasas de dedos de Zinc (ZFNs), o “transcription activator-like effector nucleases” (TALENs) (4). La terapia génica permite inhibir o eliminar permanentemente la expresión de un gen, inducir la expresión deficitaria de otro (mediante la inserción permanente en el genoma o la expresión episomal), o corregir un gen endógeno mediante técnicas de edición génica (2).

Con respecto a su regulación, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) los clasifica en una categoría especial de medicamentos llamados “productos medicinales de terapia avanzada”. Estos se definen como aquellos medicamentos para uso humano basados en genes, células o tejidos (5), y cuentan con una regulación específica (Regulación (EC) No 1394/2007 y Directiva 2001/83/EC). La EMA define de una forma más tradicional los medicamentos basados en terapia génica, como “aquellos que contienen y usan material genético con un efecto terapéutico, diagnóstico o preventivo de una enfermedad” (5).

La terapia génica será una opción de tratamiento más entre los conocidos como medicamentos biológicos, es decir, los que proceden o se producen a partir de un organismo vivo (6). Estos agentes terapéuticos cobraron enorme relevancia cuando se perfeccionó la tecnología del DNA recombinante, que permitió la preparación de productos biológicos altamente puros y en grandes cantidades (7). Medicamentos como la insulina o los anticuerpos monoclonales supusieron una revolución en el tratamiento de muchas enfermedades (6). El siguiente paso en esta revolución será la terapia génica, que pronto comenzará a tener un papel importante en el tratamiento de enfermedades terminales o invalidantes (8), y asimismo ofrecerá posibilidades terapéuticas a condiciones médicas que actualmente no disponen de tratamiento (2).

En un principio, se pensó que su principal aplicación sería la corrección de defectos genéticos (9). Actualmente, estas enfermedades solo disponen de tratamientos que, aunque mejoran la calidad de vida de los pacientes, no son capaces de erradicar la enfermedad. Muchas de las opciones terapéuticas disponibles hoy en día, como las “moléculas pequeñas” (moléculas de bajo peso molecular con una estructura química definida), los procedimientos quirúrgicos, o los trasplantes no son muy eficaces (4).

Asimismo, ha sido estudiada la posibilidad de emplear la terapia génica en otras enfermedades con alta prevalencia, como el cáncer (10), las enfermedades infecciosas (11), las enfermedades

cardiovasculares (12), las enfermedades neurodegenerativas (13), o el asma (14), con resultados positivos (15). De hecho, en la actualidad la mayoría de las líneas de investigación van dirigidas a este tipo de enfermedades (9).

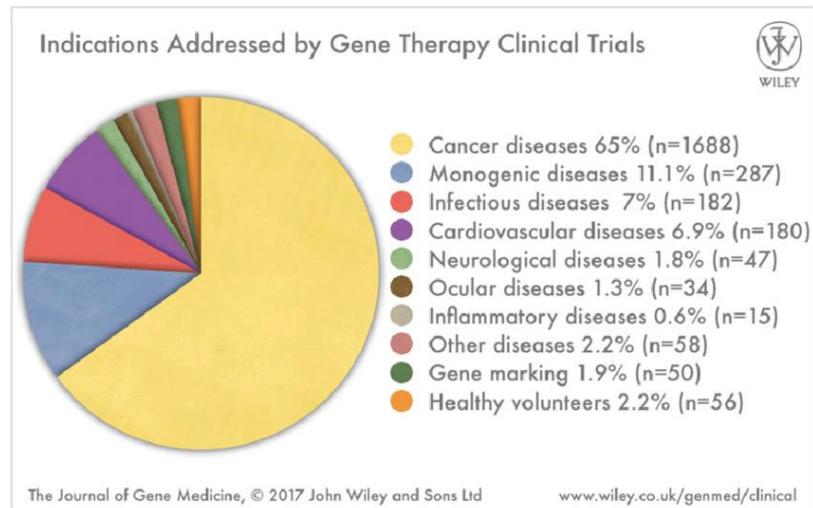


Figura 1: Indicaciones a las que van dirigidas los ensayos clínicos de terapia génica (16).

A pesar de este horizonte esperanzador, apenas existen productos en el mercado basados en terapia génica. El mayor problema a la hora de desarrollar estos medicamentos es el diseño de la tecnología para su entrega en el lugar deseado de una manera segura y eficiente (1,3,4,15,17,18). Antes de llegar a su lugar de acción, el material genético debe atravesar numerosísimas barreras, ya que el cuerpo humano está diseñado para destruir material genético extraño, y para ello es imprescindible crear un vehículo seguro y eficiente a un precio asequible.

Los vehículos para la entrega de material genético pueden ser de tipo viral o no viral. Los primeros son virus modificados genéticamente, en los que se ha sustituido parte de su genoma por el gen de interés. Los virus han evolucionado para introducir y replicar su material genético en las células (3,19,20), y los vectores víricos aprovechan esta característica inherente en ellos: se les despoja de sus propiedades patógenas mediante la supresión de la mayor cantidad de genes víricos posibles (3,9,15) pero se mantienen los necesarios para el empaquetamiento y el transporte del transgén dentro de la cápside viral (3,9).

Por otro lado, más recientemente se han desarrollado vectores no virales, que a su vez se subdividen en dos tipos: los vectores físicos y los químicos. Los físicos debilitan la membrana celular para hacerla más permeable al material genético (3); entre estos se incluyen la inyección hidrodinámica y la electroporación (3,4). Sin embargo, los que presentan un mayor potencial para su uso en clínica (ya que son menos invasivos) son los vectores químicos, donde el material genético es encapsulado en nanotransportadores de diferente composición. Entre ellos destacan diversas

formulaciones de lípidos catiónicos, de polímeros o de péptidos penetrantes de membrana (CPPs) (2,4).

Los medicamentos basados en terapia génica que están comercializados usan vectores víricos, y alrededor del 70% de los que se encuentran en ensayos clínicos también emplean estos vectores (1,19,21). Esto se puede explicar porque los vectores víricos son mucho más eficientes en la entrega de material genético que los no víricos (1–3,15,19), y la tecnología de materiales no ha permitido desarrollar hasta el momento ningún vehículo con una eficiencia de transfección suficiente como para poder ser usada en terapia (3).

Limitaciones de los vectores virales

El principal problema de los vectores víricos es el riesgo de que provoquen inmunogenicidad y shock anafiláctico. Por ello, se deben administrar concomitantemente con varios inmunosupresores (2), lo cual eleva el riesgo de que se produzcan otras enfermedades (infecciones o tumores, entre otras) (2). Otra gran desventaja es que no se pueden readministrar, ya que se desarrollan anticuerpos contra la cápside viral y ya no son efectivos (son neutralizados por el sistema inmune) (20).

Los principales tipos de vectores virales son los lentivirales y retrovirales, que están diseñados para integrarse en el genoma, lo cual puede inducir la oncogénesis (9). En un estudio donde se realizó un tratamiento con vector de origen retrovírico (MLV) para tratar la inmunodeficiencia combinada severa (22), el 25% de los pacientes desarrollaron leucemia (4). Por otro lado, existen vectores víricos que no se integran en el genoma: adenovirus, herpesvirus y los virus adeno asociados (AAV). Estos se expresan de forma episomal, pero aun así sigue estando presente el riesgo de que produzcan toxicidad e inmunogenicidad (20). De hecho, en un ensayo clínico de la universidad de Pensilvania, un paciente tratado con un vector basado en un adenovirus para suplir la deficiencia de ornitina transcarbamilasa murió debido a una respuesta inflamatoria masiva contra el vector (9).

Los vectores víricos poseen asimismo una capacidad limitada de almacenaje de material genético (2,9). Los vectores no virales tienen muchas menos restricciones de tamaño, por lo que podrían suponer una alternativa eficaz a la hora de transfectar material genético de mayor tamaño.

Por último, los vectores virales acarrear grandes costes, debido tanto a sus dificultades en la producción a gran escala (2) como a la peligrosidad de los ensayos clínicos. Esto se traduce en un coste elevadísimo del medicamento (2). Glybera fue retirado del mercado en octubre de 2017 debido a la escasa demanda de terapia (23): el precio por tratamiento era en torno a un millón de dólares (2).

Como se puede apreciar, estos vehículos pueden acarrear graves problemas para el paciente, pero hasta el momento ningún vector no viral posee la eficiencia suficiente como para poder ser comercializado. Sin embargo, la tecnología de materiales ha avanzado mucho en estos últimos años, y

se han dedicado muchos esfuerzos al desarrollo de vectores no víricos más eficientes (1). Los vectores no víricos pueden ser preparados en grandes cantidades a bajo coste, pueden transfectar cargos más grandes, pueden ser almacenados durante más tiempo debido a su estabilidad, y provocan menos inmunogenicidad (3).

Hasta el momento, los vectores no víricos más prometedores han resultado ser los basados en lípidos y polímeros (2). Sin embargo, existen otras estrategias que no han sido tan investigadas, como son los péptidos penetrantes de membrana (Cell Penetrating Peptides), que también han mostrado un gran potencial (21). Estos péptidos podrían emplearse para el desarrollo de vectores no virales, e incluso también en la mejora de los vectores virales (21).

Péptidos penetrantes de membrana (CPPs)

Los péptidos penetrantes son cortos (normalmente no exceden los 30 aminoácidos), y poseen la capacidad de cruzar membranas celulares mientras transportan un cargo, sin causar apenas toxicidad (21,24,25). El mecanismo por el cual lo hacen no se comprende perfectamente, pero se sabe que pueden penetrar de forma activa (mecanismo dependiente de energía) o de forma pasiva (mecanismo independiente de energía) (24,25). En general los diferentes CPPs no poseen secuencias homólogas entre ellos, y cada uno presenta diferentes mecanismos de internalización celular (26).

Existen dos maneras de combinar el CPP con el cargo: de forma covalente y de forma no covalente. Los CPPs unidos de forma covalente con el material genético resultan en una entidad química definida, y por lo tanto es más fácil conseguir su aprobación para su uso en la clínica (21). No obstante, en algunos casos la unión covalente produce una pérdida en la actividad de la molécula. La unión mediante fuerzas no covalentes (interacciones electrostáticas o hidrofóbicas) es mucho más simple (se produce mediante un simple mezclado), y además no produce pérdida de actividad (21).

Mecanismos de internalización

El mecanismo de internalización del CPP depende de su estructura (primaria y secundaria), de la concentración de péptido, del tipo de célula a transfectar y de la naturaleza del cargo (27). Asimismo, diferentes mecanismos de internalización pueden ocurrir en las mismas condiciones (25). Básicamente, los CPPs pueden ser internalizados mediante mecanismos independientes o dependientes de energía (25,27,28).

Entre los mecanismos independientes de energía destaca la penetración directa a través de una desestabilización transitoria de la membrana, sin llegar a causar toxicidad (27,28). Esta forma de internalización ocurre sobre todo a concentraciones relativamente elevadas de péptido (26,28). Existen diferentes modelos acerca de cómo sucede esta translocación (Figura 2)

Para péptidos que transportan cargos, el mecanismo predominante probablemente sea el endocítico (dependiente de energía) (29). En este caso, primeramente el péptido, acompañado o no de cargo, sería endocitado por la célula, y después desestabilizaría el endosoma, permitiendo que tanto este como el cargo accediesen al citosol (27).

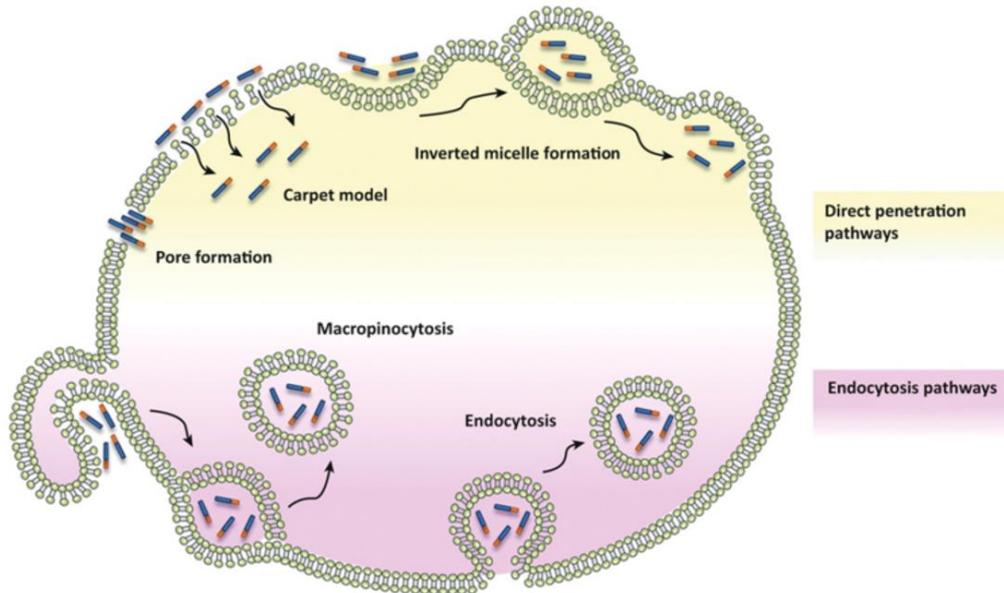


Figura 2: Posibles mecanismos de internalización de los CPPs (25).

