



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE ACTIVADORES PEPTÍDICOS
SELECTIVOS DE PROTEÍNA FOSFATASA-1**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

Daniela Avilés Huerta

Directora de Tesis:

Dra. Maja Koehn



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS

VOCAL: Dra. AURORA LARA NUÑEZ

SECRETARIO: Dra. MAJA KÖHN

1er. SUPLENTE: Dra. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

2do. SUPLENTE: Dr. OCTAVIO FUENTES RAMIREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE BIOLOGÍA DEL GENOMA,
LABORATORIO EUROPEO DE BIOLOGÍA MOLECULAR (EMBL)
HEIDELBERG, ALEMANIA

ASESOR DEL TEMA:

-

Dra. MAJA KÖHN

SUSTENTANTE:

-

DANIELA AVILÉS HUERTA

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Fosforilación de proteínas	3
3.1.1. <i>Relevancia fisiológica de PSTKs y PSTPs</i>	4
3.1.2. <i>Estudio de la actividad de fosfatasas de serina/treonina</i>	4
3.2. PP1	6
3.2.2. <i>Desregulación de PP1 en enfermedades</i>	7
3.2.3. <i>Modulación química de PP1</i>	8
3.2.4. <i>Desarrollo de péptidos disruptores de PP1</i>	10
3.3. Modificaciones químicas en péptidos	11
3.3.1. <i>Acetilación N- terminal y Amidación C-terminal</i>	11
3.3.2. <i>Diseño de peptidomiméticos</i>	12
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
5. HIPÓTESIS	15
6. OBJETIVOS	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS	16
7.1. Materiales	16
7.2. Síntesis de péptidos	16
7.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución	17
7.5. Rotación específica	17
7.6. Ensayo de actividad de fosfatasa.....	17
7.7. Microscopía confocal.....	18
7.8. Ensayo de estabilidad en lisado celular	19
8. RESULTADOS	20
8.1. Diseño de peptidomiméticos	20
8.2. Caracterización de los análogos	21
8.3. Evaluación de actividad de fosfatasa	22
8.4. Ensayo de permeabilidad celular	23
8.5. Determinación de la estabilidad	24
8.6. Evaluación de la activación de PP1 en células	27
9. DISCUSIÓN	31
9.1. Cambios en la potencia de activación de PP1	31
9.2. Estudio de la permeabilidad celular para el péptido hit.....	34
9.3. Influencia de la estabilidad en la activación de PP1 <i>in vitro</i>	35
9.4. Activación intracelular de PP1 inducida por peptidomiméticos	36
10. CONCLUSIONES	37
11. REFERENCIAS	38
APÉNDICE 1	44
APÉNDICE 2	49
APÉNDICE 3	51

1. Abreviaturas

PKs	Proteínas cinasas
PPs	Proteínas fosfatasas
PSTKs	Proteínas cinasas de Serina/Treonina
PSTPs	Proteínas fosfatasas de Serina/Treonina
PPM	Proteínas fosfatasas dependientes de metal
PPP	Fosfoproteína fosfatasas
PP1	Proteína fosfatasa 1
PIPs	Proteínas interactoras de PP1
NIPP1	Inhibidor nuclear de PP1
PDPs	Péptidos disruptores de PP1
IP3R	Receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato

2. Resumen

La fosforilación de proteínas es la principal modificación postraduccional de proteínas ejercida por las acciones opuestas de proteínas cinasas (PKs) y proteínas fosfatasas (PPs). La mayoría de los eventos de fosforilación ocurren en residuos de Serina o Treonina (Ser/Thr). La enzima proteína fosfatasa-1 (PP1) es una fosfatasa de serina/treonina ubicua involucrada en numerosos procesos de transducción de señales celulares. La desregulación en la actividad de PP1 ha sido relacionada con diversas patologías, incluyendo diabetes, desórdenes cardiovasculares, cáncer, infecciones virales y enfermedad de Alzheimer. Por ello, PP1 es un importante blanco biológico para el estudio de la actividad de las fosfatasas y enfermedades relacionadas, desafortunadamente existen escasas herramientas moleculares que actúen sobre proteínas fosfatasas de serina/treonina (PSTPs) dentro de la célula. Para abordar esta problemática, el desarrollo de herramientas químicas, tales como péptidos disruptores de PP1 (PDPs) que permiten la activación selectiva de PP1, contribuye a elucidar su papel en procesos celulares y alterarlos con potenciales efectos terapéuticos. No obstante, el uso de péptidos como fármacos es limitado debido a la baja permeabilidad celular y estabilidad metabólica. Con el propósito de generar activadores selectivos de PP1 con alta estabilidad y potencia, y con la capacidad de atravesar la membrana celular; la presente tesis se enfoca en la optimización de un líder de cinco aminoácidos por medio de modificaciones en los extremos C- y N- terminales y mediante la incorporación de peptidomiméticos. El trabajo comprende (1) la síntesis y caracterización de los nuevos compuestos, así como (2) la evaluación de su actividad en ensayos enzimáticos con PP1. Posteriormente, se presenta (3) la determinación de la permeabilidad celular y la estabilidad del nuevo hit. Finalmente, se llevaron a cabo (4) ensayos funcionales en células con los análogos más potentes.

3. Introducción

3.1. Fosforilación de proteínas

La fosforilación de proteínas es la principal forma de modificación postraduccional reversible¹, produciendo cambios significativos en cascadas de transducción de señales celulares². La fosforilación juega un papel fundamental sobre las funciones biológicas y controla de cerca cada proceso celular, tales como metabolismo³, transcripción y traducción génica⁴, progresión del ciclo celular⁵, reorganización del citoesqueleto⁶, interacciones proteína-proteína⁷, estabilidad protéica⁸, movimiento celular⁹, y apoptosis¹⁰. Estos procesos dependen de la actividad opuesta y altamente regulada de proteínas cinasas y proteínas fosfatasas¹¹.

Las proteínas cinasas (PKs) son las efectoras de la fosforilación y catalizan la transferencia de un γ -fosfato procedente de ATP a aminoácidos determinados en proteínas¹². La unión covalente de grupos fosfato suele alterar la función de proteínas al inducir cambios conformacionales o por la disrupción y creación de superficies de interacción proteína-proteína⁴. En contraste, las proteínas fosfatasas (PPs) actúan hidrolizando fosfomonoésteres unidos a proteínas¹³.

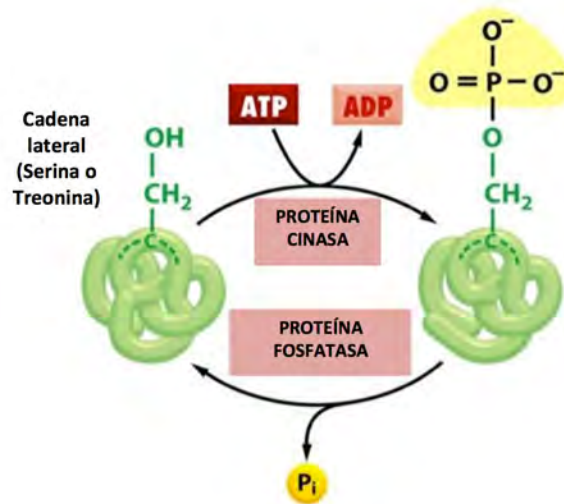


Figure 1. Fosforilación reversible de proteínas. Editado de: Molecular Biology of the Cell 5ed. Garland Science, 2008.

3.1.1. Relevancia fisiológica de PSTKs y PSTPs

La mayoría de los eventos de fosforilación en eucariontes ocurren en residuos de serina o treonina, y en menor proporción de tirosina¹⁴, que corresponden al 86, 12 y 2% del fosfoproteoma en mamíferos^{15,16}. El funcionamiento normal de una célula requiere una estricta regulación espacio-temporal de la actividad de proteínas cinasas y fosfatasas de serina/treonina (PSTKs y PSTPs)¹⁷, y por consiguiente, alteraciones en este mecanismo dinámico contribuyen al desarrollo y evolución de diversas enfermedades¹⁸.

En el caso de fosforilación aberrante relacionada a diversas patologías, los inhibidores de PSTKs son ampliamente utilizados como agentes terapéuticos y para estudios funcionales, ejemplos de estos son: rapamicina (Sirolimus) como inmunosupresor, imatinib (Gleevec) para el tratamiento de leucemia mieloide crónica y tumores gastrointestinales, y gefitinib (Iressa) para cáncer pulmonar de células pequeñas³. Actualmente, se carece de fármacos específicamente dirigidos a PSTPs en células vivas.^{3,13}.

En los últimos años, la desregulación en la actividad de fosfatasas de serina/treonina ha sido ligada a diversas enfermedades, incluyendo diabetes¹⁹, trastornos cardiovasculares²⁰, cáncer^{21,22}, y Alzheimer²³. Por ello, la actividad de fosfatasa podría manipularse igualmente, para modificar procesos de señalización celular con posibles efectos terapéuticos y como herramientas químicas para el estudio de los procesos celulares afectados².

3.1.2. Estudio de la actividad de fosfatasas de serina/treonina

Las proteínas fosfatasas de serina/treonina, catalizan las reacciones de desfosforilación sobre residuos de fosfo-serina y fosfo-treonina, efectuando un ataque nucleofílico sobre el grupo fosfato, facilitado por una molécula de agua activada por metal, ubicada dentro del sitio catalítico³.

Estudios sobre la estructura, función y regulación de las subunidades catalíticas de PSTP han aportado una clasificación sistemática de estas enzimas, basada en sus propiedades bioquímicas y homología en secuencia. La clásica superfamilia de PSTPs puede dividirse en la superfamilia de fosfoproteínas fosfatasas (PPP) y en la familia de proteínas fosfatasas dependientes de metal (PPM)²⁴.

La familia PPM se compone de fosfatasas dependientes de iones de Mn^{2+}/Mg^{2+} , comprendida principalmente de PP2C y de fosfatasa piruvato deshidrogenasa¹¹. La superfamilia PPP constituye la más grande clase de PSTP, miembros representativos son proteína fosfatasa 1 (PP1), PP2A, PP2B (comúnmente llamada calcineurina), PP4, PP5, PP6 y PP7, las cuales exhiben gran homología en secuencia dentro de sus dominios catalíticos y probablemente comparten mecanismos catalíticos similares^{11,25,26}.

PP1, PP2A y PP2B de la familia PPP, junto con PP2C de la familia PPM desempeñan la mayoría de la actividad Ser/Thr fosfatasa *in vivo*¹¹.

Quizás la principal diferencia entre las familias PPM y PPP es que los miembros de la primera generalmente actúan como monómeros, mientras los de la segunda forman complejos holoenzimáticos multiméricos con una gran variedad de proteínas blanco, reguladoras, inhibidoras y de andamiaje, que asignan especificidad de sustrato y dirigen la localización intracelular de la subunidad catalítica^{27,28}. Gracias a esto, la actividad de diversas holoenzimas de fosfatasa, cada una compuesta de una subunidad catalítica asociada a subunidades reguladoras, es altamente específica y regulada³.

3.2. PP1

La proteína fosfatasa-1 (PP1) es una PSTP de la superfamilia PPP ubicuamente expresada, predecida por catalizar la mayor cantidad de desfosforilaciones de Ser/Thr en eucariontes^{29,30}. PP1 figura prominentemente en una amplia gama de procesos celulares, que incluyen mitosis³¹, señalización de Ca^{2+} ³², transcripción génica³³, síntesis de proteínas³⁰, plasticidad sináptica³⁴, contracción muscular³⁴, metabolismo³⁴ y apoptosis³⁵.

Aunque la subunidad catalítica de PP1 (Fig. 2 región violeta), la cual predomina en 3 isoformas: PP1 α , β y γ , no muestra especificidad de sustrato mas allá de la preferencia por serina o treonina, su actividad catalítica intracelular es estrictamente regulada por la formación de más de 200 complejos holoenzimáticos con diversas proteínas reguladoras, conocidas como proteínas interactoras de PP1 (PIPs) las cuales direccionan a la subunidad catalítica hacia específicos compartimientos intracelulares, modulan especificidad de sustrato y sirven también como sustrato^{30,36,37}.

Existen alrededor de 10 motivos distintos de acoplamiento molecular con PP1 presentes en proteínas reguladoras. Más del 90% de las PIPs se unen a un sitio regulatorio primario en PP1, un canal hidrofóbico denominado sitio de unión tipo RVxF (Fig. 2, región naranja), el cual queda separado del sitio catalítico por medio de una secuencia de acoplamiento conocida como motivo RVxF (x= cualquier aminoácido excepto prolina)³⁸.

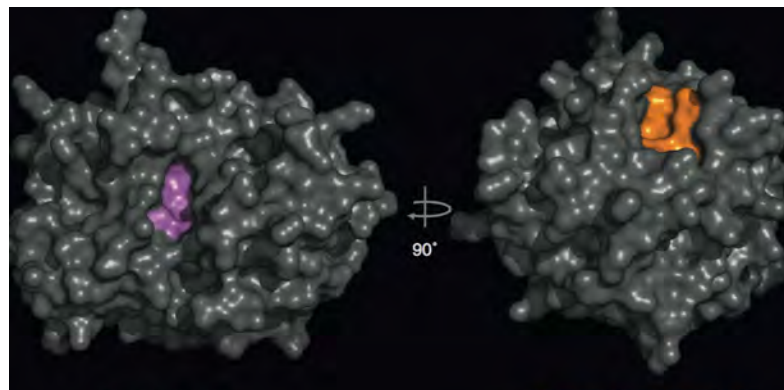


Figura 2. Estructura cristalina de PP1, sitio catalítico (izquierda) y el sitio regulatorio (derecha). Fuente: *Current Opinion in Chemical Biology*, **2013**, 17:361–368.

A muchas PIPs validadas se les ha asignado función, principalmente en procesos de señalización tales como regulación de síntesis de proteínas, transcripción, respuesta al estrés, entre otros.^{30,37}.

3.2.2. Desregulación de PP1 en enfermedades

La desregulación de las holoenzimas de PP1 tiene gran relevancia fisiológica³⁹. En el caso de infecciones virales, la inhibición de la actividad de PP1 por medio de una proteína reguladora (HBx) del virus de la hepatitis B incrementa la tasa de transcripción viral⁴⁰. Además, la proteína Tat del virus de inmunodeficiencia humana (HIV)-1, la cual activa la transcripción viral, interacciona directamente con PP1⁴¹.

La disminución de la actividad de PP1, lleva a la inhibición de la secreción de insulina, lo que sugiere la participación de PP1 en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2⁴². Igualmente, se ha demostrado que la inhibición de PP1 es cardioprotectora, evitando el desarrollo de hipertrofia cardíaca e infarto⁴³.

Dado que la actividad de PP1 gobierna varias rutas metabólicas importantes para el crecimiento celular y proliferación²², su papel en diferentes tipos de cáncer ha sido estudiado:

En el cáncer de próstata, la inhibición de PP1 aumenta la actividad de AKT, una proteína cinasa que promueve crecimiento y supervivencia celular, lo que indica la función crucial de PP1 en la tumorigénesis⁴⁴. Adicionalmente, estudios recientes han demostrado que PP1 puede regular la estabilidad y localización celular del receptor de andrógenos AR via la desfosforilación de Ser-650⁴⁵. La actividad de PP1 bloquea también la degradación dependiente de proteasoma de SRC-3⁴⁶, un oncogen sobreexpresado en la mayoría de los tumores de cáncer de mama⁴⁷.

A su vez, se ha reportado la acción de PP1 en la metastasis tumoral, ya que la supresión de PP1 en complejo con su PIP inhibidor nuclear (NIPP1), ha demostrado prevención de la migración de células malignas de próstata y cervix, por medio de la inhibición de la vía de señalización de Cdc42⁴⁸.

Finalmente, PP1 desempeña un papel importante en la progresión de cáncer y respuesta terapéutica, en el caso de cáncer de vejiga es un biomarcador para medir la progresión de la enfermedad⁴⁹. Por otro lado, la actividad de PP1 es esencial para controlar la radioresistencia de células de cáncer pulmonar, lo que sugiere que los activadores de PP1 pueden servir como prometedores fármacos radiosensibilizantes para mejorar la eficacia terapéutica de la radioterapia⁵⁰.

Por lo tanto, se espera que la investigación dirigida al descubrimiento de sitios de unión, caracterización de interfaces y librerías químicas enfocadas en PP1, permita acelerar el desarrollo de la nueva generación de agentes antineoplásicos o medicina de precisión basada en PP1⁵¹.

3.2.3. Modulación química de PP1

La estrategia más directa para bloquear la actividad de una enzima es por medio del diseño de moléculas que se unan a su sitio activo (catalítico) y bloqueen el acceso a sustratos³⁷. Sin embargo, el mayor obstáculo para el diseño de inhibidores selectivos de PP1 yace en la alta conservación estructural de su sitio catalítico con otros miembros de la familia PPP, especialmente con el de PP2A⁵².

Varios productos de toxinas naturales que exhiben selectividad relativa entre PP1 y PP2A *in vitro*, han sido utilizados durante años para estudiar las funciones de ambas fosfatasa en procesos de señalización celular, algunos ejemplos son los péptidos cíclicos inhibidores como las microcistinas y nodularinas; derivados de terpenos como la cantaridina; el ácido okadaico que es un poliéter; y la

caliculina y tautomicina⁵³. No obstante la utilidad estos inhibidores en ensayos funcionales y como cabezas de serie es limitado por su gran tamaño, y pobre biodisponibilidad, estabilidad y permeabilidad celular bajas, lo que hasta ahora no ha permitido el desarrollo de ligandos selectivos con alta afinidad³⁷.

Alternativamente, los activadores enzimáticos han ganado recientemente mucha atención, primero porque proveen de una herramienta para el estudio de los mecanismos endógenos de activación enzimática⁵⁴, y segundo, debido a su potencial terapéutico, por ejemplo, en la investigación clínica y preclínica enfocada en la búsqueda de tratamientos para ciertos tipos de cáncer que se caracterizan por fosforilación anormal, el cáncer que es retrasado por inhibidores de proteínas cinasas podría también responder al tratamiento con determinados activadores de proteínas fosfatasas³.

Una estrategia interesante para el desarrollo de efectores selectivos a PP1, es la disrupción de las interfaces entre PP1 y PIPs³⁷, una de ellas es el motivo de unión a PP1 tipo RVxF. Se ha reportado que péptidos sintéticos que contengan variantes del motivo RVxF, son disruptores de una gama de complejos PIP-PP1 *in vitro*^{30,38,55}. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que el uso de péptidos en células vivas es frecuentemente impedido por la insuficiente permeabilidad celular y su inestabilidad proteolítica⁵⁶.

Para validar holoenzimas de PP1 como blancos farmacológicos y facilitar la acción selectiva de este tipo de fármacos, es crucial la identificación de interacciones específicas holoenzima-sustrato y relacionarlas con la enfermedad en cuestión. Además, el ensamblaje, dinámica y transformación holoenzimática son parámetros importantes para el diseño de moduladores químicos.³⁷

3.2.4. Desarrollo de péptidos disruptores de PP1

Como ya se ha mencionado, la activación de PP1 puede ser una estrategia novedosa para el estudio de las funciones de PP1 y para contrarrestar la actividad patológicamente elevada de PSTKs. Los péptidos disruptores de PP1 son herramientas químicas selectivas para el estudio de PP1, que compiten con PIPs endógenos lo cuales contienen el motivo RVxF pero no se unen a las muy similares fosfatasa PP2A y PP2B². En el grupo de la Dra. Maja Köhn en EMBL, se han desarrollado PDPs con propiedades diferentes, permitiendo la activación permanente o reversible de PP1 en células vivas (Tabla 1).

A continuación se explica brevemente el diseño de estos péptidos: como compuesto líder, se sintetizó PDP0 que comprende el motivo RVxF y las secuencias del inhibidor nuclear de PP1 (NIPP1). Una posterior optimización a través del reemplazo de serina por alanina de los aminoácidos que flanquean el motivo RVxF y en la secuencia EDDE C-terminal, generó PDP1, que resultó incapaz de atravesar membrana celular. Sin embargo, la adición secuencial de residuos de arginina y lisina en el extremo N-terminal de PDP1 permitió el diseño de PDP2, un activador reversible y capaz de penetrar en la célula. Por último, la adición de un aminoácido no natural como L-4-benzoilfenilalanina (*Bpa*) en Ala-18 de PDP2 llevó al descubrimiento del primer compuesto capaz de penetrar membrana celular, proteolíticamente estable y que activa PP1 por medio de la disrupción de una variedad de holoenzimas de PP1 en células: PDP3.¹³

Tabla 1. Potencia de los péptidos disruptores del complejo PP1:l2

Péptido	Secuencia	EC ₅₀ ; (nM)
PDP0	RPKRKRKNSRVTFSEDEII	87 ± 10
PDP1	RPKRKRKNARVTFEAAEII	21 ± 2
PDP2	RRKRPKRKRKNARVTFEAAEII	53 ± 2
PDP3	RRKRPKRKRKNARVTF <i>Bpa</i> EAAEII	176 ± 13

Fuente: *Angewandte. Chemie. Int. Ed.* **2012**, 51, 1 – 7

Se ha demostrado que la activación selectiva de PP1 por los PDPs, origina oscilaciones del ion Ca^{2+} en diferentes líneas celulares provenientes del retículo endoplásmico (ER) que involucran al receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3R), el cual actúa como un canal iónico que libera el Ca^{2+} almacenado en ER hacia el citoplasma^{2,57}.

Además, la activación de PP1 previene la fosforilación de la treonina 3 de la histona 3 (H3T3) por la PSTK Haspina⁵⁸, conocida por su papel en el arresto del ciclo celular y en la diferenciación de células haploides germinales⁵⁹. A su vez, esta activación afecta el normal funcionamiento de Aurora B, responsable de la regulación de las interacciones de los cromosomas con los microtúbulos, cohesión, estabilidad del huso mitótico y citocinesis⁶⁰. Notablemente, los inhibidores de Haspina⁶¹ y Aurora B⁶² se evalúan actualmente como novedosos fármacos contra el cáncer, por consiguiente, los activadores de PP1 podrían albergar un gran potencial como agentes terapéuticos antineoplásicos y servir como los fármacos epigenéticos de nueva generación⁶³.

3.3. Modificaciones químicas en péptidos

3.3.1. Acetilación N-terminal y Amidación C-terminal

Los péptidos de 3 a 40 aminoácidos constituyen un grupo importante de mensajeros químicos para la comunicación celular. Las modificaciones postraduccionales son a menudo esenciales para su reconocimiento específico por receptores cognados, y altamente reguladas para la síntesis de péptidos biológicamente activos⁶⁴.

Además de la fosforilación, existe una pléthora de modificaciones postraduccionales, tales como la α -amidación en C-terminus y la acetilación en N-terminus, importantes para la regulación de la actividad biológica de los péptidos^{64,65}. Estas modificaciones químicas pueden incorporarse sintéticamente a estos compuestos a modo de incrementar su potencia⁶⁶⁻⁶⁸ y estabilidad proteolítica^{65,69,70}.

El extremo C-terminal de un péptido se sintetiza como una amida para neutralizar la carga negativa sobre el ácido carboxílico terminal. Esta modificación se adiciona para prevenir degradación enzimática, simular proteínas nativas y en algunos casos, remover puentes de hidrógeno con el C-terminal que interfieran con los ensayos⁶⁴.

Por otra parte, la acetilación remueve la carga positiva en el N-terminal, simulando proteínas nativas. En algunos casos, incrementa la estabilidad del péptido al prevenir degradación por N-terminal⁶⁵, aunque en ciertas proteínas se le ha relacionado con la creación de señales de degradación⁷¹. Finalmente, la acetilación en N-terminal de hormonas peptídicas puede prolongar su vida media en anaquel⁷².

3.3.2. Diseño de peptidomiméticos

La aplicación terapéutica de péptidos y proteínas es de especial interés en diversas áreas tales como neurología, endocrinología y hematología⁵⁶. Sin embargo, el uso de péptidos como fármacos es complicado debido a su baja biodisponibilidad y bioestabilidad^{73,74}, ejemplos de estas limitaciones son: degradación rápida por proteasas, pobre absorción oral, dificultad para atravesar membranas celulares y unión no selectiva con otros receptores⁷⁴.

En consecuencia, pequeñas cadenas laterales tipo proteínas, llamadas peptidomiméticos han sido diseñadas para simular análogos de proteínas nativas y sustancialmente exhibir mejores propiedades farmacológicas⁷².

Los peptidomiméticos representan un importante campo en Química, Farmacología y Ciencia de materiales ya que circunvienen las limitaciones de los péptidos tradicionales usados en terapia por medio de modificaciones en sus aminoácidos, permitiendo la formación de estructuras secundarias como giros, hélices, hojas plegadas y asas⁵⁶.

Aparte de extender la diversidad química y estructural de los péptidos, estas modificaciones también aumentan su estabilidad proteolítica, mejorando su uso en sistemas vivos⁷⁶. Existen diferentes estrategias para llevar a cabo el diseño de peptidomiméticos, pueden prepararse por ejemplo: por la ciclación de péptidos lineales⁷⁷ y/o por acoplamiento a aminoácidos no naturales⁷⁸.

Los aminoácidos no naturales pueden sintetizarse *de novo* o generarse a partir de sus análogos naturales por medio de diferentes modificaciones como: alquilación del grupo amino (*N*-metilación⁷⁹), sustituciones en cadena lateral, ciclación, extensión estructural o reemplazos isostéricos sobre el eje o esqueleto peptídico⁵⁶ (Figura 3).

En el caso de la extensión del eje peptídico, la inserción de un carbono extra entre los grupos carboxilo y amino de un aminoácido genera un gran número de isómeros constitucionales y configuracionales⁵⁶. La excelente estabilidad ante proteasas y la mejora de la propiedades farmacocinéticas de estos péptidos ha alentado el interés en su potencial terapéutico⁸⁰.

Este grupo de péptidos puede derivarse de beta aminácidos, los cuales tienen el grupo amino unido al carbono β en lugar de al carbono α , adoptando estructuras secundarias tipo proteína, determinadas por enlaces de hidrógeno intramoleculares en diversos disolventes⁸¹. Otra opción es la incorporación de homo aminoácidos (el prefijo "homo" denota la adición de un metileno $-CH_2$ en el carbono α) y finalmente de homo- β -aminoácidos (contienen ambas modificaciones)⁸² que son utilizados para crear análogos con cambios en la actividad biológica.