Clasificación

Según sus características fisicoquímicas se pueden clasificar en tres categorías: catiónicos, anfipáticos e hidrofóbicos (21,26). Muchos de ellos, aunque no todos, están cargados positivamente y son anfipáticos (24,26).

A continuación se citan brevemente los diferentes tipos de CPPs en base a sus características fisicoquímicas, sobre la que se puede encontrar amplia información en una revisión de F. Milletti (26).

A) Péptidos altamente catiónicos

Los péptidos catiónicos fueron los primeros en ser descubiertos, a partir de una secuencia peptídica de internalización del VIH-1 llamada Tat1 (RKKRRQRRR). Se cree este tipo de CPPs son capaces de interactuar con glucosaminoglicanos, activando la vía endocítica para su internalización (25,26,28); y a altas concentraciones se piensa que también pueden translocar directamente la membrana (26,28). No poseen una estructura tridimensional concreta.

B) Péptidos anfipáticos

Una segunda categoría la conforman los CPPs anfipáticos, que pueden estar cargados positiva o negativamente a pH fisiológico (aunque la mayoría tienen carga positiva) (26). A su vez se subdividen en:

- **Péptidos anfipáticos primarios:** su estructura primaria les confiere un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico.
- **Péptidos anfipáticos secundarios:** su estructura secundaria (hélice α , lámina- β u otras) les confiere una cara hidrofílica y una hidrofóbica cuando se pliega en el espacio (26).

C) Péptidos hidrofóbicos

Son aquellos que contienen una secuencia o un grupo químico hidrofóbico que es esencial para su internalización. Se dividen en:

- **Péptidos hidrofóbicos compuestos por aminoácidos naturales:** Parece que su mecanismo de internalización es la translocación directa.
- **Péptidos hidrofóbicos compuestos por la fusión de una secuencia peptídica a una entidad química:** Esta secuencia aumenta la eficiencia de transfección (26) y también se cree que puede incrementar el tiempo medio de circulación (25). Entre ellos destacan los péptidos “grapados” (con un hidrocarburo u uno o dos residuos del péptido); los péptidos prenilados (a los que se les ha añadido un isoprenoide (26)); y las pepducinas (con un ácido graso acoplado al aminoácido *N*-terminal).
- **Péptidos anfipáticos con aldehídos acoplados a través de un enlace hidrazona:** Este tipo de péptidos fueron diseñados en el grupo del doctor Javier Montenegro, y se estudian en profundidad en este trabajo.

Parece ser que estas secuencias hidrofóbicas incrementan la afinidad de los péptidos por la membrana, y por lo tanto también sus propiedades penetrantes (26).

Un típico específico de CPPs que puede resultar muy útil en el envío de material genético al interior celular son los que contienen Secuencias de Localización Nuclear (NLS), que permiten que el CPP acceda al núcleo a través de los poros nucleares sin necesidad de que la célula esté en división. Ejemplos de NLS pueden encontrarse en proteínas como la nucleoplasmina o en el antígeno T-grande del virus SV40 (26).

Retos a superar en el diseño de vectores no virales

Los vectores no víricos, incluidos los CPPs, han de superar una serie de barreras para poder competir contra los vectores víricos en el diseño de medicamentos basados en terapia génica.

Uno de los factores a tener en cuenta es la degradación del material genético por endonucleasas en los fluidos fisiológicos (1,30). Se estima que la vida media de un plásmido de DNA en circulación es de 10 minutos, por lo que es muy importante que el DNA vaya perfectamente protegido en el nanotransportador (1,3,30). La cápsula vírica o una envoltura lipídica o polimérica

pueden realizar perfectamente esta función (1). CPPs que contengan más de 8 aminoácidos también protegen al material genético de la degradación (21).

En el caso de los CPPs, también es conveniente construir nanotransportadores resistentes a proteasas, para evitar su degradación. Se están diseñando péptidos basados en aminoácidos no naturales (por ejemplo D-aminoácidos), ya que las proteasas apenas tienen afinidad por ellos (31). De hecho se ha demostrado que los CPPs basados en D-aminoácidos poseen mayor estabilidad en suero que sus enantiómeros sintetizados con L-aminoácidos (32).

Otro factor importante es la tendencia a la agregación de las partículas en sangre (1,30). En el caso de envolturas poliméricas o lipídicas, estas suelen estar cargadas positivamente, lo cual permite que se produzca una repulsión electrostática entre ellas (1). Sin embargo, las altas concentraciones de electrolitos y otras moléculas cargadas negativamente (albúmina, glucosaminoglicanos...) pueden interferir con la carga iónica de los nanotransportadores (3,30). Esto los haría más propensos a agregarse, lo cual aumentaría su tamaño, pudiendo ser fagocitados por los macrófagos (1). Una posible solución sería el recubrimiento del nanotransportador con polietilenglicol (30,33), aunque puede que esto reduzca la expresión del transgén (30).

Asimismo, sería ideal que la acción del fármaco se restringiese al tejido diana. Este es uno de los mayores problemas de los CPPs, ya que penetran indistintamente casi cualquier tipo de célula. No obstante, existen dos aproximaciones que permiten solucionar este problema: se pueden introducir promotores específicos de un tejido en el transgén (1), o bien se pueden diseñar sistemas de liberación selectiva. Por ejemplo, en el caso de los CPPs, existen estudios sobre sistemas de liberación selectiva basados en CPPs activables en diferentes condiciones (25,33) o secuencias peptídicas dirigidas hacia un tejido concreto (25).

Una vez que el nanotransportador llega al tejido diana, se debe conseguir un elevado porcentaje de transfección. Este es el principal punto débil de los vectores no virales, pero la tecnología farmacéutica ha avanzado mucho a este respecto, y es posible que pronto se consiga una eficacia capaz de competir con la de los vectores virales (1).

Si el mecanismo de internalización del vector es endocítico, el paso limitante en la internalización celular es el escape endosomal (25). En el caso de los CPPs este es el mecanismo mayoritario, especialmente cuando estos transportan cargas (25,29), por lo que el diseño de péptidos que consigan escapar eficientemente del endosoma es crucial. Para ello se han empleado diferentes técnicas. En primer lugar, se pueden acoplar dominios peptídicos inspirados en secuencias víricas que incrementan el escape endosomal de los CPPs (25). En segundo lugar, el acoplamiento de hidrocarburos de cadena larga también es beneficioso para conseguir este objetivo (34). Finalmente,

existen CPPs cargados negativamente (como el péptido GALA: WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAA) que en el pH ácido del endosoma se protonan y adquieren propiedades endosomolíticas (25).

Otra de las dificultades que es necesario superar (si el cargo es DNA, ya que necesita utilizar la maquinaria de transcripción de la célula) es la de la internalización hacia el núcleo (30). Se barajan principalmente dos posibles mecanismos mediante los que esto ocurre, dependiendo del tipo de vehículo. La primera opción consiste en que el vector pase a través de los poros nucleares; y la segunda en que se asocie con la cromatina durante la mitosis, cuando la membrana nuclear se ha desintegrado (30). El paso del DNA a través de los poros nucleares es mucho más difícil, y se ha visto que la transfección de células que se dividen lentamente o no se dividen es mucho menos eficaz (1). No obstante, existen CPPs con secuencias NLS que podrían dirigir el nanotransportador hacia el núcleo a través de los poros nucleares (21,30,31).

En vectores no virales como lípidos catiónicos o polímeros, se cree que la internalización nuclear se produce principalmente durante la mitosis, ya que los complejos suelen ser demasiado grandes como para pasar a través de los poros. Parece que los polímeros catiónicos también pueden jugar un papel en la internalización al núcleo, ya que se ha observado que su eficiencia es superior en comparación con vectores no víricos que contienen solo lípidos catiónicos (30).

Por último, el vector debe liberar el material genético, aunque no está muy claro cuánto afecta esta disociación a la expresión génica (1). Algunos estudios han relacionado una liberación lenta del material genético por parte del nanotransportador con una eficiencia de expresión reducida (1).

Nuevas líneas de investigación de CPPs

En esta breve introducción se ha plasmado el potencial de los CPPs en la entrega de material genético al interior celular. Sin embargo, estos vectores todavía se encuentran en su fase inicial y será necesario continuar con su optimización antes de poder llevarlos a la clínica. El grupo de investigación del Doctor Javier Montenegro se ha interesado por las posibles aplicaciones de los CPPs en esta área y ha diseñado un nuevo tipo de péptidos a los que se les puede acoplar químicamente grupos aldehído. A los péptidos con los aldehídos acoplados se les denomina “anfifilos”. Su estructura es la siguiente (35):

- ⇒ Están cargados positivamente (debido a las argininas de su estructura) .
- ⇒ En solución adquieren una estructura secundaria hélice α anfipática, con una cara hidrofílica (rica en argininas) y otra hidrofóbica (rica en leucinas) .
- ⇒ Contienen dos lisinas funcionalizadas con hidrazidas. A través de estas, mediante una reacción sencilla de formación de una hidrazona, se pueden acoplar aldehídos de cadena larga, lo cual incrementa las propiedades penetrantes del péptido.

Las lisinas funcionalizadas con hidrazidas se introdujeron en la estructura primaria del péptido para que este se pudiese modificar químicamente de una forma rápida y sencilla. Este sistema permite combinar rápidamente diferentes péptidos y aldehídos para generar una librería de anfifilos, la cual podrá ser testada para la transfección de diferentes cargos. Mediante un cribado masivo se identificarán los vectores más prometedores para la internalización de un cargo concreto, y que podrán ser probados a continuación en animales.

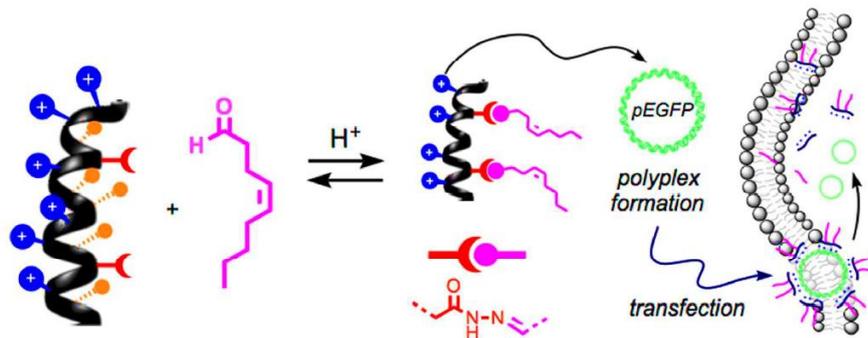


Figura 3: Representación del mecanismo de funcionamiento de este nuevo tipo de CPPs. Código de colores: Azul (argininas), rojo (lisinas modificadas con hidrazidas), naranja (leucinas), rosa (aldehídos). Al péptido se le acoplan aldehídos de cadena larga mediante la formación de enlaces hidrazona. El anfifilo resultante forma complejos con el cargo por interacciones electrostáticas. Estos complejos son capaces de transfectar células (35).

Uno de los CPPs sintetizados por el grupo es el péptido P1, cuya estructura se presenta en la Figura 4. Se ha estudiado para la transfección de este péptido tanto para plásmidos (35) y proteínas con actividad nucleasa (36), mediante su combinación con casi 30 aldehídos diferentes. Sin embargo, la influencia de la disposición en el espacio de los aldehídos hidrofóbicos no se ha estudiado en profundidad.

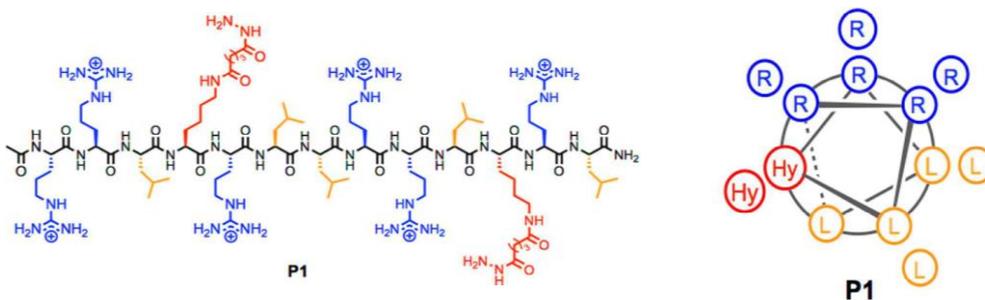


Figura 4: Estructura primaria (izquierda) y helicoidal (derecha) de P1 (vista desde arriba). Como se aprecia en el diagrama de la derecha, este péptido presenta una estructura anfipática en caso de formación de hélice α , con una cara hidrófila rica en argininas (en azul) y otra hidrofoba rica en leucinas (en amarillo). Además, presenta dos lisinas funcionalizadas mediante una hidrazida, a través de la cual se pueden acoplar aldehídos de cadena larga (35).