Se prefiere la incorporación de beta-aminoácidos, particularmente homo-beta por sus tres importantes características: primera, extrema resistencia ante proteasas; segunda, flexibilidad del eje peptídico y; tercera, capacidad de atravesar barreras celulares⁸³.

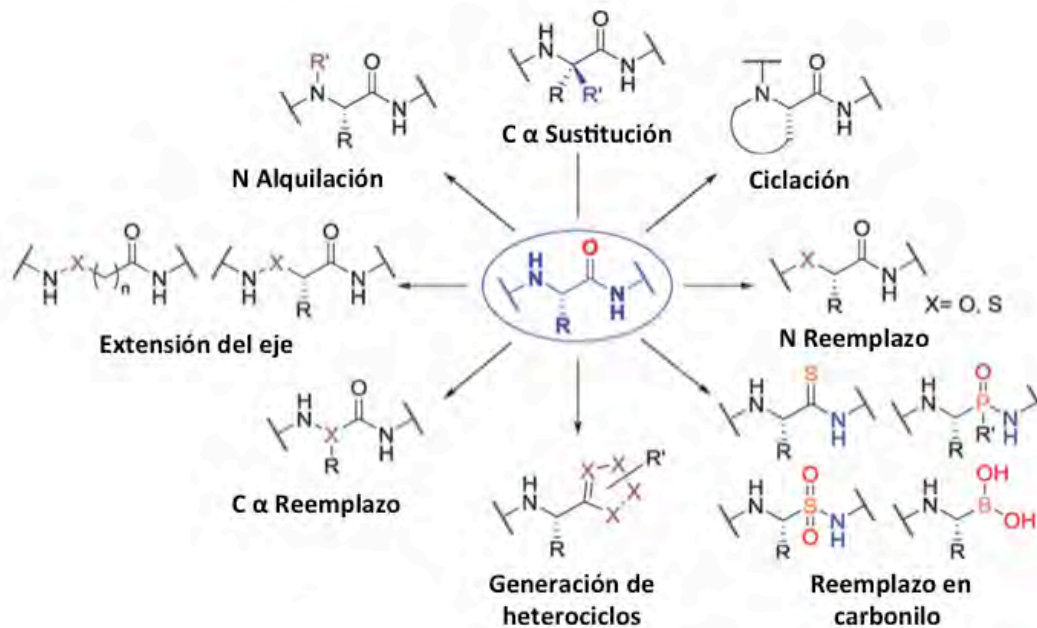


Figura 3. Manipulaciones peptidomiméticas en aminoácidos nativos. Fuente: *Chemical Society Reviews*, 2014, 43, 3575--3594

4. Planteamiento del Problema

En los últimos años, la desregulación de la actividad de proteínas fosfatasa de serina/treonina se ha relacionado con el desarrollo de múltiples patologías. Lamentablemente, existen pocas herramientas químicas dirigidas al estudio de estas fosfatasas dentro de la célula. Se sabe que la proteína fosfatasa-1 es una diana biológica importante para el estudio de la actividad de fosfatasa y que el desarrollo de péptidos disruptores que permiten su activación selectiva contribuye a elucidar su papel en los procesos celulares con potenciales efectos terapéuticos. Sin embargo, el empleo de péptidos como fármacos se limita a su baja capacidad de atravesar la membrana celular y estabilidad metabólica disminuida.

5. Hipótesis

1. Si se considera que la acetilación en *N*-terminus y la amidación en *C*-terminus reducen la carga neta de los péptidos, lo que podría simular a una proteína nativa. Se espera que estas modificaciones incrementen la potencia y estabilidad proteolítica del compuesto líder.
2. La incorporación de peptidomiméticos por medio de la introducción de aminoácidos no naturales podría generar análogos más estables que el líder, favoreciendo su uso como activadores de PP1 dentro de la células.

6. Objetivos

Generales

El desarrollo de péptidos disruptores que activen selectivamente a PP1, por medio de modificaciones químicas en los extremos *C*- y *N*- terminales y por el diseño de peptidomiméticos incorporando aminoácidos no naturales a un compuesto líder.

La evaluación de la potencia de activación de PP1, estabilidad proteolítica y actividad dentro de las células de los nuevos análogos

Particulares

1. Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) basada en un protocolo Fmoc.
2. Purificación de los nuevos productos por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC).
3. Caracterización de los péptidos por rotación específica y por HPLC acoplado a espectrometría de masas (HPLC/MS).
4. Evaluación de la potencia de los compuestos en un ensayo DiFMUP con PP1.
5. Determinación de la permeabilidad celular y estabilidad del nuevo hit.
6. Probar la actividad de los mejores candidatos en células usando imagen radiométrica de Ca^{2+} .

7. Materiales y Métodos

7.1. Materiales

Todos los compuestos químicos y solventes anhidros se obtuvieron de Sigma-Aldrich y VWR y empleados sin previa purificación. Los Fmoc-aminoácidos, 2-hexafluorofosfato de (1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium (HBTU), Triisopropilsilano (TIS) y resina de amida de Rink AM (200-400 mesh, 0.62 mmol/g y 0.57 mmol/g carga) fue adquirida de Novabiochem. Hidroxibenzotriazol (HOBt) fue de Molekula. Hexafluorofosfato de 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluranium (HATU) y 1-Hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) proveída por GL Biochem.

7.2. Síntesis de péptidos

Se llevó a cabo la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) con un protocolo Fmoc estándar en resina de amida de Rink usando un sintetizador automático (Syro I, MultisynTech). La resina fue cargada en un reactor de 5 mL con frit al fondo. La dilatación de la resina se efectuó al adicionar 1200 μ L DMF en incubación durante 30 min con 10 segundos de agitación por minuto (10 s/min).

La desprotección del grupo Fmoc se logró por el tratamiento con 40% piperidina/DMF durante 3 min y 20% piperidina/DMF con 10s/min. El acoplamiento de los aminoácidos se realizó dos veces con los Fmoc-aminoácidos (5 eq), HBTU (5 eq), HOBt (5 eq) en DMF y DIPEA/NMP (10 eq) por 40 minutos (10 s/min).

Para la síntesis del péptido marcado con cumarina, el *N*-terminus fue pegilado automáticamente usando ácido-8(Fmoc-amino)-3,6-dioxaoctanoico como espaciador tipo PEG siguiendo el mismo protocolo Fmoc. Después de 30 min de dilatación de la resina+producto con DMF, el marcaje del *N*-terminus desprotegido se efectuó por adición manual del ácido 7-(dietilamino) cumarin-3-carboxílico (2.5 eq), HOAt (5 eq), HATU (5 eq) y DIPEA (10 eq). El acoplamiento se dejó durante toda la noche bajo agitación.

Los péptidos unidos covalentemente a la resina fueron desanclados usando una mezcla de 95% ácido trifluoroacético (TFA), 2.5% triisopropilsilano (TIS) y 2.5% agua. Los péptidos desanclados fueron precipitados en dietiléter en hielo, centrifugados y lavados dos veces más con dietiléter. Después de la evaporación del disolvente, se adicionó el volumen mínimo de 10% ACN/H₂O para disolver el péptido crudo y purificado por HPLC.

7.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución

Las purificaciones por HPLC y el análisis HPLC-MS se llevaron a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu acoplado a espectrómetro de masas LCMS-2010EV con un detector de matriz de fotodiodos UV/Vis SPD-M20A Prominence. Para HPLC analítica y semipreparativa se empleó el modulo de solvente LC-20AD. Los disolventes usados fueron H₂O y ACN con 0.05% TFA. Para las separaciones semipreparativas se utilizó una columna Macherey Nagel VP 250/10 NUCLEODUR C18 pyramid, velocidad de bombeo 5 ml/min (tiempo de gradiente 30 min). Para las corridas RP-HPLC analíticas se prepararon alícuotas del péptido puro liofilizado disuelto en 10% ACN/H₂O, en viales con 70 µL de volumen de inyección en una columna Macherey Nagel EC 250/4.6 NUCLEODUR C18 pyramid ec, velocidad de bombeo 1.5 ml/min (tiempo de gradiente 22 min).

7.5. Rotación específica

La rotación específica se midió en un polarímetro Schmidt+Haensch a 589 nm longitud de onda (línea D sodio) al menos 3 veces. Los péptidos se disolvieron en agua en un intervalo de concentración 0.450-0.890 g/100 mL .

7.6. Ensayo de actividad de fosfatasa

En un volumen final de reacción de 100 µL, se incubó PP1 (25 pM concentración final) en combinación con su inhibidor 2 (I2) en una concentración equivalente a 45-55% inhibición de la actividad de PP1, durante 10 min en hielo.

Inmediatamente después se adicionaron concentraciones decrecientes de los péptidos puros seguido de incubación durante 20 min a temperatura ambiente. La composición del buffer de ensayo fue: 50 mM imidazol (pH 7.4), 10 mM NaCl, 2 mM ditioneitol (DTT), 1mM $MnCl_2$ y Triton 0.05%. Pasado el tiempo de incubación, se agregó DiFMUP (6,8-Difluoro-4-metilumbeliferil fosfato) para alcanzar una concentración final de 50 μ M. El producto fluorescente de la defosforilación se midió en un lector de placas Tecan safire2 (Tecan, Salzburg, Austria) a 358 nm emisión y excitación a 452 nm por 20 minutos. Todas la mediciones se hicieron por triplicado y cada experimento (por compuesto) repetido al menos 3 veces. Las pendientes iniciales se obtuvieron por regresión lineal de los puntos, sustrayendo el previamente el ruido de fondo. Se graficó la respuesta vs el log de la concentración de agonista, los valores de EC50 se calculó al adaptar las curvas usando un modelo de regresión no lineal Log(agonist) Vs. Response (3 ó 4 parámetros) de GraphPad Prism (GraphPad Software, Version 6).

7.7. Microscopía confocal

El mantenimiento de la línea celular HeLa Kyoto se realizó en medio DMEM bajo en glucosa, suplementado con 10% FBS, 1% Penicilina/ Streptomycin y 1% L-glutamina en cajas petri de 10 cm a 37° C en atmósfera humidificada con 5% CO₂. Antes de la visualización de las células, se sembraron en LabTeks (NUNC) de ocho cámaras con una confluencia esperada del 75% pasadas 24 h. Las imágenes confocal se realizaron con un microscopio confocal láser de barrido Olympus Life Science usando el objetivo 60x con aceite de inmersión.

Para el ensayo de permeabilidad celular, se adicionaron a las células 100 μ M, 50 μ M y 25 μ M del hit marcado con cumarina en buffer para imagen (20 mM HEPES pH 7.4, 115 mM NaCl, 1.2 mM $MgCl_2$, 1.2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM K_2HPO_4 y 2 g/L D- glucosa), seguido de tres lavados con buffer de imagen a 30 min, 60 min, 90 min y 120 min. Se visualizó con el láser de 405 nm laser y se grabó la emisión de 425 a 525 nm longitud de onda.

Para la imagen radiométrica de Ca^{2+} , las células se incubaron con $0.5 \mu\text{M}$ de Fluo-4 (Life Technologies) en buffer de imagen durante 30 min a temperatura ambiente. Después de lavados con buffer las células se grabaron durante 2 min para verificar la ausencia de corrientes de Ca^{2+} , luego se adicionó PDP3 $40 \mu\text{M}$ como control positivo y grabó durante 10 min. Una vez establecida la respuesta de la población celular, se añadieron $500 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$ de los respectivos péptidos en cámaras independientes y se grabó también por 10 min. Para este ensayo se usó el láser de 488 nm registrando la emisión de 425 a 525 nm. El procesamiento de imágenes se llevó a cabo con ImageJ Software.

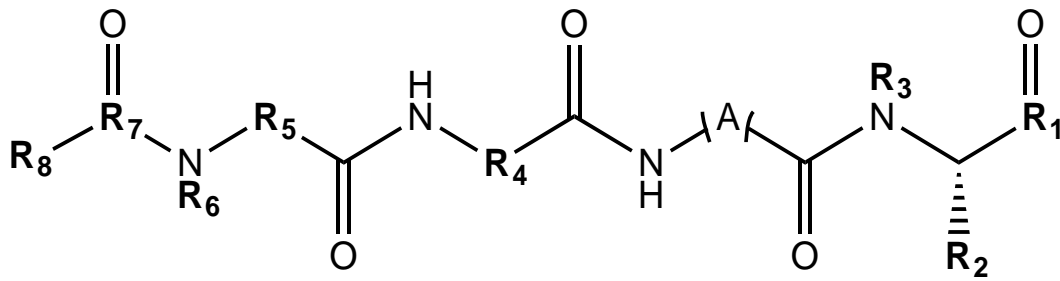
7.8. Ensayo de estabilidad en lisado celular

Se sembraron células HeLa Kyoto al 80 % de confluencia en cuatro cajas petri de 10 cm a 37°C en atmósfera humidificada con 5 % CO_2 . Para la lisis, células de cada caja se lavaron con PBS en hielo e incubaron con 1 mL de buffer de lisis (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 % glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % triton-X y 1x cocktail inhibidor de proteasas) por 5 min en hielo.

Posteriormente, el lisado celular se centrifugó por 15 min (13000 rpm, 4°C). Para la incubación con el péptido, 1200 μL del sobrenadante se suplementaron con $300 \mu\text{M}$ del péptido marcado y $300 \mu\text{M}$ del fluoróforo ácido 7-(dietilamino) cumarin-3- carboxílico como estándar interno en incubación a 37°C . A diferentes tiempos (0.5h, 1h, 2h, 4h, 8h), se tomaron alícuotas de 180 μL , las proteínas residuales fueron precipitadas con 45 μL de solución de tricloroacetato (6.1 N, Sigma) en incubación en hielo por 10 min. Después de centrifugar por 20 min (13000 rpm, 4°C), se analizó el sobrenadante por HPLC (columna Macherey Nagel EC 250/4.6 NUCLEODUR C18 pyramid ec; $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ con 0.05 % TFA; 10-100 % gradiente). Se compararon las AUC de los picos del péptido, normalizadas a las AUC de la señal del estándar interno. Los picos del péptido se consideraron solamente al ser visibles a la longitud de onda de la cumarina (410 nm), a los tiempos de retención correspondientes a los péptidos puros, sin transape de los picos del lisado celular.

8. Resultados

8.1. Diseño de peptidomiméticos



A: aminoácido farmacofórico

Figura 4. Modelo de sustituciones de peptidomiméticos.

8.2. Caracterización de los análogos

Tabla 2. Tiempos de retención en HPLC, masas exactas y rotación específica; t_R (10-100% ACN/0.05%TFA en 22 min)

Péptido	t_R (min)	MS	$[\alpha]_D^{20}$; c. (g/100 mL)
1	5.6	m/z calcd. para $C_{32}H_{53}N_{12}O_5^+$: 685.43 [M+H] ⁺ ; vista: 685.45	-23.83 ± 0.13 (c. 0.635, H ₂ O)
2	6.1	m/z calcd. para $C_{34}H_{54}N_{11}O_7^+$: 728.42 [M+H] ⁺ ; vista: 728.40	-26.46 ± 0.23 (c. 0.630, H ₂ O)
3	5.9	m/z calcd. para $C_{34}H_{55}N_{12}O_6^+$: 727.44 [M+H] ⁺ ; vista: 727.45	-34.45 ± 0.09 (c. 0.580, H ₂ O)
4	6.3	m/z calcd. para $C_{32}H_{59}N_{12}O_5^+$: 691.47 [M+H] ⁺ ; vista: 691.45	-30.92 ± 0.02 (c. 0.890, H ₂ O)
5	6.5	m/z calcd. para $C_{36}H_{55}N_{12}O_5^+$: 735.44 [M+H] ⁺ ; vista: 735.45	-38.31 ± 0.05 (c. 0.690, H ₂ O)
6	6.8	m/z calcd. para $C_{36}H_{55}N_{12}O_5^+$: 735.44 [M+H] ⁺ ; vista: 735.50	-34.19 ± 0.20 (c. 0.635, H ₂ O)
7	5.7	m/z calcd. para $C_{33}H_{55}N_{12}O_5^+$: 699.43 [M+H] ⁺ ; vista: 699.45	-50.32 ± 0.20 (c. 0.725, H ₂ O)
8	7.0	m/z calcd. para $C_{32}H_{51}N_{12}O_5^+$: 683.41 [M+H] ⁺ ; vista: 683.40	-22.52 ± 0.08 (c. 0.505, H ₂ O)
9	5.9	m/z calcd. para $C_{33}H_{55}N_{12}O_5^+$: 699.43 [M+H] ⁺ ; vista: 699.50	-32.80 ± 0.04 (c. 0.560, H ₂ O)
10	6.0	m/z calcd. para $C_{33}H_{55}N_{12}O_5^+$: 699.43 [M+H] ⁺ ; vista: 699.45	-25.01 ± 0.12 (c. 0.480, H ₂ O)
11	6.2	m/z calcd. para $C_{33}H_{55}N_{12}O_5^+$: 699.44 [M+H] ⁺ ; vista: 699.45	-17.71 ± 0.11 (c. 0.490, H ₂ O)
12	6.1	m/z calcd. para $C_{32}H_{48}N_{11}O_5^+$: 666.38 [M+H] ⁺ ; vista: 666.35	-15.65 ± 0.06 (c. 0.625, H ₂ O)
13	5.8	m/z calcd. para $C_{32}H_{53}N_{12}O_5^+$: 685.43 [M+H] ⁺ ; vista: 685.40	-35.68 ± 0.20 (c. 0.880, H ₂ O)
14	7.3	m/z calcd. para $C_{32}H_{53}N_{12}O_5^+$: 685.43 [M+H] ⁺ ; vista: 685.45	-24.75 ± 0.05 (c. 0.520, H ₂ O)
15	7.5	m/z calcd. para $C_{33}H_{55}N_{12}O_5^+$: 699.44 [M+H] ⁺ ; vista: 699.50	-27.16 ± 0.04 (c. 0.690, H ₂ O)
16	7.4	m/z calcd. para $C_{31}H_{51}N_{12}O_5^+$: 671.41 [M+H] ⁺ ; vista: 671.40	-21.75 ± 0.28 (c. 0.860, H ₂ O)
17	6.5	m/z calcd. para $C_{33}H_{55}N_{14}O_5^+$: 727.45 [M+H] ⁺ ; vista: 727.45	-19.84 ± 0.04 (c. 0.530, H ₂ O)
18	6.3	m/z calcd. para $C_{33}H_{55}N_{14}O_5^+$: 727.45 [M+H] ⁺ ; vista: 727.45	-27.57 ± 0.04 (c. 0.450, H ₂ O)
c-1	9.5	m/z calcd. para $C_{51}H_{75}N_{15}O_{11}^+$: 1073.57 [M+H] ⁺ ; vista: 1073.65	-0.81 ± 0.03 (c. 0.520, H ₂ O)

8.3. Evaluación de actividad de fosfatasa

Para evaluar la actividad de los péptidos sintetizados, se probaron en un ensayo competitivo, en el se midió la liberación de PP1 de su Inhibidor 2 (I2), mediada por cada péptido. I2 se une a PP1 a través del motivo RVxF, inhibiendo a PP1⁸⁴. Su liberación resulta en la de inhibición de PP1, la cual se midió usando un ensayo de actividad de fosfatasa, donde la potencia se determinó al calcular la concentración de péptido requerida para producir el 50% del máximo efecto posible (EC₅₀). EC₅₀ del líder = 1.5 ± 0.6 µM (por Miriam Fontanillo Dolz) Las curvas de activación se presentan en el Apéndice 2.

Tabla 3. Potencia del los péptidos en la disrupción del complejo PP1:I2 y activar a PP1; EC₅₀ media ± desviación estándar (n = 3).

Péptido	Potencia (EC₅₀; µM)
1	0.61 ± 0.04
2	3.26 ± 0.54
3	1.67 ± 0.09
4	52.5 ± 1.8
5	1.5 ± 0.4
6	2.5 ± 0.2
7	23.5 ± 0.7
8	2.09 ± 0.07
9	4.7 ± 0.3
10	1.7 ± 0.2
11	203.5 ± 1.9
12	24.6 ± 2.1
13	2.6 ± 0.4
14	2.9 ± 0.1
15	9.8 ± 0.2
16	4.15 ± 0.07
17	6.6 ± 0.2
18	3.2 ± 0.2

8.4. Ensayo de permeabilidad celular

Se realizaron experimentos en tiempo real de microscopia confocal con el hit marcado con cumarina (**c-1**, Figura 5) para confirmar su penetrabilidad en la membrana celular y distribución en células HeLa. El compuesto fue internalizado por completo a los 90 min (Figura 6C), localizado en el citoplasma y como patrón punteado dentro del núcleo. Apéndice 3 (25 μ M, 50 μ M c-1 y el control)

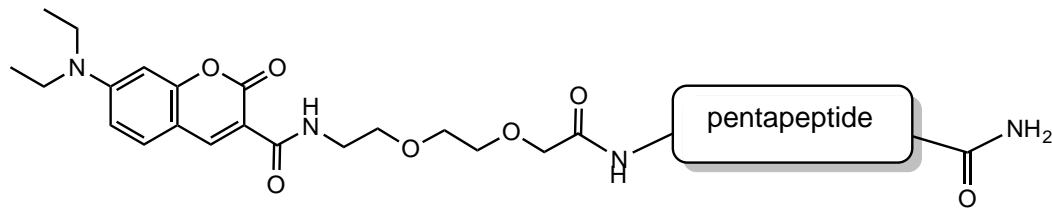


Figura 5. Esquema del hit marcado con cumarina (c-1)

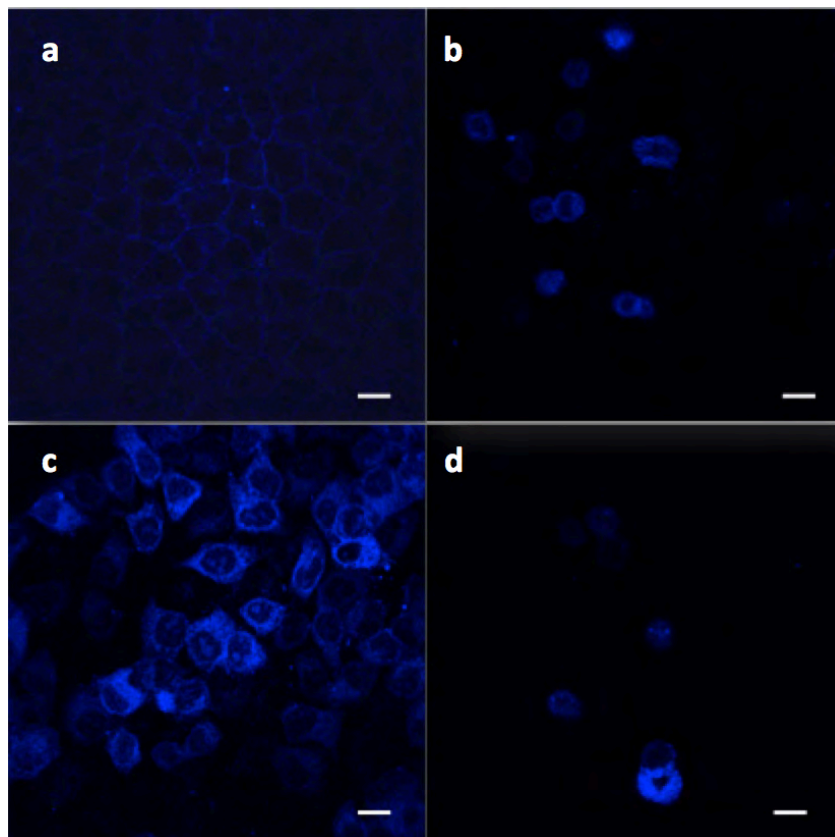


Figura 6. Permeabilidad celular para c-1 ilustrada con imágenes confocales de células HeLa, en incubación con 100 μ M de c-1 durante 30 min (a), 60 min (b), 90 min (c) y 120 min (d). La escala representa 10 μ M.

8.5. Determinación de la estabilidad

Se estudió la estabilidad proteolítica del hit en su forma marcada (c-1) en lisado de células HeLa en un margen de 8 horas. Los cromatogramas a 410 nm muestran ambos picos: c-1 y el fluoróforo ácido 7-(dietilamino) cumarin-3-carboxílico como estándar interno. Se observaron productos de degradación a partir de 30 min.

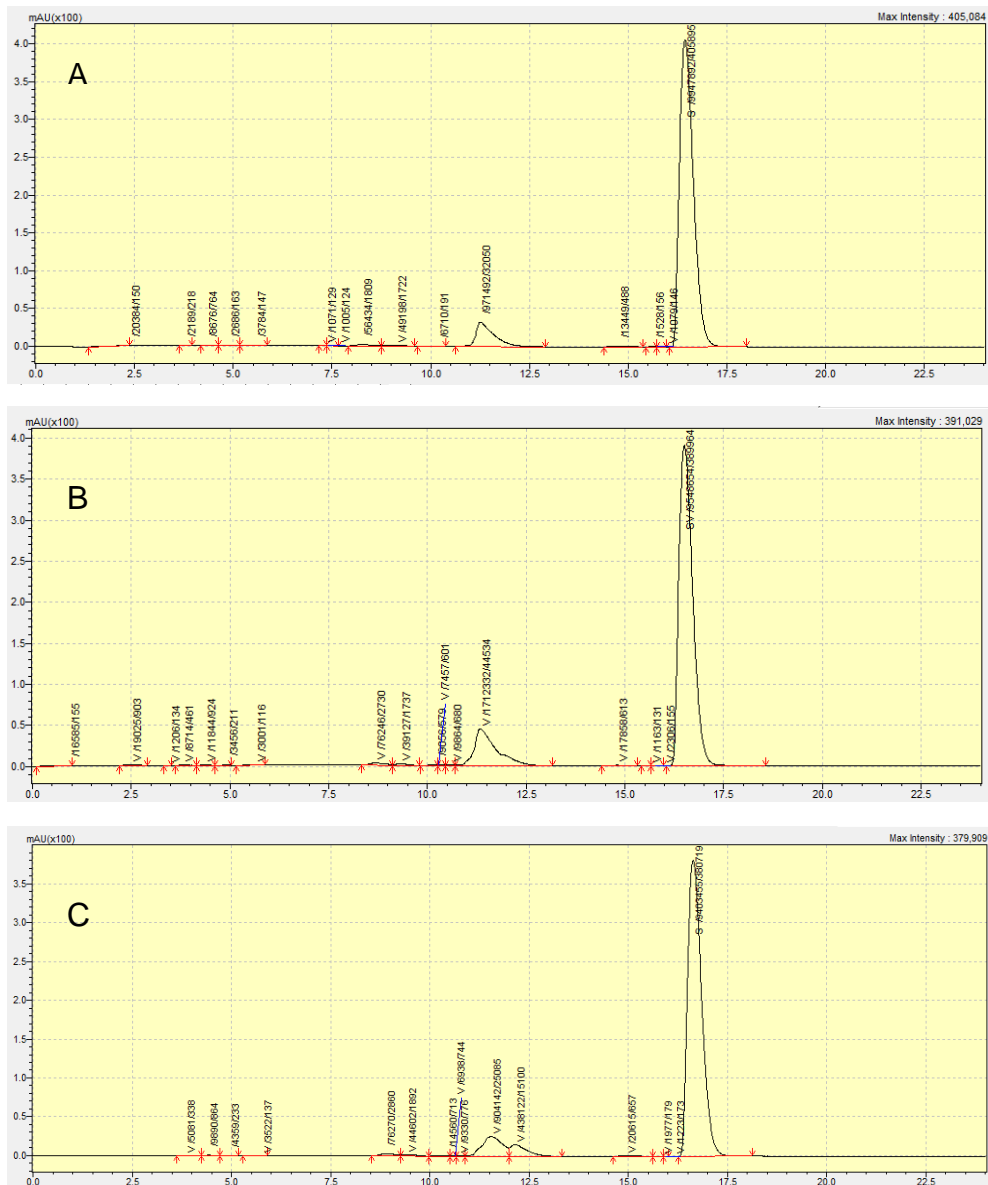


Figura 7.1. Cromatogramas HPLC a 410 nm. Primer pico ($t_R= 11.5$ min) muestra a c-1 y el segundo pico ($t_R= 16.5$ min) a la cumarina posterior a la incubación en lisado celular durante 0 h (A), 0.5 h (B) y 1h (C).