En el presente trabajo se ha procedido a profundizar un poco más en este aspecto. Para ello se ha sintetizado el péptido P1 y un nuevo péptido de características similares pero con una secuencia primaria diferente que cambia la disposición de las hidrazidas sobre las que se anclan los aldehídos correspondientes para formar el anfifilo. A continuación, se procedió a la caracterización estructural de ambos péptidos mediante dicrósmo circular, y al estudio comparativo de la eficiencia de diferentes cargos (plásmidos y siRNA (Figura 5)) de transfección de los anfifilos conformados por P1 o por el nuevo péptido, combinados con diferentes aldehídos.

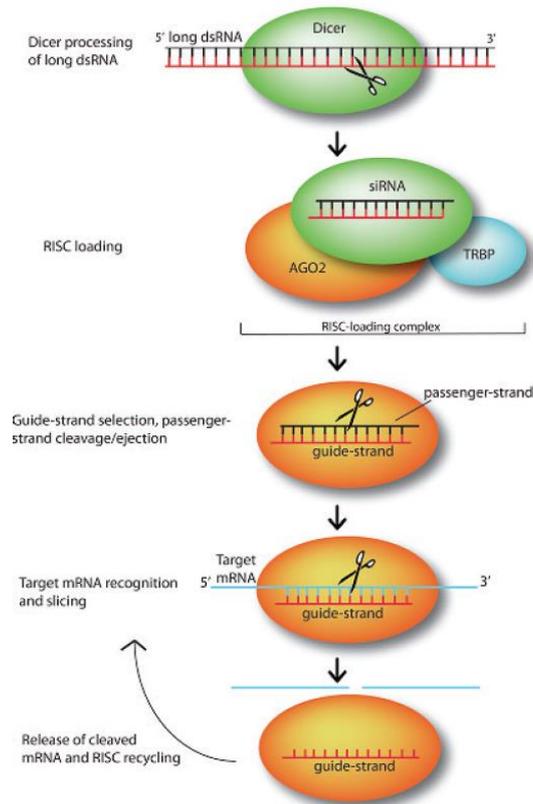


Figura 5: Mecanismo de silenciamiento de la expresión génica mediante RNA interferente (siRNA). El siRNA se forma a partir de un RNA de doble cadena (dsRNA), procedente por ejemplo de una infección vírica (37). La endonucleasa Dicer corta el dsRNA en secuencias de 21-25 nucleótidos, que se unen al complejo RISC (RNA-induced silencing complex), el cual selecciona la hebra guía de RNA. El complejo reconoce el RNA mensajero que sea complementario al RNA guía, y lo corta (37). Este mecanismo endógeno se puede aprovechar en terapia génica para silenciar genes que estén sobreexpresados. Imagen obtenida de: (38)

Objetivos

En este trabajo se desea continuar profundizando en el estudio de estos péptidos penetrantes anfifílicos formados por una estructura peptídica acoplada a aldehídos de cadena larga. Se desea conocer cómo influyen diferentes factores en la eficiencia de transfección de los anfifilos, con el fin de diseñar mejores vehículos que puedan ser usados en un futuro en terapia génica. Para poder alcanzar este objetivo, se propone:

1. Realizar la síntesis del péptido P1 (Figura 4), y el diseño y la síntesis de un nuevo péptido con una estructura diferente que permita realizar estudios comparativos con P1.
2. Caracterizar la estructura secundaria de los anfifilos formados por P1 o por el nuevo péptido mediante la técnica de dicroísmo circular.
3. Realizar ensayos de transfección y citotoxicidad *in vitro* comparando directamente anfifilos de ambos péptidos para alcanzar los siguientes objetivos:
 - a. Investigar la influencia de la disposición de los residuos aminoacídicos y de los aldehídos en la eficiencia de transfección.
 - b. Estudiar la variación en la eficiencia de internalización de cargos de diferente naturaleza: plásmidos y siRNA.
 - c. Realizar un estudio de viabilidad celular (ensayo MTT) para determinar la toxicidad de los anfifilos, con el fin de verificar su aplicabilidad *in vivo*.

Materiales y métodos

Materiales

- Síntesis del péptido: La resina Fmoc Rink Amide (carga: 0,71 mmol/g) y Fmoc-L-Lys(Mtt)-OH se compraron a Iris. Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Leu-OH, el triisopropilsilano y la *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) se compraron a Sigma-Aldrich. El trifluoroetanol y el hexafluoroisopropanol se adquirieron a TCI. La dimetilformamida (grado de síntesis de péptidos) se compró a Scharlau. La hidrazida fue sintetizada en el laboratorio según protocolos establecidos (39). El resto de los reactivos se compraron a Sigma-Aldrich, TCI o Fisher. Todos los disolventes utilizados son de grado HPLC.
- Obtención de los anfifilos: Los aldehídos se compraron o se sintetizaron en el laboratorio a partir del alcohol correspondiente por oxidación con clorocromato de piridinio (40).
- Transfecciones: Lipofectamine 2000 se adquirió a Life Technologies. El medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) se compró a Gibco. El suero bovino fetal y la mezcla de penicilina-streptomina-glutamina usada para suplementar el medio celular se compró a Fisher. El reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio) se compró a Alfa Aesar

Equipos

- El análisis por HPLC acoplado a espectrometría de masas se hizo en un equipo Agilent Technologies 1260 Infinity II, equipado con una 6120 Quadrupole LC-MS, en una columna Agilent SB-C18.
- La purificación semipreparativa en fase reversa se hizo en un equipo Jasco LC 4000 equipado con detector UV-visible por red de diodos. Se usó una columna Penomenex Luna C18(2)100A.
- La señal de dicroísmo circular se midió con un espectropolarímetro Jasco J-1100 CD acoplado a un sistema de control de temperatura.
- Para leer los resultados de los ensayos de transfección de siRNA y del ensayo de viabilidad se usó un lector de placas Tecan Infinite F2000pro.
- Para los ensayos de citometría se empleó un citómetro Guava EasyCyte™ (Millipore).

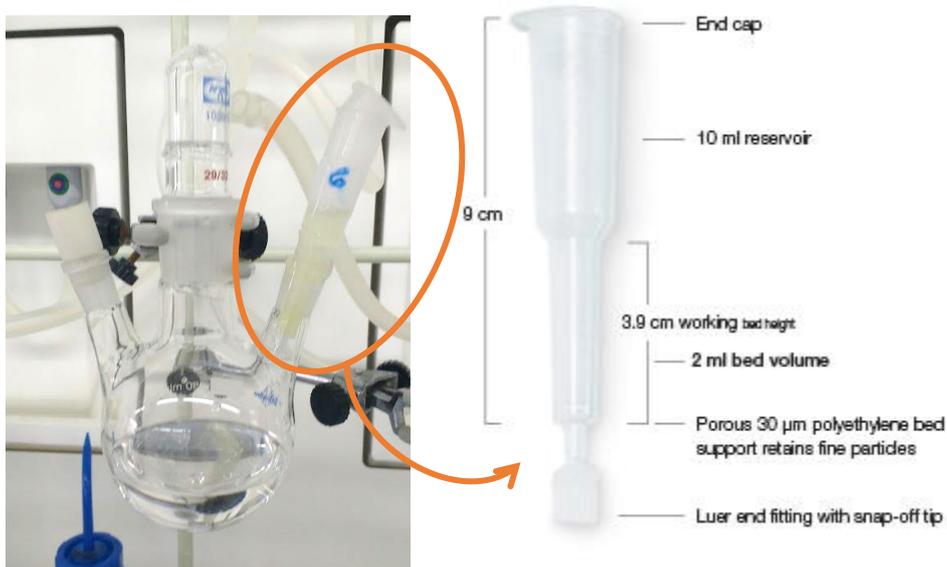


Figura 7: Montaje usado para la SPPS. La resina se encuentra en el reactor de fase sólida, que está situado en la boca derecha del matraz. En la boca superior del matraz se coloca un adaptador con oliva. A través de este se conecta un tubo por el que se hace burbujear nitrógeno mientras la reacción está teniendo lugar, y se hace vacío cuando la reacción ha terminado para eliminar el reactivo y los disolventes. En el matraz se van recogiendo los residuos. A la derecha se ve una imagen ampliada del reactor de fase sólida (42).

La SPPS se basa en ciclos de desprotección y acoplamiento, como se esquematiza en la Figura 8. La dirección de síntesis es desde el extremo C-terminal hacia el N-terminal.

1. **Desprotección de los grupos amino:** El grupo protector Fmoc se elimina mediante la adición de base (20% piperidina en *N,N*-dimetilformamida (DMF)), (Figura 9).
2. **Acoplamiento:** Una vez que se ha expuesto el grupo amino, se procede al acoplamiento del siguiente aminoácido. Esta reacción se ve muy favorecida por la adición de un agente de acoplamiento como el HATU o el HBTU (Figura 10) y un medio básico proporcionado por la *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA).

Se continúa este ciclo hasta que han sido acoplados todos los aminoácidos de la secuencia lineal.

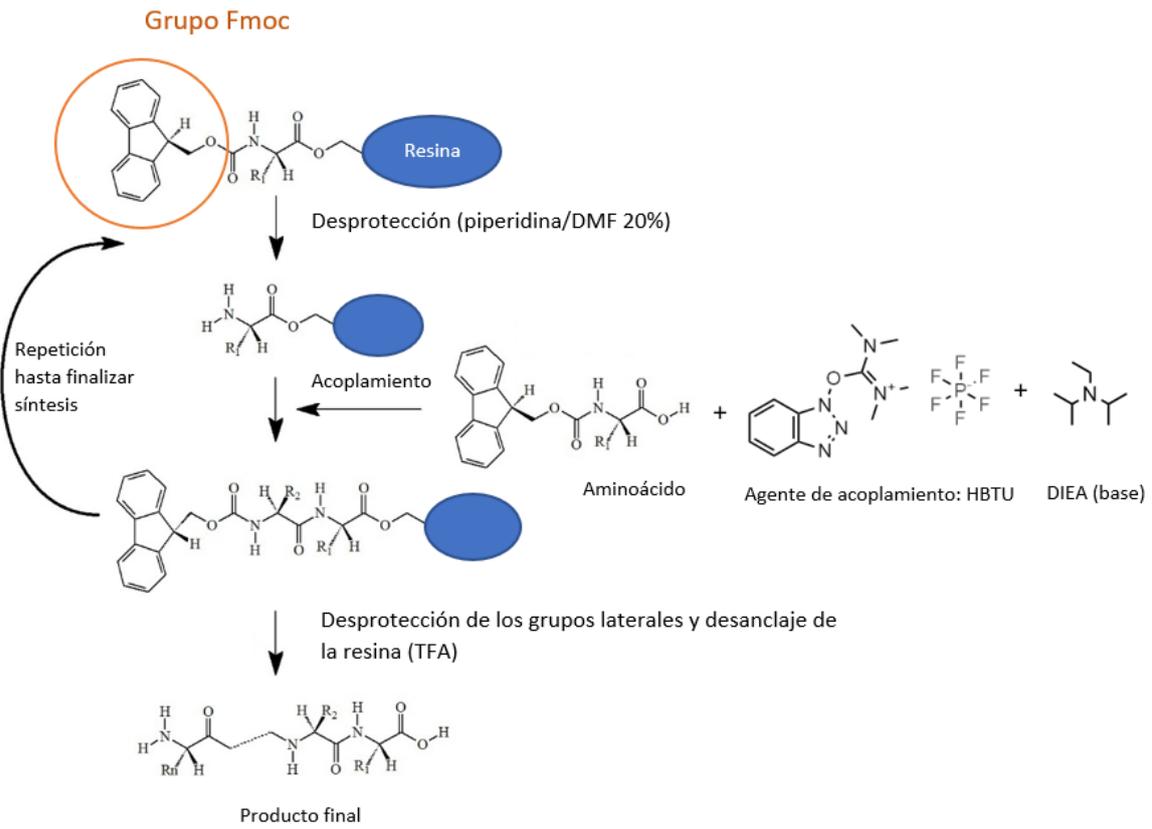


Figura 8: Esquema de la síntesis de péptidos en fase sólida, basado en ciclos de desprotección y acoplamiento. Elaboración propia.

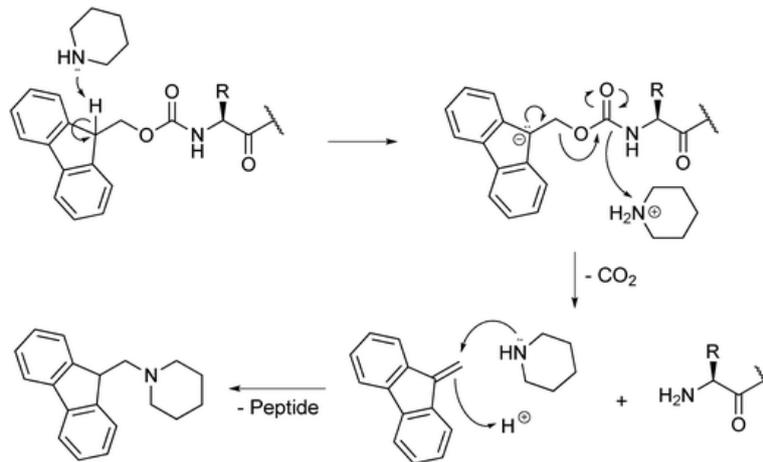


Figura 9: Mecanismo de la reacción de desprotección del grupo amino en α mediante la adición de piperidina/DMF 20%. Fuente: (43).