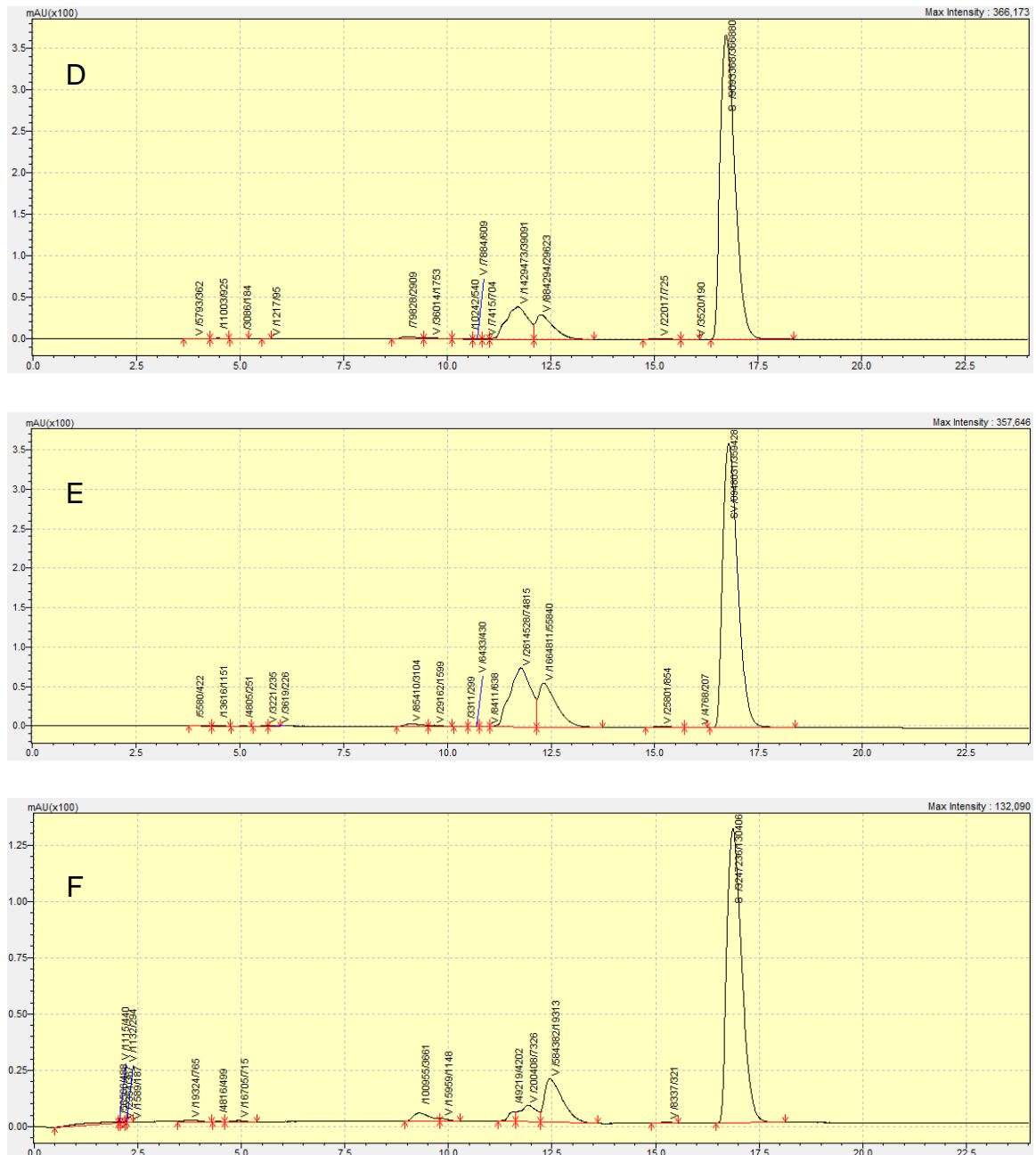


Figura 7.2. Cromatogramas HPLC a 410 nm. Primer pico ($t_R = 11.5$ min) muestra a c-1 y el segundo pico ($t_R = 16.5$ min) a la cumarina posterior a la incubación en lisado celular durante 2 h (D), 4 h (E) y 8 h (F).

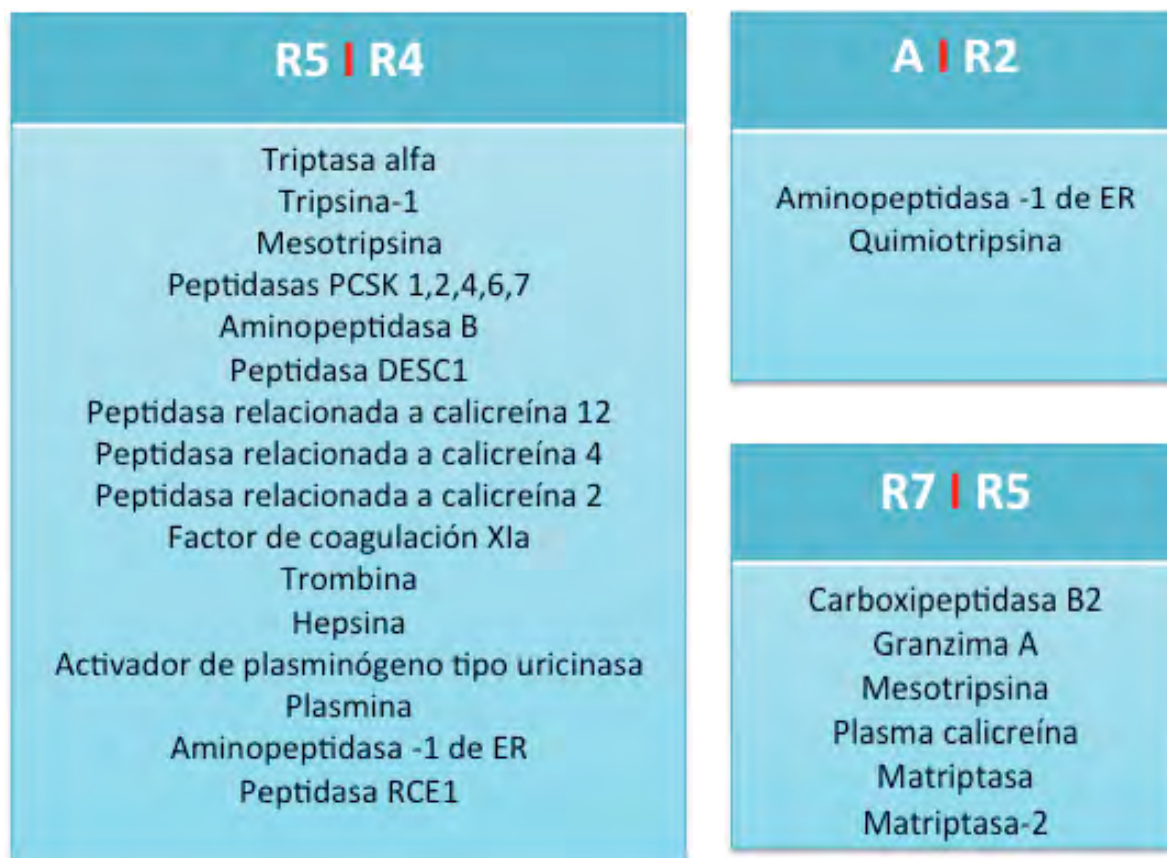


Figura 8. Sitios potenciales de corte por proteasas en el compuesto líder. Bases de datos: ExpASY⁸⁵ Swiss Institute of Bioinformatics y MEROPS⁸⁶ Sanger Institute.

8.6. Evaluación de la activación de PP1 en células

Para reconocer el efecto de la activación de PP1 dentro de la célula, se midió la inducción de corrientes de Ca^{2+} en células no excitables HeLa por medio de Imagen Radiométrica de Ca^{2+} con Fluo-4 como sensor. La adición de algunos peptidomiméticos indujo oscilaciones rápidas de Ca^{2+} (Figuras E, H, K and L), cuya frecuencia aumentó con mayor concentración de compuesto (Figuras E-F)

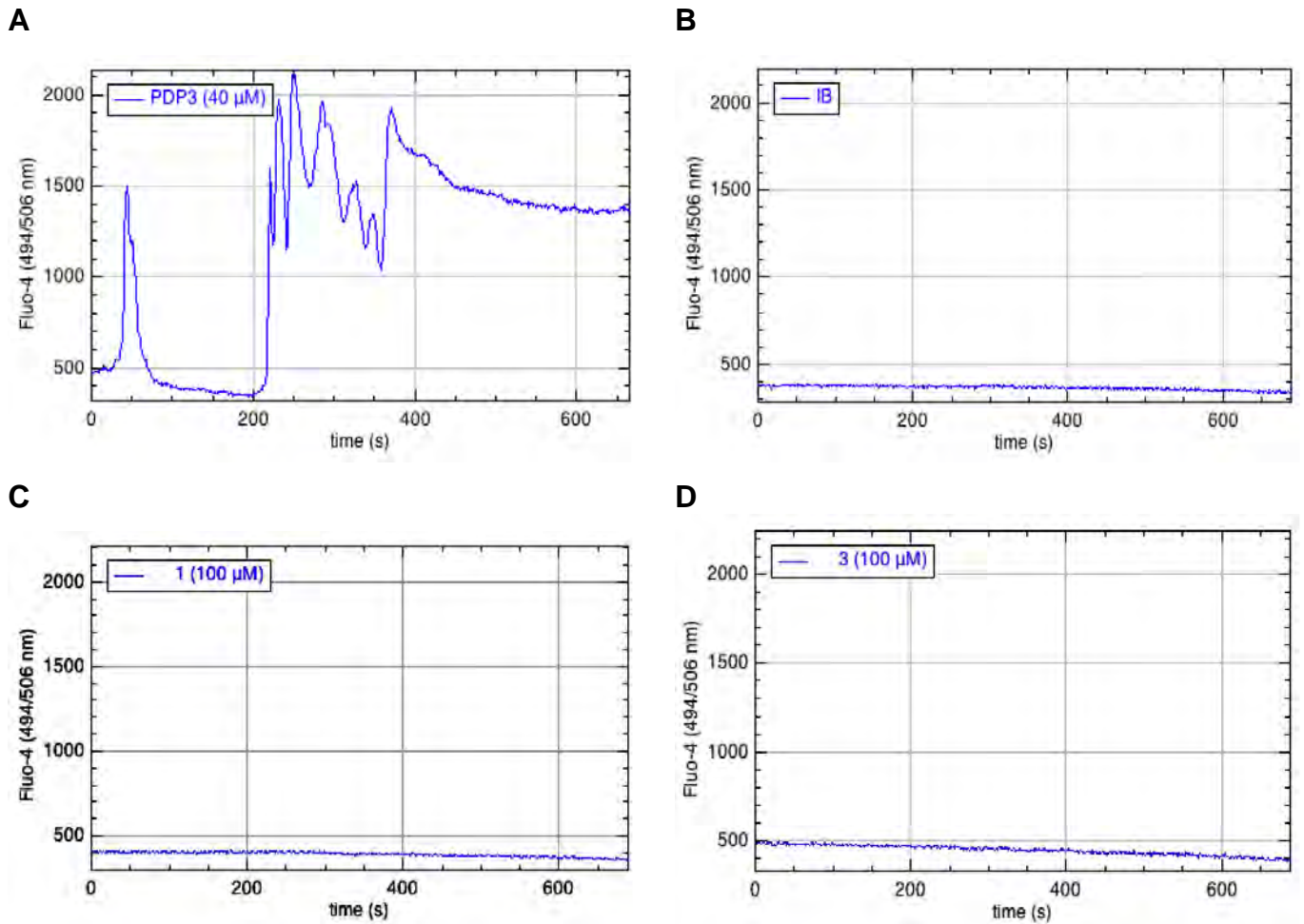


Figura 9.1. Inducción de corrientes de Ca^{2+} en células HeLa con péptidos disruptores de PP1 medida por Imagen radiométrica con Fluo-4. *IB= Buffer de Imagen

- (A) 40 μM **PDP3** (total n= 68 células; 92% respuesta)
- (B) Buffer de imagen (total n= 56 células; 0% respuesta)
- (C) 100 μM **1** (total n= 51 células; 0% respuesta)
- (D) 100 μM **3** (total n= 54 células; 0% respuesta)

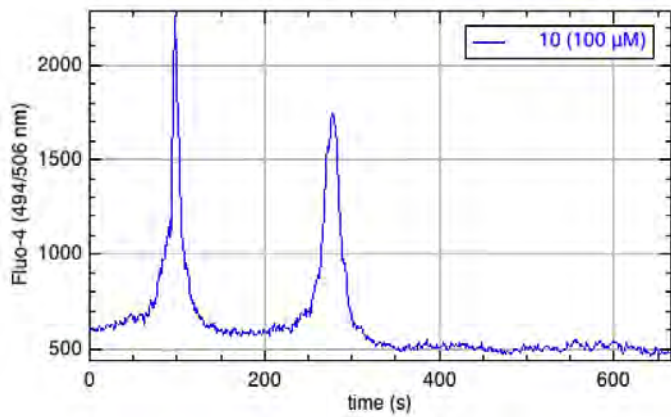
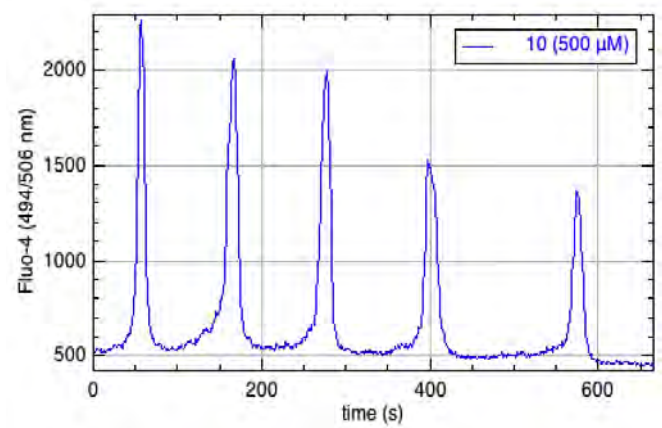
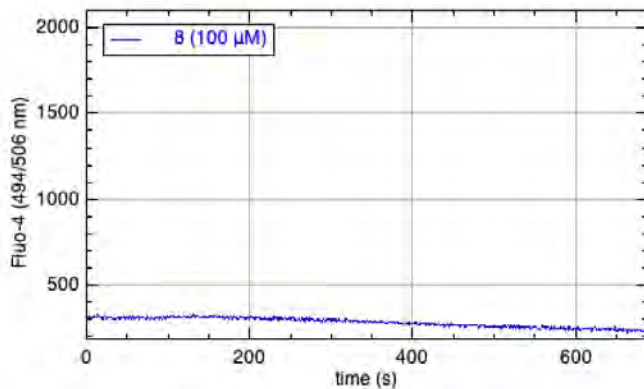
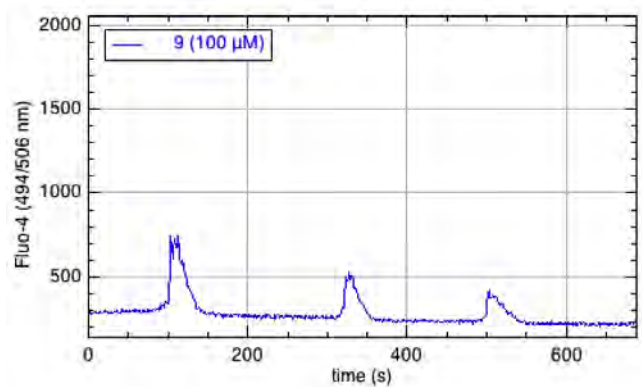
E**F****G****H**

Figure 9.2. Inducción de corrientes de Ca^{2+} en células HeLa con péptidos disruptores de PP1 medida por Imagen radiométrica con Fluo-4.

(E) 100 μM **10** (total n= 48 células; 85% respuesta)

(F) 500 μM **10** (total n= 53 células; 96% respuesta)

(G) 100 μM **8** (total n= 40 células; 0% respuesta)

(H) 100 μM **9** (total n= 49 células; 16% respuesta)

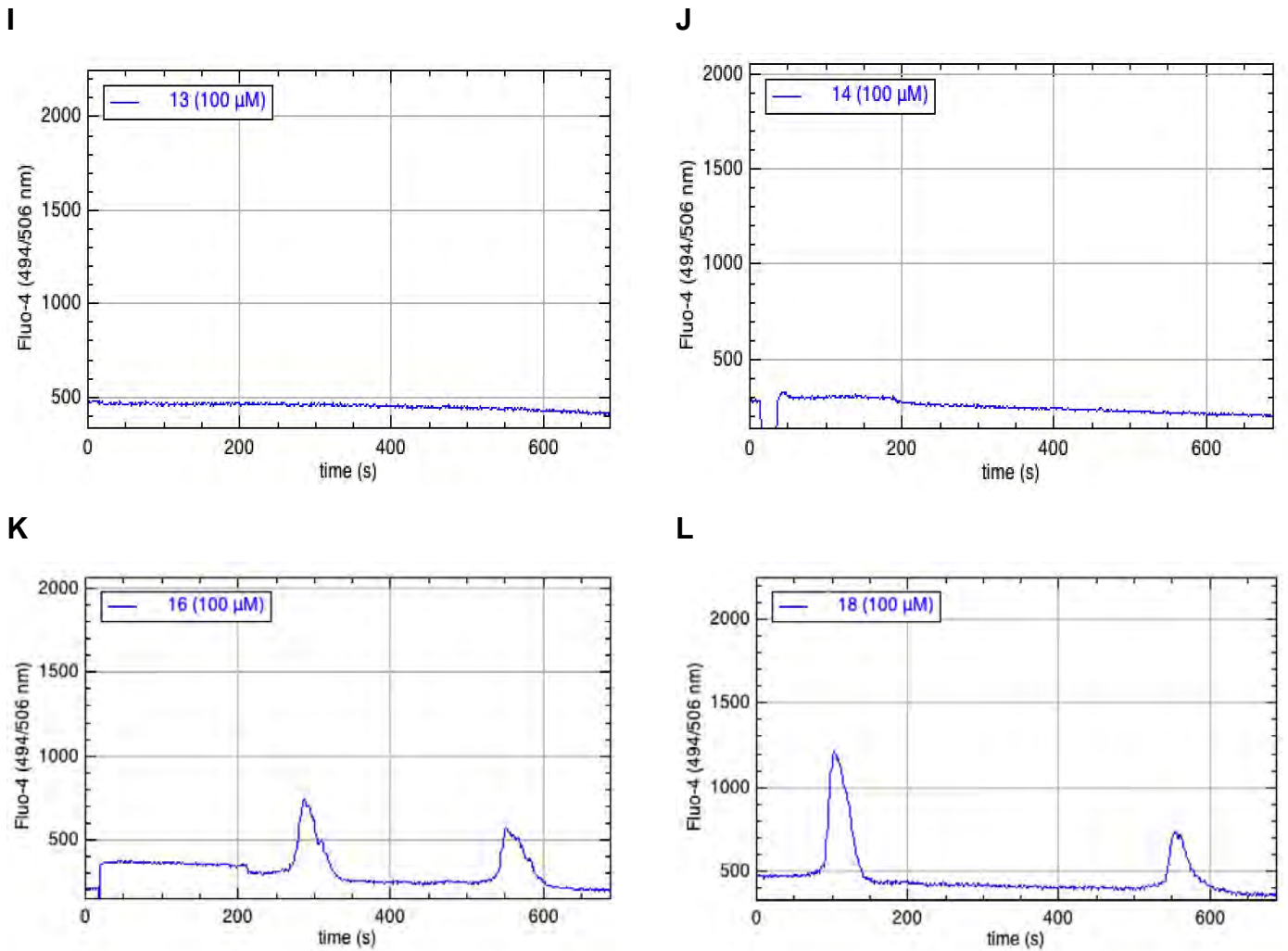


Figure 9.3. Inducción de corrientes de Ca^{2+} en células HeLa con péptidos disruptores de PP1 medida por Imagen radiométrica con Fluo-4.

(I) 100 μM **13** (total n= 47 células; 0% respuesta)

(J) 100 μM **14** (total n= 45 células; 0% respuesta)

(K) 100 μM **16** (total n= 46 células; 30% respuesta)

(L) 100 μM **18** (total n= 42 células; 48% respuesta)

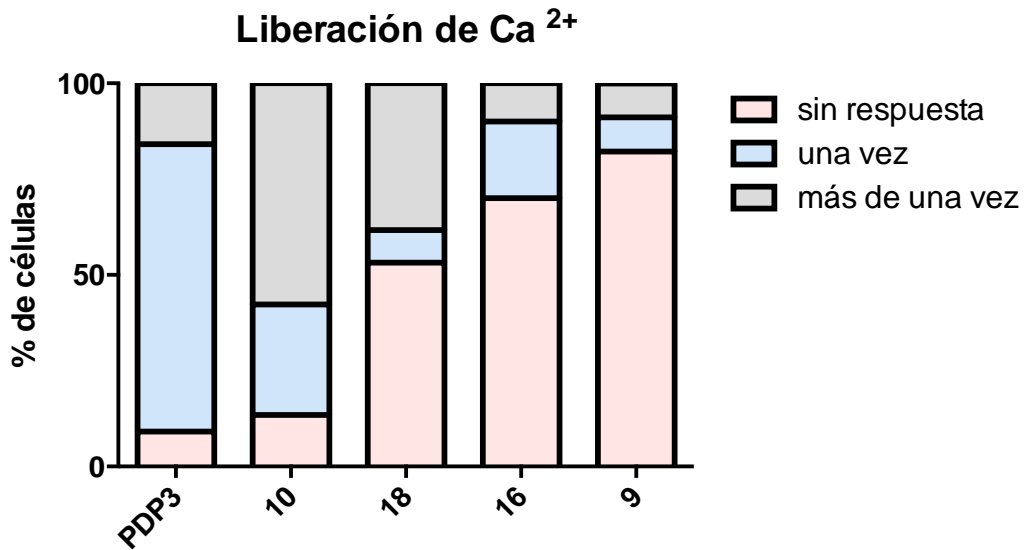
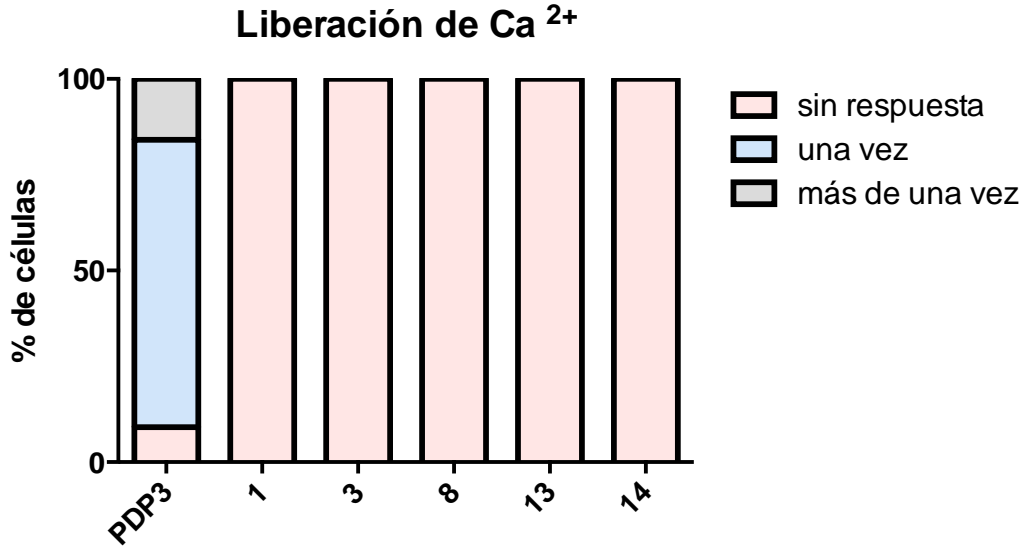


Figura 10. Porcentaje de respuesta en células HeLa. La frecuencia de respuesta guarda relación con la reversibilidad de la activación de PP1: Una vez: activación sostenida (permanente); Más de una vez: activación reversible

9. Discusión

9.1. Cambios en la potencia de activación de PP1

Como punto de partida, se evaluaron modificaciones en los extremos *C*- y *N*-terminales del pentapéptido líder. Se observó que la amidación en *C*-terminus mejoró la potencia al doble, EC_{50} de $0.61 \pm 0.04 \mu\text{M}$ (**1**; Tabla 3 y Figura A2-1) versus $EC_{50}=1.5 \pm 0.6 \mu\text{M}$ del líder. Mientras que la acetilación en el *N*-terminus disminuyó al menos 50% la liberación de PP1 por parte de su inhibidor, $EC_{50}=3.26 \pm 0.54 \mu\text{M}$ (**2**; Tabla 3 y Figura A2-2). Lo anterior se confirma al obtener un valor de EC_{50} intermedio en el compuesto con ambas modificaciones (**3**; Tabla 3 y Figura A2-3).