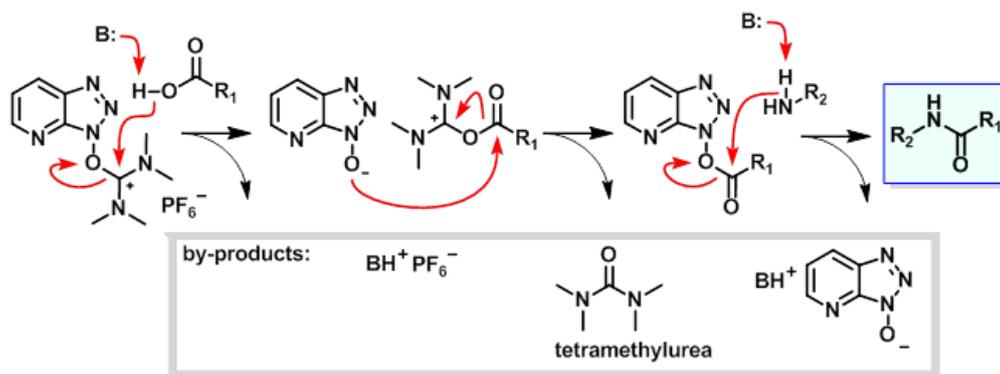


Figura 10: Mecanismo de acoplamiento de un nuevo aminoácido a través de la activación mediante un agente de acoplamiento (HATU) (44).

Aminoácido	Estructura	Grupo protector del amino en α .	Grupo protector de la cadena lateral	Eliminación del grupo protector de la cadena lateral
Lisina	Fmoc-L-Lys(Mtt)-OH	Fmoc ¹ (eliminación en medio básico)	Mtt ² : Protección del grupo amino de la cadena lateral	Medio ácido débil
Arginina	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH		Pbf ³ : protección de la guanidina	Medio ácido fuerte
Leucina	Fmoc-L-Leu-OH		Ninguno	-

Tabla 1: Características de los aminoácidos empleados en la síntesis de los péptidos.

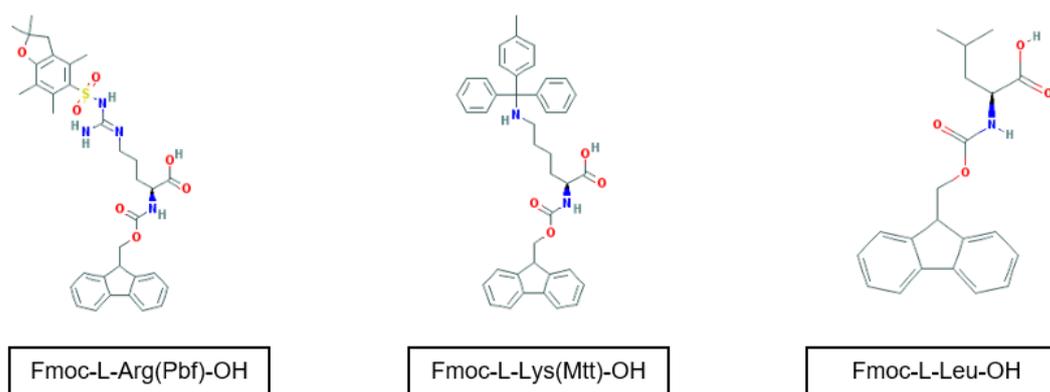


Figura 11: Estructura de los aminoácidos empleados en la SPPS (45).

¹ Fmoc = 9-fluorenilmetoxicarbonilo

² Mtt = 4-metiltrilito

³ Pbf = 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo

Como se puede ver, cada grupo protector es eliminado en diferentes condiciones. Esta característica es muy útil, ya que permite desproteger selectivamente diferentes grupos funcionales.

El procedimiento experimental llevado a cabo fue el siguiente:

1. Se pesó la resina en un reactor de fase sólida (70mg).
2. Esta se hinchó en DMF (2mL) burbujando con una corriente de N₂ (15min).
3. Se desprotegeron los grupos amino de la resina mediante la adición de piperidina/DMF (20%, 2mL, 15min).
4. Se filtró y se lavó la resina con DMF (3 veces, 2mL, 3min).
5. Se añadió una disolución (mezclada previamente) de 4 equivalentes de Fmoc- α -aminoácido () junto con 4 equivalentes de HBTU (agente de acoplamiento) y 6 eq de DIEA: *N,N*-etildiisopropilamina (2mL, 25min)
6. Se filtró y se lavó de nuevo.
7. Se verificó el acoplamiento mediante el test TNBS (descrito en el apartado siguiente).
8. Se repitieron los pasos 3-6 hasta finalización de la síntesis.
9. Se acetiló el aminoácido final haciéndolo reaccionar con exceso de anhídrido acético + 2,6-lutidina (premezclados), 45min.

1.2 Verificación de los acoplamientos

1.2.1 Test TNBS

Se comprobó que cada acoplamiento fue satisfactorio mediante la adición de ácido picrilsulfónico y una base (DIEA) a una pequeña parte de resina en un vial Eppendorf. Si hubiese grupos amino libres (acoplamiento no satisfactorio), aparecería un color rojo (46,47). (Figura 12)

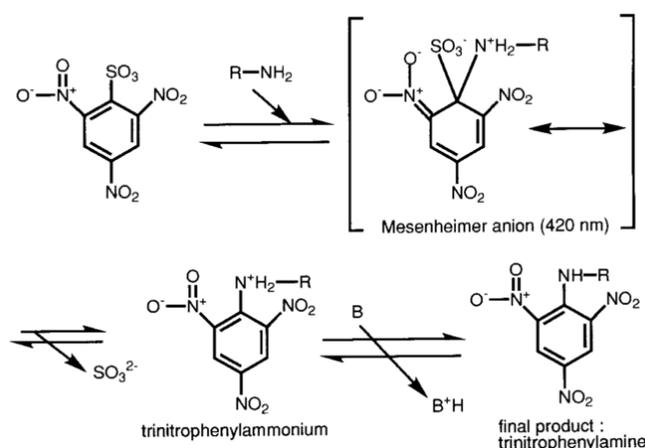


Figura 12: Mecanismo de formación del producto anaranjado (trinitrofenilamina) en el test TNBS, en caso de acoplamiento no satisfactorio (46).

1.2.2 HPLC-MS

Cada cuatro aminoácidos se verificó que la síntesis estuviese siendo realizada correctamente mediante la determinación de la masa molecular del producto principal con un HPLC acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC-MS), del péptido liberado de una pequeña porción de resina. Se hizo cromatografía de elución en gradiente: 5:95 H₂O(0,1%TFA):CH₃CN(0,1%TFA), 5:95 → 95:5 (10min).

1.3 Acoplamiento de las hidrazidas al grupo amino de las lisinas

Esta reacción suele dar rendimientos muy bajos y la reacción no es siempre satisfactoria, por lo que se dividió la resina en 2 partes y solo se realizó el acoplamiento de las hidrazidas a una de ellas, aproximadamente 35 mg de resina original. Se procedió de la siguiente manera:

1. **Desprotección selectiva de los grupos laterales amino de las lisinas:** Se realizan 3 ciclos de desprotección de 2h con agitación en el reactor de fase sólida. En cada ciclo se emplean 2mL de un medio ligeramente ácido compuesto por: diclorometano (1,2mL), hexafluoroisopropanol (0,4mL), trifluoroetanol (0,2mL), triisopropilsilano (0,1mL). Se lavó la resina con diclorometano previamente al primer ciclo y entre ciclo y ciclo.
2. **Acoplamiento:** Tras volver a colocar el reactor en un montaje como en el de la Figura 7 y lavar con DMF, se añadieron de forma secuencial: 2,5 eq de hidrazida (Ácido 5-hidrazinil-5-oxopentanoico) protegida con el grupo protector *Boc*⁴ (disuelta en DMF), 2,5eq de HATU (en DMF) y 10 eq de DIEA (gota a gota). Se dejó reaccionar 45min.

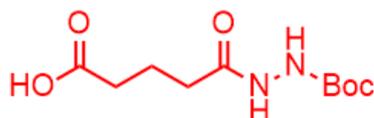


Figura 13: Estructura química del ácido 5-hidrazinil-5-oxopentanoico (hidrazida protegida con el grupo *Boc*).

Se procedió a la desprotección de los grupos funcionales y a la separación del péptido de la resina mediante la adición de una solución fuertemente ácida con ácido trifluoroacético (TFA) (900μL TFA, 50μL diclorometano, 25μL triisopropilsilano, 25μL H₂O), en agitación durante 2h. La solución de péptido en TFA se concentró por evaporación de parte del TFA mediante burbujeo con N₂. Se hizo precipitar el péptido en éter mediante la adición gota a gota de la solución con el péptido. Se centrifugó y se separó el precipitado por decantación.

⁴ *tert*-butoxicarbonilo

1.4 Purificación del CPP mediante HPLC semipreparativa y liofilización.

El precipitado se redisolvió previamente en aproximadamente 1 mL de H₂O y 0,5mL de acetonitrilo. Se purificó el péptido en un equipo semipreparativo mediante cromatografía de elución en gradiente: H₂O (0.1% TFA):CH₃CN (0.1% TFA), 95:5 → 25:75, en 35 minutos a un flujo de 3mL/min. Se realizó el seguimiento de la purificación a la longitud de onda de 222 nm. $R_t=21,8$ min. Se liofilizaron las fracciones recogidas, obteniéndose un polvo blanco.

Lamentablemente, no se obtuvo cantidad de producto suficiente como para poder realizar un análisis estructural mediante resonancia magnética nuclear. Sin embargo, se comprobó la pureza del producto mediante la realización de un HPLC-MS (5:95 H₂O(0,1%TFA):CH₃CN(0,1%TFA), 5:95 → 95:5, 10min), reflejado en la sección de Resultados (Figuras 16 y 17).

1.5 Obtención de los anfifilos

Para obtener el anfifilo (formado por el péptido unido covalentemente al aldehído a través de un enlace hidrazona) se realizó una reacción en las condiciones siguientes:

	Equivalentes	μmol	Concentración	Concentración de la solución stock	mL usados de la disolución stock
Péptido	1	0,01	1,25mM	5mM	2 μL
Aldehído	10 (5 eq por hidrazida)	0,1	12,5mM	50mM	2 μL

Tabla 2: Condiciones de la reacción de preparación del anfifilo

El medio de disolución es 5% de ácido acético en DMSO. Se dejó reaccionar con agitación durante 1h 30min a 60°C. La concentración final de los reactivos se preparó a partir de disoluciones stock. El volumen final de reacción fue de 8 μL.

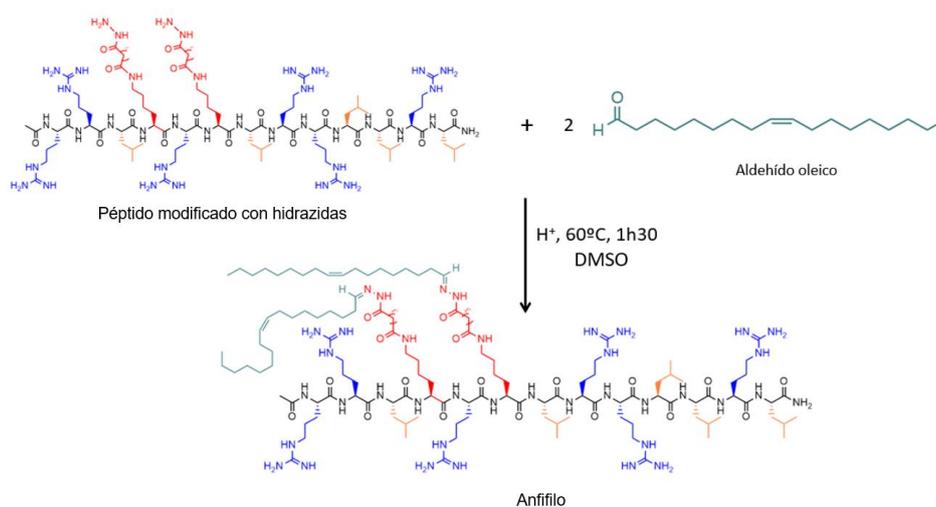


Figura 14: Esquema de obtención del anfifilo K4K6-oleico

Los anfifilos obtenidos tras la reacción se encuentran a una concentración final de 1,25 mM.

2. Caracterización estructural de los anfifilos mediante dicroísmo circular

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que se puede emplear en el análisis de la conformación estructural de moléculas biológicas en disolución (péptidos, proteínas o DNA, entre otras) (48). Aunque no proporciona una información estructural tan profunda como la Resonancia Magnética Nuclear o la cristalografía de rayos X, tiene la gran ventaja de que permite realizar medidas en buffers fisiológicos. Asimismo, permite monitorizar fácilmente los cambios producidos en la conformación estructural de moléculas biológicas cuando se somete a diferentes condiciones (cambios en el pH o a la temperatura, por ejemplo) (48).