El *C*-terminus de un péptido es sintetizado como una amida para neutralizar la carga negativa creada por el ácido carboxílico terminal⁶⁴, esto puede contribuir con la estabilidad de puentes de hidrógeno con residuos en el sitio regulatorio de PP1. Por otro lado, la carga positiva en el *N*-terminus, parece tener un papel importante en la afinidad del péptido con una posible región de alta electronegatividad dentro del sitio de unión de PP1. Lo anterior representa una probable explicación del aumento en la potencia de **1** respecto al líder y de la disminución de la misma en **2** y **3**. De acuerdo con estos resultados, una nueva serie de péptidos con amidación en *C*-terminus fueron sintetizados, purificados (Apéndice 1), caracterizados (Tabla 2) y evaluados en su capacidad de activar a PP1 (Tabla 3).

A pesar de que los nuevos análogos no mostraron mayor potencia que el hit (pentapéptido amidado constituido por aminoácidos naturales), los diferentes peptidomiméticos aportan información valiosa sobre las interacciones entre PP1 y un conjunto de modificaciones estructurales en sus activadores, además no debe descartarse una posible mejora significativa en su estabilidad.

Por ejemplo, el reemplazo de un 3-bencilo por 3-ciclohexilo denota la importancia de la aromaticidad en R2, dado que la potencia disminuye alrededor de 50 veces (**4**; Tabla 3). En cambio, la presencia de dos anillos aromáticos fusionados en la misma posición, como en el caso de 3-(2-naftilo) y 3-(1-naftilo), produjo sólo una liberación parcial de PP1 por parte de I2; como se muestra en las curvas de activación (**5** y **6**; Figuras A2-5,6), donde el máximo efecto posible (E_{max}) conocido como parámetro que mide la eficacia⁸⁷, alcanza solamente el 80% de la actividad catalítica inicial de PP1, por ello, **5** y **6** son considerados agonistas parciales. Aunado a que la reproducibilidad fue problemática, particularmente para estos compuestos, el ensayo se realizó al menos 5 veces; lo que podría traducirse a fallas en la unión con PP1 por impedimento estérico.

Otra modificación estudiada fue la *N*-metilación en R3 y R6. Curiosamente, esta modificación afecta la potencia de formas diferentes dependiendo el residuo. Cabe mencionar que la *N*-metilación incrementa el impedimento estérico sobre el enlace peptídico *N*-metilado, favoreciendo un equilibrio *cis-trans* sobre este enlace⁷⁹. Sumado a que las interacciones estéricas entre el grupo *N*-metilo y las cadenas laterales del aminoácido determinan la conformación del péptido, afectando no sólo la conformación del residuo modificado, sino también la de los residuos adyacentes. Por otro lado, al removerse la capacidad de formación de puentes de hidrógeno con una *N*-metilación, se rompen elementos estructurales que estabilizan estructuras secundarias, es decir, puentes de hidrógeno intermoleculares⁷⁹, un efecto particularmente pronunciado en péptidos más grandes, sin embargo, para péptidos más pequeños, en los cuales los puentes de hidrógeno intramoleculares no determinan significativamente la conformación, la *N*-metilación modula la conformación, principalmente por efectos estéricos.

Es difícil generalizar la importancia de estos efectos, dado que dependen de la secuencia en particular y la quiralidad. En el caso de R3, la *N*-metilación puede alterar, principalmente por efectos estéricos, interacciones tipo puente de hidrógeno del carbonilo vecino con residuos en PP1; lo que explicaría el cambio

de $EC_{50} = 0.61 \pm 0.04 \mu\text{M}$ (**1**) a $23.5 \pm 0.7 \mu\text{M}$ (**7**, Tabla 3). Mientras que el cambio en la potencia es más sutil en R6: EC_{50} de $4.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$ (**9**, Tabla 3), lo que puede atribuirse a menos restricciones estéricas con PP1.

En otras publicaciones se ha demostrado que pequeños cambios estructurales en las cadenas laterales, tales como el reemplazo de un isopropilo por un ciclopropilo, modifican la actividad en varios análogos peptídicos⁸⁸. A pesar de que esta modificación no favoreció la potencia, podría presentar mayor estabilidad en el sitio de corte R5 | R4, ante la acción de proteasas.

Una estrategia diferente para mejorar la estabilidad del líder, fue la incorporación de un carbono extra, entre el carboxilo y el amino de un único residuo, especialmente en el carbono α (homo aminoácidos), así como el cambio del grupo amino del carbono α al carbono β (beta aminoácidos) y la combinación de ambas modificaciones (homo-beta aminoácidos) en R5 o R7.

Quizás el resultado más contrastante sea la adición de homo y homo-beta aminoácidos en R5, ya que la potencia cambia drásticamente de $1.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$ (**10**; Tabla 3) a $203.5 \pm 1.9 \mu\text{M}$ (**11**; Tabla 3), respectivamente. A pesar de que la elongación del eje peptídico por un carbono ($-\text{CH}_2$) está presente en ambos péptidos, en el beta péptido los sustituyentes voluminosos unidos a los carbonos α y β exhiben una alta libertad rotacional, haciéndolos mucho más flexibles y termodinámicamente estables⁸³, con la tendencia de formar estructuras secundarias, que se han reportado en tetrapéptidos y polipéptidos más grandes⁸⁹⁻⁹¹.

En términos químicos, los sustituyentes alquilo en ambas posiciones (α y β) en el caso de un homo-beta péptido, favorecen una conformación gauche, donde los carbonos α y β quedan separados por un ángulo de torsión de 60° ⁹²⁻⁹⁴, lo cual puede influenciar la formación de estructuras secundarias de menor afinidad con el motivo RVxF en PP1. Siendo una explicación interesante a la pronunciada diferencia en la potencia entre **10** y **11**.

No obstante, este efecto no parece ser significativo para los peptidomiméticos en R7, donde la extensión del esqueleto peptídico con homo / beta aminoácidos no modificó de manera importante la EC₅₀ (**14,15,17** y **18**; Tabla 3), junto con el acortamiento del esqueleto peptídico (**16**; Tabla 3) comprobándose que la longitud en R7 es un parámetro relativamente flexible que no altera significativamente la potencia. A su vez, el cambio de configuración en R7, pese a que dicho enantiómero presentó una potencia relativamente menor al líder (**13**; Table 3), este D-aminoácido podría dificultar el reconocimiento por proteasas.

Una última modificación fue la sustitución en R5 del grupo guanidino por un heterociclo como el imidazol que contiene dos nitrógenos y cuando uno de ellos es protonado, es estabilizado por resonancia por el segundo (similar al guanidino, excepto que se reparte la carga con 3 átomos de nitrógeno). En algunas ocasiones se han descrito a estos grupos como bioisósteres⁹⁵, sin embargo, esta sustitución afectó negativamente la potencia del líder (**12**; Tabla 3), probablemente debido al acortamiento de la cadena lateral que dificulta la interacción con PP1.

9.2. Estudio de la permeabilidad celular para el péptido hit

Después de evaluar la actividad de los diferentes análogos, el activador de PP1 más potente se acopló con un espaciador tipo PEG en *N*-terminus y a ácido 7-(dietilamino) cumarin-3- carboxílico como fluoróforo (Figura 5).

Con el propósito de determinar la capacidad del hit para penetrar la membrana celular, se incubó en células HeLa 100 µM del péptido marcado (**c-1**). A los 30 min (Figura 6A) no se observó fluorescencia al interior de las células, pasados 60 min (Figura 6B) algunas células mostraron fluorescencia por internalización del compuesto. A los 90 min (Figura 6C), cerca del 80% de las células lograron visualizarse a la longitud de onda de la cumarina, demostrando que el compuesto si penetra la membrana celular. Finalmente a los 120 min (Figura 6D)

se observaron muy pocas células a esa longitud de onda, existen dos posibles razones: primera, degradación del compuesto dentro de la célula que genere productos no fluorescentes; segunda, inducción de la apoptosis considerando la alta concentración evaluada por un tiempo prolongado

Adicionalmente, se evaluaron 50 μM (Figura. A3-1) y 25 μM (Figura. A3-2) de **c-1**, después de la incubarse durante 90 min y 120 min (se muestra para 90 min), sin evidencia de muerte celular. Como control, se probó 50 μM de fluoróforo durante los mismos tiempos de incubación (30,60,90 y 120 min), sin observarse internalización celular (Figura. A3-4 para 90 min).

9.3. Influencia de la estabilidad en la activación de PP1 *in vitro*

Una vez establecida la activación de PP1 en ensayos enzimáticos y la permeabilidad celular para el nuevo hit. Se procedió a investigar su actividad en ensayos funcionales en células. Se ha reportado previamente que la activación selectiva de PP1 por sus péptidos disruptores causa oscilaciones de Ca^{2+} *in vitro* originadas del retículo endoplasmático (ER)^{2,57}. Por lo tanto, se usó imagen radiométrica de Ca^{2+} con Fluo-4 para evaluar el efecto del hit en células HeLa.

Lamentablemente, no se observaron oscilaciones de Ca^{2+} después de probar **1** (Figura 9.1C) y **3** (Figura 9.1D), este último comparte la acetilación N-terminal con la forma marcada **c-1**. Las mediciones se compararon con PDP3 como control positivo (Figura 9.1A) y buffer de imagen como control negativo (Figura 9.1B) y grabadas durante media hora, contemplando los primeros 10 min de respuesta.

Para dar respuesta a los resultados negativos del hit dentro de las células, se determinó la estabilidad de **c-1** en lisado de células HeLa, durante un margen de tiempo de 8 horas, mismo que abarca las condiciones del ensayo celular (Figuras 8.1 y 8.2).

Los resultados mostraron que el péptido no es estable, picos de productos de degradación se observan a 410 nm a partir de 30 min de incubación en lisado celular (Figura 8.1. B).

9.4. Activación intracelular de PP1 inducida por peptidomiméticos

Como último paso, se estudió la actividad en células de los análogos no naturales más potentes. Se evaluaron siete candidatos (Figuras 8.2 y 8.3 E-L). Una vez adicionados, cuatro de ellos originaron oscilaciones de Ca^{2+} : **9**, **10**, **16** y **18**. Este efecto es resultado de la actividad catalítica de PP1 y actúa dependiente a la dosis, dado que la frecuencia de las oscilaciones aumenta proporcionalmente a la concentración de péptido (**10**, Figuras E-F). Esta activación es reversible en comparación con PDP3, el cual genera elevadas y permanentes oscilaciones ² (Figura 10).

En este contexto, queda comprobado que dos agonistas pueden tener la misma potencia, por ejemplo **3** vs **10** (EC_{50} ; Tabla 3), pero su estabilidad proteolítica puede alterar su eficacia, es decir, su capacidad de producir un efecto. Esto confirma, una vez más, la importancia de la bioestabilidad de algunos péptidos para activar PP1 dentro de la célula. Particularmente, para el residuo en R5, que contiene la mayor cantidad de sitios de corte por proteasas de la secuencia (Figura 8). El diseño de peptidomiméticos, especialmente en esta posición generó análogos más estables, capaces de activar a PP1 *in vitro*. Estos hallazgos reflejan la importancia de las modificaciones química en biomoléculas naturales, con el objetivo de mejorar sus propiedades farmacológicas.

10. Conclusiones

La incorporación de modificaciones químicas terminales a un compuesto líder, particularmente la amidación en *N*-terminus, generó un péptido disruptor significativamente más potente para la activación de PP1. A pesar de ser penetrar membrana celular, este hit no fue proteolíticamente estable y por consiguiente, incapaz de activar a PP1 al interior de la célula.

Incluso cuando la serie de peptidomiméticos no fue más potente que el hit para activar a PP1, algunos de estos compuestos fueron capaces de inducir corrientes reversibles de Ca^{2+} en células, lo que sugiere la importancia de la estabilidad de un péptido para ser biológicamente útil.

En resumen, la síntesis de péptidos con modificaciones químicas en los extremos terminales y por el intercambio de aminoácidos naturales por no naturales, permitió el desarrollo de peptidos disruptores selectivos, estables y capaces de activar a PP1 al interior celular. Estos compuestos pueden utilizarse como herramientas químicas para el estudio de los procesos celulares afectados en los que PP1 esta implicada, asi como su uso como cabezas de serie para el diseño de activadores más potentes.

Finalmente, estos resultados comprueban el concepto de que es posible preparar moléculas peptídicas sintéticas que imiten a proteínas nativas, siendo mucho más simples y mejor definidas.