2.1 Fundamento de la técnica

El fundamento físico de esta técnica radica en que la luz linealmente polarizada está formada por dos componentes polarizados circularmente, que tienen la misma magnitud pero que rotan en sentidos diferentes (49). El dicroísmo circular mide la diferencia entre la absorción de la luz polarizada en un sentido y en otro (50). Si un grupo funcional (cromóforo) presente en el compuesto absorbe por igual ambos componentes, el plano de luz polarizada no se desvía. Sin embargo, si absorbe mejor uno que otro, el plano se desviará hacia la izquierda o hacia la derecha, lo que se denomina luz elípticamente polarizada (49). De forma simple, podría decirse que el dicroísmo circular es similar a la propiedad de rotación óptica que poseen las moléculas quirales, pero en vez de medir la dispersión (refracción) de la luz polarizada como se hace en la rotación óptica, se mide un espectro de absorción de luz polarizada (51).

La absorción en longitudes de onda del UV lejano (180-260nm) permite establecer conclusiones acerca de la estructura secundaria de péptidos, mientras que la absorción en el UV cercano (250-320nm) permite estudiar la estructura terciaria de los polipéptidos más grandes (50). Esto se debe a que el enlace peptídico absorbe mayormente en el espectro del UV lejano y se aprovecha para determinar la estructura secundaria del péptido, mientras que las cadenas laterales de los aminoácidos de triptófano, tirosina, fenilalanina y cistina absorben en el UV cercano (50).

2.2 Análisis de la estructura secundaria de los péptidos

Las estructuras peptídicas secundarias más características (como la hélice α o la lámina β) han sido ampliamente caracterizadas mediante esta técnica (50), y su patrón de absorción está bien

definido. El espectro obtenido por dicroísmo circular de un péptido que tenga una conformación de hélice α , hoja β o random coil del 100% coincidiría con el espectro de la Figura 15.

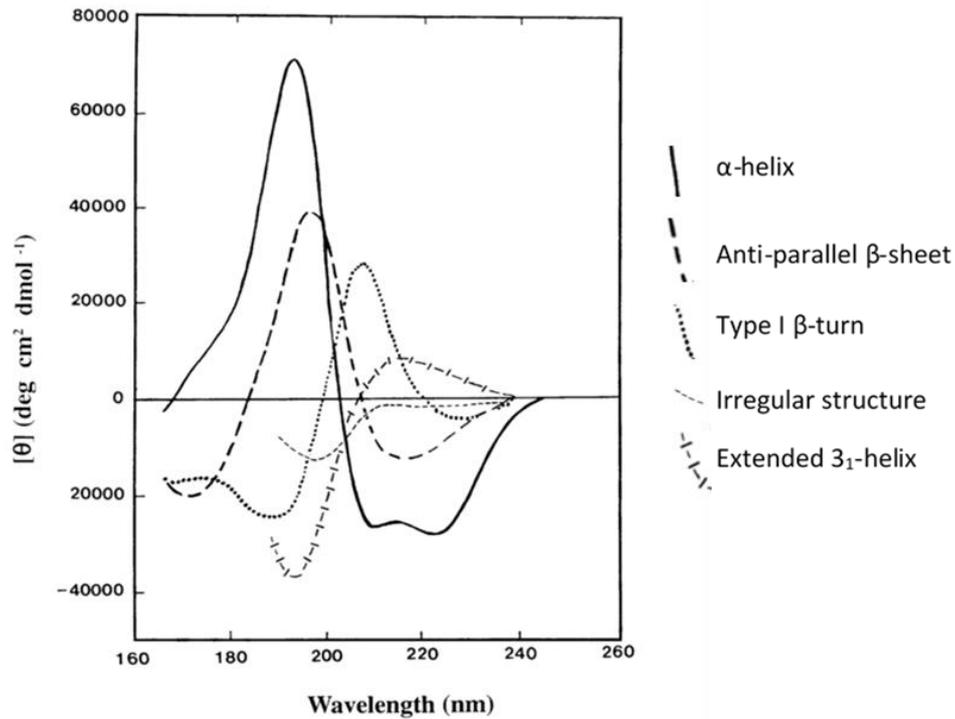


Figura 15: Espectro del UV lejano según la estructura secundaria de un péptido (49).

2.3 Estandarización de los resultados

Para poder dilucidar la estructura secundaria a partir del espectro de dicroísmo circular es necesario presentar los resultados de forma estandarizada, independientemente de la longitud del péptido y de la concentración de la solución. Para ello, los resultados se expresan en elipticidad molar media por residuo.

$$[\theta]MRt = \frac{0,1 \times [\theta]}{C \times l \times N}$$

Ecuación 1: Cálculo de la elipticidad molar media (35).

[θ]MRt = Elipticidad molar media (deg.cm².dmol⁻¹)

[θ]= Señal (mdeg)

C= concentración de péptido (mol/L)

l = longitud de la cubeta (cm)

N= número de residuos del péptido

2.4 Porcentaje de helicidad

Existen diversas fórmulas que permiten calcular el porcentaje de helicidad de un péptido concreto. La que se usó en este estudio fue la siguiente:

$$\% \text{ hélice } \alpha = \frac{[\theta]_{222} - 2340}{30300} \times 100$$

$[\theta]_{222}$ = Elipticidad molar media por residuo a 222 nm (deg.cm².dmol⁻¹)

Ecuación 2: Fórmula para el cálculo del porcentaje de helicidad del anfifilo (35).

2.5 Procedimiento experimental

La determinación de la estructura secundaria del péptido se realizó en 600µL de disolución de 150µM de anfifilo en HKR (HEPES-Krebs-Ringer Buffer)⁵, una disolución tampón que simula el pH y la concentración de electrolitos fisiológica. Se midió la absorción entre las longitudes de onda de 190 y 300 nm. El barrido se realizó a las temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, y 60 °C, para averiguar si el péptido perdía su estructura secundaria conforme aumentaba la temperatura.

El anfifilo se preparó mediante la reacción descrita en el apartado 1.5 de *Materiales y Métodos*. Se usó acetonitrilo como disolvente en lugar de DMSO, ya que este último absorbe en la misma región del espectro que la estructura peptídica e interferiría con la señal.

La medición se realizó en una cubeta de dicróismo circular de longitud 0,2 cm, en un espectropolarímetro Jasco 1100, a una velocidad de 200 nm/min. Los datos obtenidos aparecen reflejados en la sección de *Resultados*.

3. Ensayos de transfección y citotoxicidad

En todos los casos se prepararon los anfifilos justo antes de realizar la transfección mediante el método descrito en el apartado 1.5, obteniendo 8 µL de una disolución 1,25 mM de cada anfifilo. Los anfifilos ensayados fueron P1-olealdehído, K4K6-olealdehído, P1-dodecanal y K4K6-dodecanal. Estas se diluyeron hasta 200 µL con DMEM para obtener unas disoluciones stock de cada anfifilo de 50µM, a partir de las cuales se prepararon las disoluciones para formación de los complejos con siRNA y transfección. Como control positivo se empleó Lipofectamine 2000, diluida según las instrucciones del fabricante. Todo se realizó por triplicado.

3.1 Transfección del plásmido pEGFP

Se realizó en células HeLa en una placa de 96 pocillos. Las células se sembraron el día anterior a una concentración de 50000 células/mL (100µL/pocillo), en medio DMEM suplementado con 10% de

⁵ 5 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 2'05 mM MgCl₂, 1'8 mM CaCl₂, pH 7'4.
HEPES = Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperaziniletanosulfónico.

suero fetal bobino (FBS) y 1% de la mezcla penicilina-estreptomicina-glutamina. Se incubaron a 37°C (5% CO₂ y 95% de humedad) en un incubador INCO 108 (Memmert).

Las transfecciones se hicieron a diferentes concentraciones finales de anfifilo (10, 5, 1 y 0,5µM), preparadas por dilución seriada a partir de las disoluciones stock de 50µM. Como control negativo se usaron células solas y también células incubadas con plásmido en ausencia de anfifilos. Como control positivo se empleó Lipofectamine 2000.

Los complejos de transfección se obtuvieron por mezclado e incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos de las disoluciones de péptido y de plásmido, a concentraciones de 25, 12'5, 2,5 y 1,25µM de anfifilo y 5ng/mL de plásmido.

A continuación, se añadieron 20 µL de cada una de las disoluciones a las células HeLa en los diferentes pocillos de la placa de 96, a las que se les había añadido previamente 30 µL de DMEM (un total de 50µL por pocillo). De este modo se obtuvieron las concentraciones finales de 10, 5, 1 y 0'5µM de anfifilo. Se incubaron los complejos con las células durante 3h. A continuación se retiró este medio y se reemplazó por DMEM suplementado con FBS y antibióticos. Las células se incubaron 72h más hasta el análisis.

El porcentaje de células transfectadas se analizó mediante citometría de flujo, usando una longitud de onda de excitación de 488nm y de detección de 512 nm. Las células se consideraron positivas cuando la señal fue más alta que el control negativo. Los datos se procesaron usando el software InCyte.

Previamente, las células habían sido tripsinizadas con 100 µL de tripsina-EDTA (10min, 37°C), y posteriormente se había neutralizado la tripsina con 100 µL de PBS con 5% de FBS y 5mM EDTA.

3.2 Transfección de siRNA contra GFP

Se realizó en células HeLa que expresaban de forma estable GFP, en una placa de 96. Las células se sembraron el día anterior a una concentración de 50000 células/mL (100µL/pocillo), en medio DMEM suplementado con 10% FBS y 1% de la mezcla penicilina-estreptomicina-glutamina.

La concentración final de siRNA utilizada fue de 30nM, y las concentraciones finales de anfifilo testadas fueron de 2, 4 y 10 µM. Se midió la disminución de fluorescencia con respecto al control de siMOCK, que se preparó a la misma concentración que siRNA. El mecanismo de funcionamiento del siRNA se explica en la Figura 5.

Se prepararon los poliplejos por incubación a temperatura ambiente de la solución con las concentraciones finales de péptido y siRNA durante 20 minutos, y posteriormente se incubaron con las células durante 3h (50 µL por pocillo). Se aspiró el medio y se reemplazó con DMEM suplementado. Se cuantificó la disminución de fluorescencia 72h después. Para leer la disminución de fluorescencia

se reemplazó el medio por PBS (100µL por pocillo). La disminución de fluorescencia se midió con el lector de placas a una longitud de onda de excitación de 485 nm y se leyó a 535 nm.

3.3 Ensayos de viabilidad celular (ensayo MTT).

Tras medir los resultados de la transfección de siRNA se realizó un ensayo de citotoxicidad. Se preparó una disolución de MTT de 0,5mg/mL en DMEM a partir de una solución stock de MTT en PBS de una concentración de 5 mg/mL. Se añadieron 100 µL por pocillo, y se incubó durante 3 h 30 min. El formazán formado quedó depositado en el fondo, por lo que se aspiró cuidadosamente el medio y se disolvió el formazán en 100 µL de DMSO. La intensidad del color se midió por absorbancia con el lector de placas a una longitud de onda de 570nm.

Resultados y discusión

1. Diseño y síntesis de los péptidos

1.1 *Diseño de un nuevo péptido a partir de la estructura de P1*

Con el objetivo de comparar la influencia de la disposición tridimensional de los aldehídos de cadena larga acoplados al péptido se sintetizaron dos péptidos con una estructura secundaria similar pero cambiando esta disposición.

1.1.1 Estructura de P1

Se partió del péptido P1. Este se había diseñado sabiendo que la estructura de hélice α contiene 3'6 residuos por vuelta (52). Teniendo esto en cuenta, la secuencia de aminoácidos se dispuso de manera que las argininas (cargadas positivamente) y las leucinas (neutras, hidrófobas) se dispusiesen en caras opuestas (dando lugar a una estructura anfipática secundaria de hélice α). Además, se colocaron las lisinas (moduladas con hidrazidas para permitir el acoplamiento de aldehídos) en la intersección de estas dos caras, alineadas verticalmente y separadas por dos vueltas (37). La secuencia aminoacídica final fue RRLKRLLRRLKRL.

1.1.2 Estructura del nuevo péptido penetrante (K4K6)

Se cree que la posición de las colas incrementa la eficiencia de transfección porque fomenta la interacción de los con la membrana lipídica. Por ello, se hipotetizó que si las colas no se situaban en la misma cara, la interacción con la membrana disminuiría (puesto que si uno de los aldehídos se encuentra de cara a la membrana, el otro estaría en la cara opuesta, hacia el medio extracelular), y por lo tanto la eficiencia de transfección también.

Para confirmar esta hipótesis, se diseñó una estructura que permitiese acoplar los aldehídos en caras opuestas, pero que mantuviese la conformación de hélice α . Se le puso el nombre de K4K6 ya que las argininas ocupan estas posiciones en la secuencia aminoacídica: RRLKRLLRRLKRL.

P1													K4K6												
<i>Secuencia aminoacídica</i>																									
R	R	L	K	R	L	L	R	R	L	K	R	L	R	R	L	K	R	K	L	R	R	L	L	R	L
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Estructura lineal</i>																									
<p style="text-align: center;">P1</p>																									
<i>Posible estructura helicoidal (vista desde arriba)</i>																									
<p style="text-align: center;">P1</p>													<p style="text-align: center;">K4K6</p>												
<i>Posible estructura tridimensional de la secuencia aminoacídica</i>																									
<i>Posible estructura tridimensional de los anfifilos (de aldehído oleico)</i>																									

Tabla 3: Representación comparativa de las estructuras de P1, K4K6 y sus anfifilos. Código de colores: argininas (rojo), leucinas (amarillo), lisinas e hidrazidas (rojo). En las estructuras tridimensionales se observa cómo las argininas y las leucinas se disponen en caras opuestas. Además, las lisinas (con los aldehídos acoplados o no a través del enlace hidrazona) se sitúan en la misma cara en P1 y en caras opuestas en K4K6.

1.2 Síntesis de ambos péptidos.

Se obtuvieron por síntesis peptídica en fase sólida (SPPS), y posterior acoplamiento de las hidrazidas. El proceso viene explicado detalladamente en *Materiales y métodos*. El rendimiento de la reacción fue del 8,77% para **P1** y del 2,32% para **K4K6**.

1.2.1 Análisis de la pureza del producto obtenido.

Dado que no se obtuvo una cantidad suficiente de producto no se pudo realizar una resonancia magnética nuclear. Sin embargo se pudo analizar su pureza mediante la realización de RP-HPLC-masas. Los resultados aparecen reflejados en las figuras siguientes.

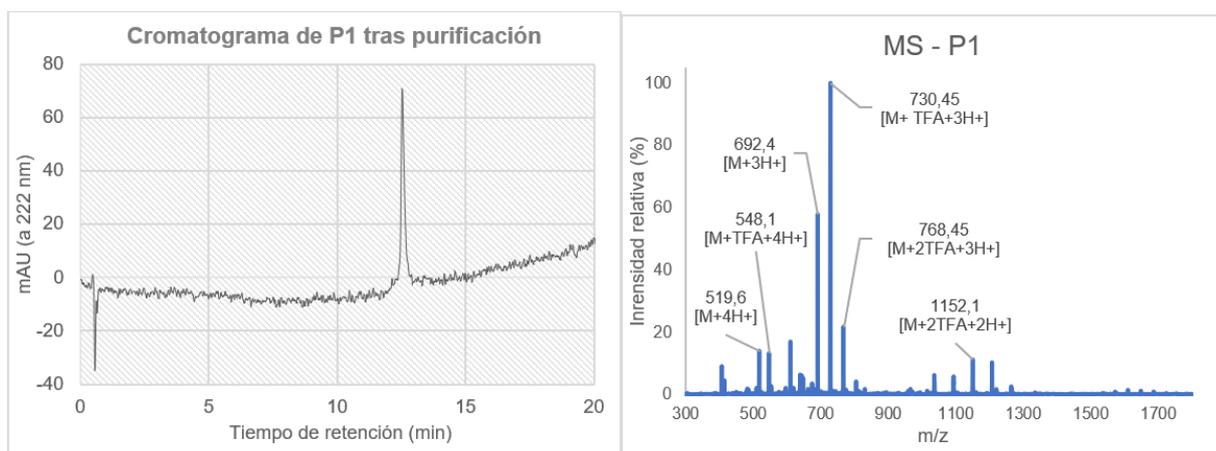


Figura 16: A la izquierda se representa el cromatograma del péptido P1 puro. $R_t=12,52$ min, método de 21 minutos de duración. A la derecha aparece la espectrometría de masas. Las señales se relacionaron con diferentes especies protonadas de P1, muchas con trifluoroacetato como contraión. Masa molecular de P1: 2074,61Da.

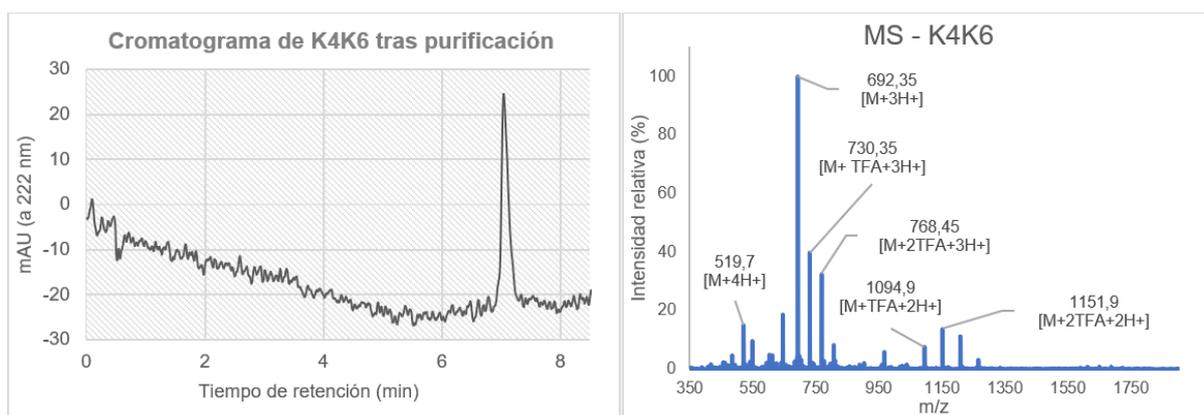


Figura 17: A la izquierda se representa el cromatograma del péptido K4K6 puro. $R_t=7,043$ min, método de 12 minutos de duración. A la derecha aparece la espectrometría de masas. Las señales se relacionaron con diferentes especies protonadas de K4K6, muchas con trifluoroacetato como contraión. Masa molecular de K4K6: 2074,61Da.

2. Caracterización estructural de los anfifilos

Como ya se mencionó previamente, la secuencia de ambos péptidos se diseñó de manera que en disolución pudiesen plegarse formando una hélice α . Esto se comprobó mediante la realización de un estudio de dicroísmo circular. El fundamento de esta técnica se explica en *Materiales y métodos*.

Se analizaron dos de los anfifilos que posteriormente se usarían en las transfecciones *in vitro*: K4K6-olealdehído y P1-olealdehído. En futuros trabajos será necesario estudiar a fondo todos los anfifilos que tengan mayor eficiencia de transfección.

Este primer análisis proporcionó una idea de cómo influye la disposición de los aldehídos en el porcentaje de helicidad del péptido. Además, las mediciones se hicieron a 6 temperaturas diferentes (de 10 a 60°C en intervalos de 10°C), para comprobar si el anfifilo perdía su estructura de hélice α al incrementarse la temperatura. También se calculó el porcentaje de helicidad, mediante la fórmula que aparece reflejada en la sección de *Materiales y métodos*. Los resultados aparecen reflejados en las figuras inferiores.

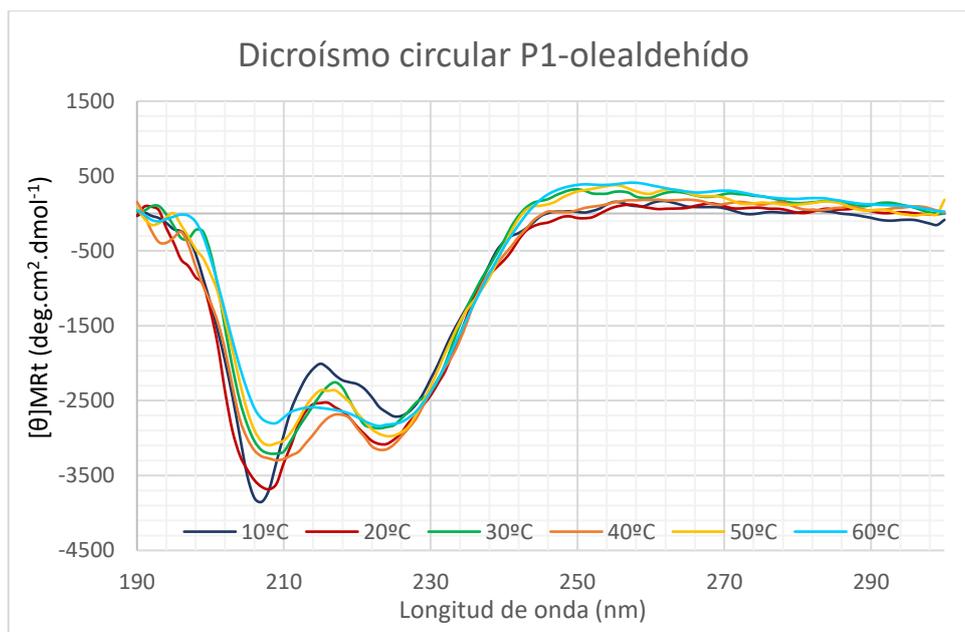


Figura 18: Espectro de dicroísmo circular del anfifilo P1-olealdehído. A todas las temperaturas en las que se realizaron las mediciones presenta los mínimos característicos de una hélice α (208 y 222 nm).

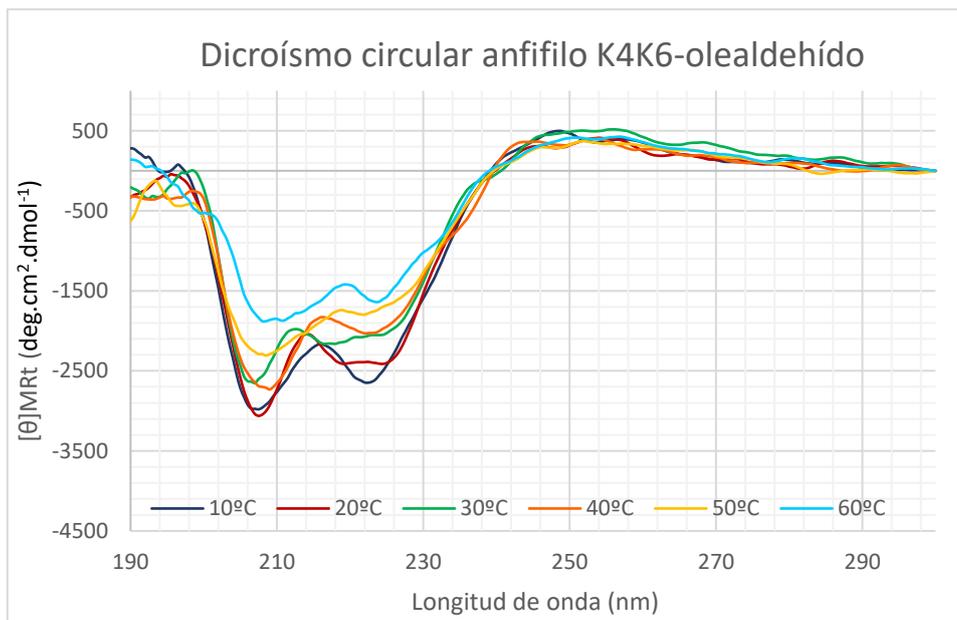


Figura 19: Espectro de dicroísmo circular del anfifilo K4K6-olealdehído. Los mínimos a 208 y 222 nm indican una estructura de hélice α . La helicidad va disminuyendo conforme aumenta la temperatura.

	P1-oleico	K4K6-oleico
10°C	15,80%	16,40%
20°C	17,70%	15,60%
30°C	17,10%	14,50%
40°C	18,00%	14,40%
50°C	17,20%	13,60%
60°C	17,00%	13,00%

Tabla 4: Porcentaje de helicidad obtenida para los anfifilos a diferentes temperaturas (calculada a partir de $[\theta]_{222}$).

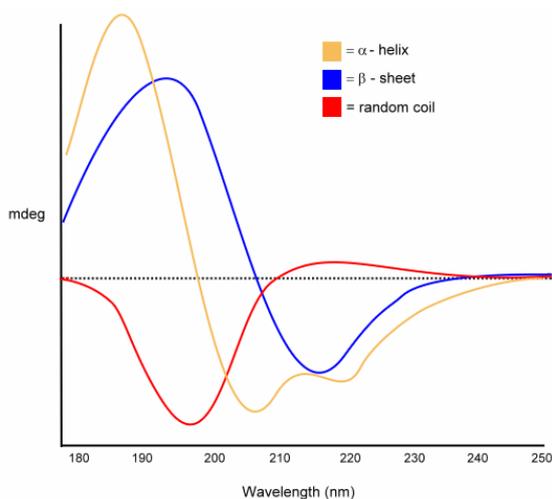


Figura 20: Espectro de dicroísmo circular teórico de péptidos con diferentes conformaciones (48).

Tras analizar los resultados, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

Primeramente, el espectro permite afirmar que la estructura de ambos anfifilos es de hélice α , ya que coinciden con el espectro característico de esta estructura secundaria (Figura 20), con dos mínimos negativos a 208 y 222 nm (48,50).

El porcentaje de helicidad es aceptable, ya que los péptidos cortos no suelen formar hélices muy estables en disoluciones acuosas (48): la formación de puentes de hidrógeno entre el agua y el péptido puede desfavorecer la formación de la estructura helicoidal. En disolventes orgánicos como el trifluoroetanol se incrementa la helicidad de la mayoría de los péptidos (48), por lo que parece razonable suponer que la interacción de los anfifilos con la membrana celular proporcionaría un medio hidrofóbico más apropiado para la estabilización de la hélice α (aumentando su helicidad). Será necesario realizar más estudios al respecto.

Curiosamente, se observa que el anfifilo P1-oleico presenta una helicidad relativamente estable a lo largo del rango de temperaturas, mientras que en el anfifilo K4K6-oleico el porcentaje de helicidad disminuye gradualmente al aumentar la temperatura. Es posible que la disposición de los aldehídos de cadena larga hacia el mismo lado contribuya a estabilizar la estructura tridimensional del péptido.

Por último, en la Figura 21 se presenta un gráfico comparativo entre las helicidad de P1-olealdehído con respecto a K4K6-olealdehído a 40°C (la temperatura medida que está más próxima a la fisiológica). Ambos conservan el espectro característico de la hélice α a esa temperatura, pero el porcentaje de helicidad es superior en P1-olealdehído que en K4K6-olealdehído (18,0% vs 14,4%).

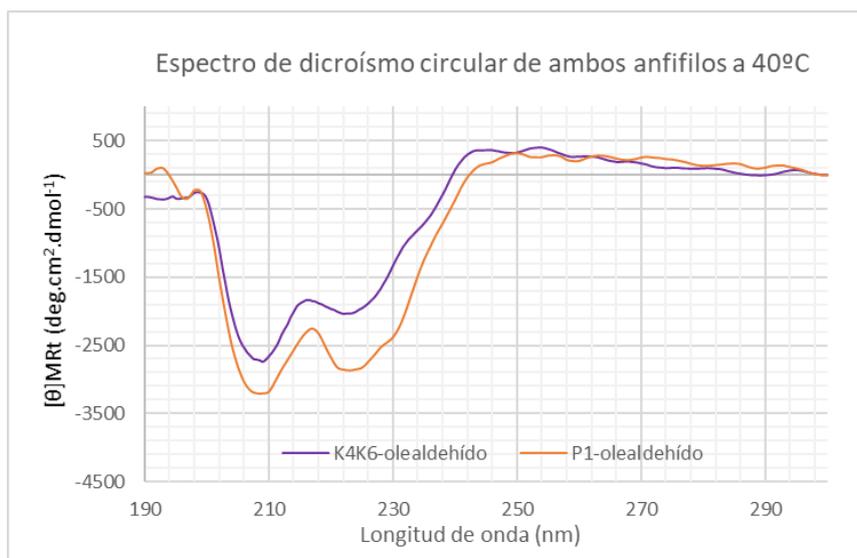


Figura 21: Comparación de los espectros de dicroísmo circular de los anfifilos P1-olealdehído y K4K6-olealdehído a 40°C.

3. Ensayos de transfección y citotoxicidad

3.1 Transfección de pEGFP.

Se procedió a la transfección comparativa de pEGFP (plásmido que codifica el gen de la proteína verde fluorescente) mediante los siguientes anfifilos: P1-olealdehído, P1-dodecanal, K4K6-olealdehído y K4K6-dodecanal a diferentes concentraciones (10, 5, 1 y 0,5 μM). Se escogieron estos aldehídos porque habían dado buenos resultados en estudios anteriores (35). También se ensayaron las mismas concentraciones de P1 y K4K6 sin aldehídos acoplados. Se obtuvieron eficiencias de transfección inusualmente bajas, tanto para el control positivo (Lipofectamina) como para los anfifilos. Aun así, se comprobó que los anfifilos con P1 resultaron ser mucho más eficientes que los anfifilos que contenían K4K6, confirmándose la hipótesis de que la disposición de los aldehídos sí influye en la eficiencia de la transfección. Los más eficientes fueron P1-olealdehído y P1-dodecanal a una concentración final de 5 μM.

Por otro lado, dado que hay estudios que indican que la adición de ciertos compuestos alifáticos de cadena larga (grupos estearilo, isoprenoides, péptidos grapados) a algunos péptidos incrementan la interacción con la membrana (26) y además favorecen el escape endosomal (34,53), la nula eficiencia de transfección de los péptidos sin aldehído acoplado podría explicarse por un fallo en estos procesos.

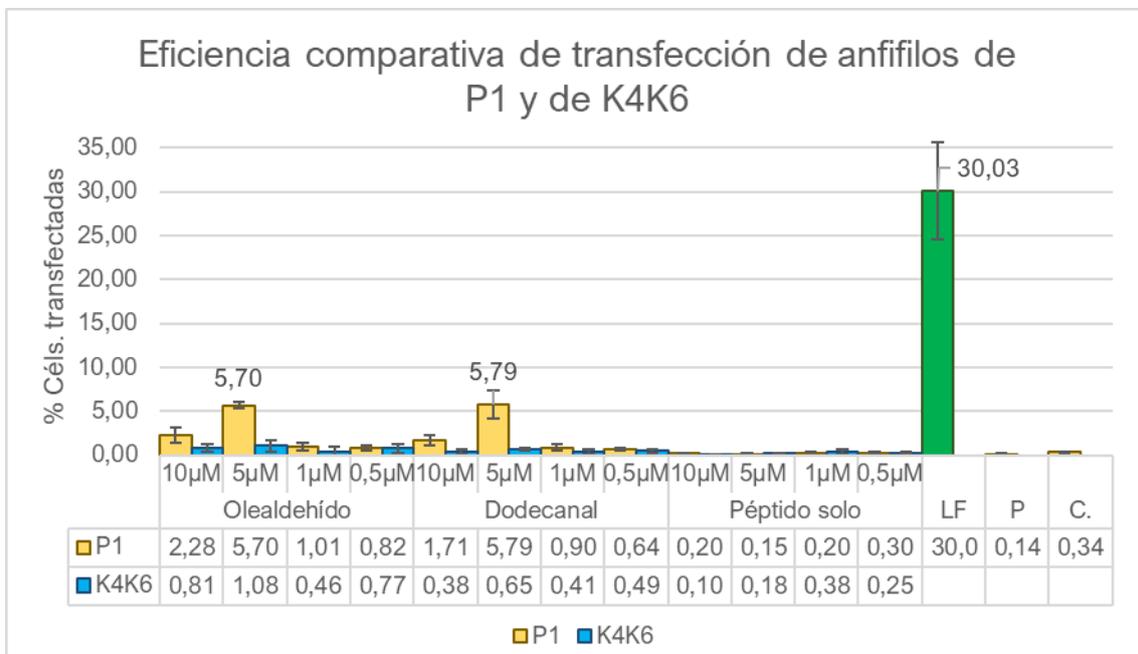


Figura 22: Resultados del ensayo de transfección de pEGFP en células HeLa, empleando como vectores los anfifilos P1-olealdehído, P1-dodecanal, K4K6-olealdehído y K4K6-dodecanal a diferentes concentraciones. Como control positivo se empleó lipofectamina (LF), y como controles negativos células solas (C.) y células con plásmido (P.). Resultados expresados en porcentaje de células transfectadas, medidas con un citómetro de flujo.

3.2 Transfección de siRNA contra GFP.

A continuación se realizó una transfección de siRNA comparando anfifilos formados por P1 o por K4K6 en la línea celular HeLaGFP (células HeLa que expresan de forma estable GFP). El mecanismo de silenciamiento génico del siRNA se explica en la Figura 5.

La transfección se realizó con los anfifilos P1-dodecanal, P1-olealdehído, K4K6-dodecanal y K4K6-olealdehído, a concentraciones finales de 2, 4, y 10 μ M. Se comparó la disminución de fluorescencia de cada anfifilo a cada concentración cuando se transfecta siRNA, con la transfección de siMOCK en las mismas condiciones. siMOCK es el control negativo: un siRNA cuya secuencia no es complementaria a ningún mRNA de la célula. También se hizo un control positivo realizando la transfección de siRNA y siMOCK con Lipofectamina, y un control de células solas. La disminución de la fluorescencia se midió con un lector de placas.

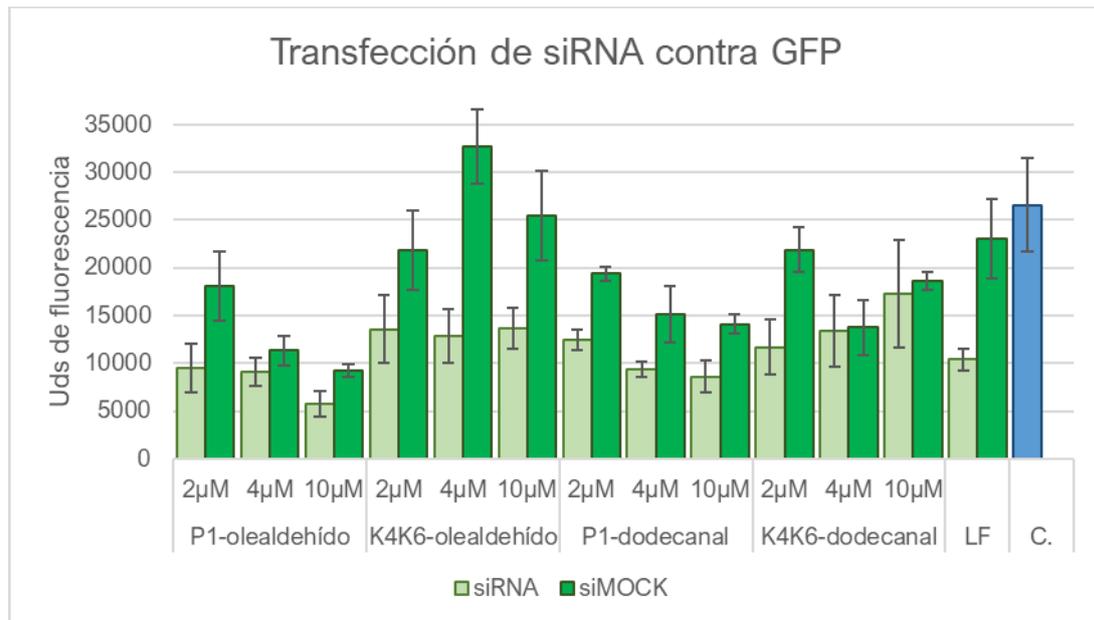


Figura 23: Resultados de la transfección de siRNA contra GFP en células HeLa-GFP. Se compara la disminución de la fluorescencia por la transfección del siRNA (verde claro) con respecto al control de siMOCK (verde oscuro). Se ensayaron los anfifilos P1-olealdehído, K4K6-olealdehído, P1-dodecanal y K4K6-dodecanal, a diferentes concentraciones. Como control positivo se empleó Lipofectamina (LF), y como control negativo células solas (C).

			Péptido del anfifilo	
			P1	K4K6
Aldehído del anfifilo	Olealdehído	2μM	48%	38%
		4μM	20%	61%
		10μM	30%	46%
	Dodecanal	2μM	36%	46%
		4μM	38%	2%
		10μM	39%	7%
Lipofectamina			55%	

Tabla 5: Disminución (en porcentaje) de la fluorescencia de siRNA con respecto al control de siMOCK de los diferentes anfifilos a las diferentes concentraciones.

Como aparece reflejado en la Tabla 5, el anfifilo que consiguió una mayor eficiencia en la reducción de fluorescencia (incluso mayor que la de Lipofectamina) fue el anfifilo K4K6-olealdehído 4μM, seguido de P1-olealdehído a 2μM.

En general, la eficiencia de transfección de siRNA fue claramente superior a la del plásmido, por lo que se puede deducir que la naturaleza del cargo también influye en la eficiencia de transfección. Generalmente resulta más difícil transfectar plásmidos mediante CPPs, ya que no son capaces de condensar el DNA eficientemente para formar complejos de transfección (54). Además, los plásmidos deben alcanzar el núcleo para expresarse (30), mientras que el siRNA solo tiene que llegar al citoplasma (37).

3.3 Ensayos de viabilidad: citotoxicidad de los anfifilos

Para que un vector sea aplicable a la clínica, además de eficiente debe ser poco citotóxico. El ensayo MTT permitió comparar la toxicidad de los anfifilos y de la Lipofectamina.

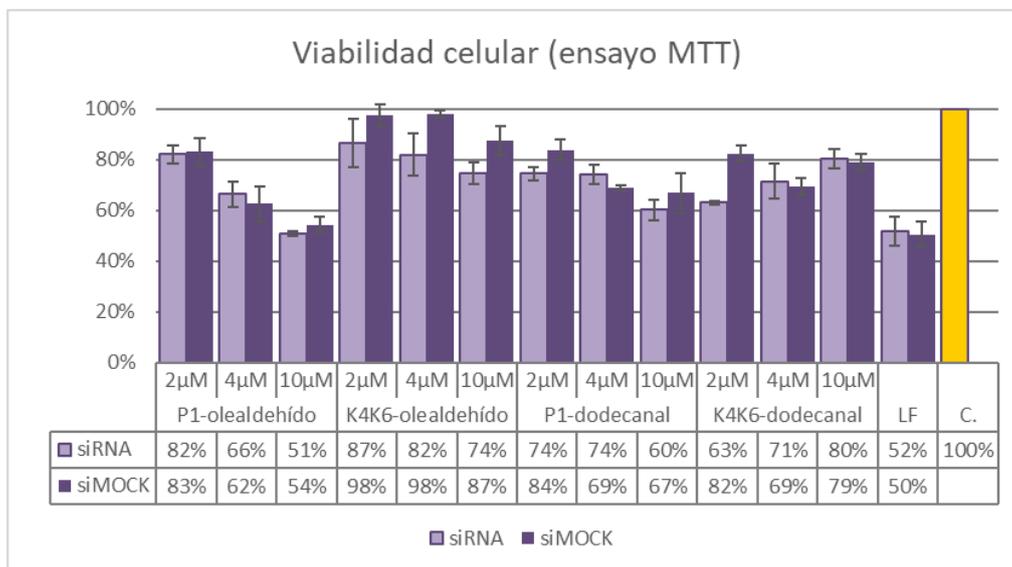


Figura 24: Resultados del ensayo de citotoxicidad, expresados en porcentaje de células vivas con respecto al control (células no transfectadas (en amarillo)).

Los resultados que aparecen reflejados en la figura superior indican que el compuesto más citotóxico fue la Lipofectamina (LF), que provocó la muerte del 50% de las células. Por otro lado, la toxicidad del anfifilo P1-olealdehído fue dependiente de la concentración, ya que fue aumentando gradualmente con esta (llegando a causar la muerte del 50% de las células a 10 μM). El anfifilo P1-dodecanal también pareció presentar ligeramente más toxicidad a mayores concentraciones. El anfifilo menos citotóxico con diferencia fue K4K6-olealdehído.

Si se analizan conjuntamente las Figuras 22 y 23, se deduce que el mejor anfifilo para la transfección de siRNA *in vitro* fue K4K6-olealdehído, puesto que fue el que presentó mayor eficiencia de transfección y menor citotoxicidad (incluso a 10 μM en torno al 74% (siRNA) - 87% (siMOCK) de las células fueron viables). El anfifilo P1-olealdehído también fue poco citotóxico y muy eficaz a bajas concentraciones (2 μM), pero a concentraciones mayores fue menos eficiente y bastante letal. Por último, aunque el anfifilo K4K6-dodecanal no fue demasiado tóxico, tampoco fue muy eficiente. La Lipofectamina también obtuvo una alta eficiencia de transfección (aunque menor que el anfifilo K4K6-olealdehído a 4 μM). Sin embargo, debido a su elevada toxicidad, no sería apropiada para su aplicación *in vivo*.

Conclusiones

1. Se ha diseñado o un nuevo péptido penetrante llamado K4K6 a partir de la estructura del péptido P1. Los anfifilos formados a partir del nuevo péptido presentan los aldehídos dispuestos en caras opuestas de la estructura helicoidal del péptido.
Se han sintetizado ambos péptidos (P1 y K4K6), y a partir de ellos se han preparado varios anfifilos, constituyendo una primera pequeña librería: P1-olealdehído, P1-dodecanal, K4K6-olealdehído y K4K6-dodecanal.
2. Se ha caracterizado la estructura secundaria de dos de los anfifilos (P1-olealdehído y K4K6-olealdehído). Se ha llegado a la conclusión de que la disposición de los aldehídos afecta a la estabilidad de la estructura de hélice α . Cuando los aldehídos se disponen en la misma cara del anfifilo, la helicidad es mayor y es más estable a los cambios de temperatura.
3. Se han realizado ensayos *in vitro* que han permitido estudiar la eficiencia comparativa de transfección y la citotoxicidad de los anfifilos y de la Lipofectamina.
 - a. Se ha comprobado que la disposición de los aldehídos en el espacio influye en la eficiencia de transfección. Los anfifilos con las colas situadas en la misma cara (formados a partir de P1) resultaron ser más eficientes en la transfección del plásmido, mientras que K4K6-olealdehído (que presenta las colas en caras opuestas) fue el más eficiente en la transfección de siRNA.
 - b. Se ha concluido que la naturaleza del cargo también influye en la eficiencia de transfección, siendo mucho más satisfactoria la internalización de siRNA que la de plásmido.
 - c. Mediante el ensayo MTT se ha comprobado que los anfifilos derivados de los péptidos penetrantes presentan baja citotoxicidad y menor que la de la Lipofectamina.

Referencias

- (1) Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, & Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2014;15(8):541-555.
- (2) Foldvari M, Chen DW, Nafissi N, Calderon D, Narsineni L, & Rafiee A. Non-viral gene therapy: Gains and challenges of non-invasive administration methods. *Journal of Controlled Release*. 2016;240:165-190.
- (3) Ibraheem D, Elaissari A, & Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;459(1-2):70-83.
- (4) Yin H, Kauffman KJ, & Anderson DG. Delivery technologies for genome editing. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017;16(6):387-399.
- (5) European Medicines Agency. European Medicines Agency - Advanced therapy medicinal products. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000294.jsp&mid=WC0b01ac05800241e0 [consultada 24/04/2018]
- (6) Lybecker KM. The Biologics Revolution in the Production of Drugs. Fraser Institute. 2016. Disponible en: <https://www.fraserinstitute.org/sites/default/files/biologics-revolution-in-the-production-of-drugs.pdf> [consultada 24/04/2018]
- (7) WHO | Biotherapeutic products. WHO. World Health Organization; 2016. Disponible en: <http://www.who.int/biologicals/biotherapeutics/biotherapeutic-products/en/> [consultada 23/04/2018]
- (8) Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature*. 2015;526(7573):351-360.
- (9) Thomas CE, Ehrhardt A, & Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2003;4(5):346-358.
- (10) Lee J-M, Yoon T-J, & Cho Y-S. Recent Developments in Nanoparticle-Based siRNA Delivery for Cancer Therapy. *BioMed Research International*. 2013;2013:1-10.
- (11) Falkenhagen A, Singh J, Asad S, Leontyev D, Read S, Zúñiga-Pflücker JC, et al. Control of HIV Infection In Vivo Using Gene Therapy with a Secreted Entry Inhibitor. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2017;9:132-144.
- (12) Rincon MY, VandenDriessche T, & Chuah MK. Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovascular Research*. 2015;108(1):4-20.
- (13) Piguet F, Alves S, & Cartier N. Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future. *Human Gene Therapy*. 2017;28(11):988-1003.

- (14) Xie Y, & Merkel OM. Pulmonary Delivery of siRNA via Polymeric Vectors as Therapies of Asthma. *Archiv der Pharmazie*. 2015;348(10):681-688.
- (15) Wang D, & Gao G. State of the art human gene therapy: Part I. Gene delivery technologies. *Discovery Medicine*. 2014;18(97):67-77.
- (16) Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, & Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *The Journal of Gene Medicine*. 2018;20(5):e3015.
- (17) Juliano R, Alam MR, Dixit V, & Kang H. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*. 2008;36(12):4158-4171.
- (18) Whitehead KA, Langer R, & Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009;8(2):129-138.
- (19) Green JJ, Langer R, & Anderson DG. A Combinatorial Polymer Library Approach Yields Insight into Nonviral Gene Delivery. *Accounts of Chemical Research*. 2008;41(6):749-759.
- (20) Hardee C, Arévalo-Soliz L, Hornstein B, & Zechiedrich L. Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy. *Genes*. 2017;8(2):65.
- (21) Alhakamy NA, Nigatu AS, Berkland CJ, & Ramsey JD. Noncovalently associated cell-penetrating peptides for gene delivery applications. *Therapeutic Delivery*. 2013;4(6):741-757.
- (22) Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000;288(5466):669-672.
- (23) EMA. Public statement on Glybera: Expiry of the marketing authorisation in the European Union. European Medicines Agency. 2017. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2017/10/WC500237864.pdf [consultada 25/04/2018]
- (24) Bechara C, & Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Letters*. 2013;587(12):1693-1702.
- (25) Kalafatovic D, & Giralt E. Cell-Penetrating Peptides: Design Strategies beyond Primary Structure and Amphipathicity. *Molecules*. 2017;22(11):1929.
- (26) Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discovery Today*. 2012;17(15-16):850-860.
- (27) Kauffman WB, Fuselier T, He J, & Wimley WC. Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides. *Trends in Biochemical Sciences*. 2015;40(12):749-764.
- (28) Madani F, Lindberg S, Langel Ü, Futaki S, & Gräslund A. Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *Journal of Biophysics*. 2011;2011:1-10.

- (29) Martin I, Teixido M, & Giralt E. Intracellular Fate of Peptide-Mediated Delivered Cargoes. *Current Pharmaceutical Design*. 2013;19(16):2924-2942.
- (30) Wiethoff CM, & Middaugh CR. Barriers to Nonviral Gene Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003;92(2):203-217.
- (31) Bolhassani A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2011;1816(2):232-246.
- (32) Sánchez-Navarro M, Teixidó M, & Giralt E. Jumping Hurdles: Peptides Able To Overcome Biological Barriers. *Accounts of Chemical Research*. 2017;50(8):1847-1854.
- (33) Yoo J, Sanoj Rejinold N, Lee D, Jon S, & Kim Y. Protease-activatable cell-penetrating peptide possessing ROS-triggered phase transition for enhanced cancer therapy. *Journal of Controlled Release*. 2017;264:89-101.
- (34) Mäe M, EL Andaloussi S, Lundin P, Oskolkov N, Johansson HJ, Guterstam P, et al. A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *Journal of Controlled Release*. 2009;134(3):221-227.
- (35) Louzao I, García-Fandiño R, & Montenegro J. Hydrazone-modulated peptides for efficient gene transfection. *Journal of Materials Chemistry B*. 2017;5(23):4426-4434.
- (36) Lostalé-Seijo I, Louzao I, Juanes M, & Montenegro J. Peptide/Cas9 nanostructures for ribonucleoprotein cell membrane transport and gene edition. *Chemical Science*. 2017;8(12):7923-7931.
- (37) Jinek M, & Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*. 2009;457(7228):405-412.
- (38) Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, et al. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *International journal of biomedical science*. 2017;13(2):48-57.
- (39) Chen Q, Sowa DA, Cai J, & Gabathuler R. Synthesis of Doxorubicin Conjugates Through Hydrazone Bonds to Melanotransferrin P97. *Synthetic Communications*. 2003;33(14):2377-2390.
- (40) Gehin C, Montenegro J, Bang E-K, Cajaraville A, Takayama S, Hirose H, et al. Dynamic Amphiphile Libraries To Screen for the “Fragrant” Delivery of siRNA into HeLa Cells and Human Primary Fibroblasts. *Journal of the American Chemical Society*. 2013;135(25):9295-9298.
- (41) Merrifield RB. Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1985;24(10):799-810.

- (42) Poly-Prep® Chromatography Columns. Bio-Rad. Disponible en: <http://www.bio-rad.com/es-es/product/poly-prep-chromatography-columns?ID=4f7ce1ea-7c12-44e6-b435-049b88180b09> [consultada 10/06/2018]
- (43) Pedersen SL, Tofteng AP, Malik L, & Jensen KJ. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chem Soc Rev.* 2012;41(5):1826-1844.
- (44) Amine to Amide Mechanism - HATU. Disponible en: http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HATU_Mech.htm [consultada 07/06/2018]
- (45) The PubChem Project. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> [consultada 06/06/2018]
- (46) Cayot P, & Tainturier G. The Quantification of Protein Amino Groups by the Trinitrobenzenesulfonic Acid Method: A Reexamination. *Analytical Biochemistry.* 1997;249(2):184-200.
- (47) Uptima. TNBSA reagent for amine detection. Disponible en: <http://www.interchim.fr/ft/B/BC3361.pdf> [consultada 15/06/2018]
- (48) Doderio VI, Quirolo ZB, & Sequeira MA. Biomolecular studies by circular dichroism. *Frontiers in Bioscience.* 2011;16:61-73.
- (49) Kelly SM, Jess TJ, & Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2005;1751(2):119-139.
- (50) Bakshi K, Liyanage MR, Volkin DB, & Middaugh CR. Circular Dichroism of Peptides. En: Nixon AE, (ed.) *Therapeutic Peptides Methods and Protocols.* (Methods and protocols), vol 1088. Totowa, NJ: Humana Press; 2014. p. 247-253.
- (51) Schellman JA. Circular dichroism and optical rotation. *Chemical Reviews.* 1975;75(3):323-331.
- (52) Nelson DL, & Cox MM. Estructura secundaria de las proteínas. En: *Lehninger Principios de bioquímica.* 4.ª ed. Barcelona: Omega; 2005. p. 116-125.
- (53) Lehto T, Simonson OE, Mäger I, Ezzat K, Sork H, Copolovici D-M, et al. A Peptide-based Vector for Efficient Gene Transfer In Vitro and In Vivo. *Molecular Therapy.* 2011;19(8):1457-1467.
- (54) Lehto T, Kurrikoff K, & Langel Ü. Cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids. *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2012;9(7):823-836.

Agradecimientos

Al grupo de investigación de Javier Montenegro, que me acogió como una más. No podría haber tenido una mejor introducción al apasionante mundo de la investigación.

En especial a Iria, a Irene y a Marisa, que me guiaron con su experiencia. Ellas me proporcionaron las herramientas necesarias para poder ser más independiente en el laboratorio, y para desarrollar un razonamiento crítico. Y por supuesto a Javier Montenegro, mi tutor, que siempre estaba dispuesto a dedicarme su tiempo para aconsejarme y ayudarme.

A mis padres, a mi hermana (que me ayudó a escoger los colores de los gráficos) y a mis amigos, por ser mi apoyo durante estos cinco años.