11. Referencias

- (1) Khoury, G. A.; Baliban, R. C.; Floudas, C. A. *Sci. Rep.* **2011**, *1*, 90.
- (2) Reither, G.; Chatterjee, J.; Beullens, M.; Bollen, M.; Schultz, C.; Köhn, M. *Chem. Biol.* **2013**, *20* (9), 1179–1186.
- (3) Mcconnell, J. L.; Wadzinski, B. E. *Mol Pharm* **2009**, *75* (6), 1249–1261.
- (4) Wang, Y.-C.; Peterson, S. E.; Loring, J. F. *Cell Res* **2014**, *24* (2), 143–160.
- (5) Suryadinata, R.; Sadowski, M.; Sarcevic, B. *Biosci. Rep.* **2010**, *30* (4), 243–255.
- (6) Shi, Y. *Cell* **2009**, *139* (3), 468–484.
- (7) Deribe, Y. L.; Pawson, T.; Dikic, I. *Nat Struct Mol Biol* **2010**, *17* (6), 666–672.
- (8) Xu, C.; Kim, N.-G.; Gumbiner, B. M. *Cell Cycle* **2009**, *8* (24), 4032–4039.
- (9) Mitra, S. K.; Hanson, D. A.; Schlaepfer, D. D. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**, *6* (1), 56–68.
- (10) Ruvolo, P. P.; Deng, X.; May, W. S. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K* **2001**, *15*, 515–522.
- (11) Barford, D.; Das, A. K.; Egloff, M.-P. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27* (1), 133–164.
- (12) Ubersax, J. A.; Ferrell Jr, J. E. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8* (7), 530–541.
- (13) Chatterjee, J.; Beullens, M.; Sukackaite, R.; Qian, J.; Lesage, B.; Hart, D. J.; Bollen, M.; Köhn, M. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51* (40), 10054–10059.
- (14) Cohen, P. *Nat Cell Biol* **2002**, *4* (5), E127–E130.
- (15) Olsen, J. V.; Blagoev, B.; Gnad, F.; Macek, B.; Kumar, C.; Mortensen, P.; Mann, M. *Cell* **2016**, *127* (3), 635–648.
- (16) De La Fuente Van Bentem, S.; Mentzen, W. I.; De La Fuente, A.; Hirt, H. *Proteomics* **2008**, *8* (21), 4453–4465.
- (17) Brautigan, D. L. *FEBS J.* **2013**, *280* (2), 324–325.
- (18) Shi, Y. *Cell* **2009**, *139* (3), 468–484.
- (19) Parameswara, V. K.; Sule, A. J.; Esser, V. *J. Pancreas* **2005**, *6* (4), 303–315.

- (20) Fiedler, B.; Wollert, K. C. *Expert Opin. Ther. Targets* **2005**, *9* (5), 963–973.
- (21) Arroyo, J. D.; Hahn, W. C. *Oncogene* **24** (52), 7746–7755.
- (22) Stebbing, J.; Lit, L. C.; Zhang, H.; Darrington, R. S.; Melaiu, O.; Rudraraju, B.; Giamas, G. *Oncogene* **2014**, *33* (8), 939–953.
- (23) Tian, Q.; Wang, J. *Neurosignals* **2002**, *11* (5), 262–269.
- (24) Wang, Y.; Köhn, M. In *Concepts and Case Studies in Chemical Biology*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014; pp 51–62.
- (25) Golden, R. E. H. and T. *Curr. Med. Chem.* 2002, pp 2055–2075.
- (26) Swingle, M. R.; Honkanen, R. E.; Ciszak, E. M. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (32), 33992–33999.
- (27) Janssens, V.; Goris, J. *Biochem. J.* **2001**, *353* (Pt 3), 417–439.
- (28) Schweighofer, A.; Hirt, H.; Meskiene, I. *Trends Plant Sci.* **2016**, *9* (5), 236–243.
- (29) Bollen, M.; Peti, W.; Ragusa, M. J.; Beullens, M. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35* (8), 450–458.
- (30) Heroes, E.; Lesage, B.; Görnemann, J.; Beullens, M.; Van Meervelt, L.; Bollen, M. *FEBS J.* **2013**, *280* (2), 584–595.
- (31) Wu, J. Q.; Guo, J. Y.; Tang, W.; Yang, C.-S.; Freel, C. D.; Chen, C.; Nairn, A. C.; Kornbluth, S. *Nat Cell Biol* **2009**, *11* (5), 644–651.
- (32) Aoyama, H.; Ikeda, Y.; Miyazaki, Y.; Yoshimura, K.; Nishino, S.; Yamamoto, T.; Yano, M.; Inui, M.; Aoki, H.; Matsuzaki, M. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *89* (1), 79–88.
- (33) Ciurciu, A.; Duncalf, L.; Jonchere, V.; Lansdale, N.; Vasieva, O.; Glenday, P.; Rudenko, A.; Vissi, E.; Cobbe, N.; Alphey, L.; Bennett, D. *PLoS Genet* **2013**, *9* (10), e1003885.
- (34) Ceulemans, H.; Bollen, M. *Physiol. Rev.* **2004**, *84* (1), 1–39.
- (35) Wang, R. H.; Liu, C. W.; Avramis, V. I.; Berndt, N. *Oncogene* **2001**, *20* (43), 6111–6122.
- (36) Virshup, D. M.; Shenolikar, S. *Mol. Cell* **2016**, *33* (5), 537–545.
- (37) Chatterjee, J.; Köhn, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17* (3), 361–368.
- (38) Hendrickx, A.; Beullens, M.; Ceulemans, H.; Den Abt, T.; Van Eynde, A.;

- Nicolaescu, E.; Lesage, B.; Bollen, M. *Chem. Biol.* **2009**, *16* (4), 365–371.
- (39) Fardilha, M.; Esteves, S. L. C.; Korrodi-Gregorio, L.; Silva, O. A. B. da C. e S. and E. F. da C. e. *Curr. Med. Chem.* 2010, pp 3996–4017.
- (40) Cougot, D.; Allemand, E.; Rivière, L.; Benhenda, S.; Duroure, K.; Levillayer, F.; Muchardt, C.; Buendia, M.-A.; Neuveut, C. *Sci. Signal.* **2012**, *5* (205), ra1–ra1.
- (41) Ammosova, T.; Yedavalli, V. R. K.; Niu, X.; Jerebtsova, M.; Van Eynde, A.; Beullens, M.; Bollen, M.; Jeang, K.-T.; Nekhai, S. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (5), 3798–3804.
- (42) Kuehnen, P.; Laubner, K.; Raile, K.; Schofl, C.; Jakob, F.; Pilz, I.; Path, G.; Seufert, J. *Endocrinology* **2011**, *152* (5), 1800–1808.
- (43) Pathak, A.; del Monte, F.; Zhao, W.; Schultz, J.-E.; Lorenz, J. N.; Bodi, I.; Weiser, D.; Hahn, H.; Carr, A. N.; Syed, F.; Mavila, N.; Jha, L.; Qian, J.; Marreez, Y.; Chen, G.; McGraw, D. W.; Heist, E. K.; Guerrero, J. L.; DePaoli-Roach, A. A.; Hajjar, R. J.; Kranias, E. G. *Circ. Res.* **2005**, *96* (7), 756–766.
- (44) Li, L.; Ren, C. H.; Tahir, S. A.; Ren, C.; Thompson, T. C. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23* (24), 9389–9404.
- (45) Chen, S.; Kesler, C. T.; Paschal, B. M.; Balk, S. P. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (38), 25576–25584.
- (46) Li, C.; Liang, Y.-Y.; Feng, X.-H.; Tsai, S. Y.; Tsai, M.-J.; O'Malley, B. W. *Mol. Cell* **2008**, *31* (6), 835–849.
- (47) Anzick, S. L.; Kononen, J.; Walker, R. L.; Azorsa, D. O.; Tanner, M. M.; Guan, X.-Y.; Sauter, G.; Kallioniemi, O.-P.; Trent, J. M.; Meltzer, P. S. *Science* (80-.). **1997**, *277* (5328), 965–968.
- (48) Martin-Granados, C.; Prescott, A. R.; Van Dessel, N.; Van Eynde, A.; Arocena, M.; Klaska, I. P.; Görnemann, J.; Beullens, M.; Bollen, M.; Forrester, J. V.; McCaig, C. D. *PLoS One* **2012**, *7* (7), e40769.
- (49) Brems-Eskildsen, A. S.; Zieger, K.; Toldbod, H.; Holcomb, C.; Higuchi, R.; Mansilla, F.; Munksgaard, P. P.; Borre, M.; Ørntoft, T. F.; Dyrskjøt, L. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 646.

- (50) Kim, W.; Youn, H.; Kang, C.; Youn, B. *Apoptosis* **2015**, *20* (9), 1242–1252.
- (51) Ivanov, A. A.; Khuri, F. R.; Fu, H. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34* (7), 393–400.
- (52) Cho, U. S.; Xu, W. *Nature* **2007**, *445* (7123), 53–57.
- (53) Swingle, M.; Ni, L.; Honkanen, R. E. *Methods Mol. Biol.* **2007**, *365*, 23–38.
- (54) Zorn, J. A.; Wells, J. A. *Nat Chem Biol* **2010**, *6* (3), 179–188.
- (55) Tsaytler, P.; Bertolotti, A. *FEBS J.* **2013**, *280* (2), 766–770.
- (56) Avan, I.; Hall, C. D.; Katritzky, A. R. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (10), 3575–3594.
- (57) Bezprozvanny, I. *Cell Calcium* **2005**, *38* (3–4), 261–272.
- (58) Kelly, A. E.; Ghenoiu, C.; Xue, J. Z.; Zierhut, C.; Kimura, H.; Funabiki, H. *Science* **2010**, *330* (6001), 235–239.
- (59) Higgins, J. M. G. *Protein Sci.* **2001**, *10* (8), 1677–1684.
- (60) Carmena, M.; Ruchaud, S.; Earnshaw, W. C. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21* (6), 796–805.
- (61) Huertas, D.; Soler, M.; Moreto, J.; Villanueva, A.; Martinez, A.; Vidal, A.; Charlton, M.; Moffat, D.; Patel, S.; McDermott, J.; Owen, J.; Brotherton, D.; Krige, D.; Cuthill, S.; Esteller, M. *Oncogene* **2012**, *31* (11), 1408–1418.
- (62) Kollareddy, M.; Zheleva, D.; Dzubak, P.; Brahmikshatriya, P. S.; Lepsik, M.; Hajduch, M. *Invest. New Drugs* **2012**, *30* (6), 2411–2432.
- (63) Copeland, R. A.; Olhava, E. J.; Scott, M. P. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14* (4), 505–510.
- (64) Kim, K.-H.; Seong, B. L. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2001**, *6* (4), 244–251.
- (65) Arnesen, T. *PLoS Biol.* **2011**, *9* (5).
- (66) da Silva, A. V. R.; De Souza, B. M.; dos Santos Cabrera, M. P.; Dias, N. B.; Gomes, P. C.; Neto, J. R.; Stabeli, R. G.; Palma, M. S. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2014**, *1838* (10), 2357–2368.
- (67) Kim, J.-Y.; Park, S.-C.; Yoon, M.-Y.; Hahm, K.-S.; Park, Y. *Amino Acids* **2011**, *40* (1), 183–195.
- (68) Coy, D. H.; Murphy, W. A.; Lance, V. A.; Heiman, M. L. *J. Med. Chem.* **1987**, *30* (1), 219–222.

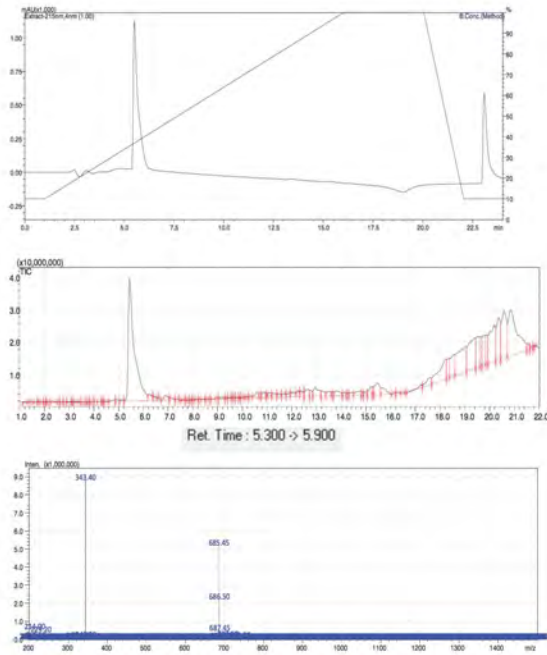
- (69) Wang, G. *Curr. Biotechnol.* **2012**, 1 (1), 72–79.
- (70) Marino, G.; Eckhard, U.; Overall, C. M. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10 (8), 1754–1764.
- (71) Hwang, C.-S.; Shemorry, A.; Varshavsky, A. *Science (80-.)*. **2010**, 327 (5968), 973–977.
- (72) Bak, A.; Leung, D.; Barrett, S. E.; Forster, S.; Minnihhan, E. C.; Leithead, A. W.; Cunningham, J.; Toussaint, N.; Crocker, L. S. *AAPS J.* **2015**, 17 (1), 144–155.
- (73) Antosova, Z.; Mackova, M.; Kral, V.; Macek, T. *Trends Biotechnol.* **2016**, 27 (11), 628–635.
- (74) Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatisky, M. *Drug Discov. Today* **2010**, 15 (1–2), 40–56.
- (75) Grauer, A.; König, B. *European J. Org. Chem.* **2009**, 2009 (30), 5099–5111.
- (76) Groß, A.; Hashimoto, C.; Sticht, H.; Eichler, J. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* . 2016.
- (77) White, C. J.; Yudin, A. K. *Nat Chem* **2011**, 3 (7), 509–524.
- (78) Li, X.; Wu, Y.-D.; Yang, D. *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41 (10), 1428–1438.
- (79) Chatterjee, J.; Rechenmacher, F.; Kessler, H. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, 52 (1), 254–269.
- (80) Frackenpohl, J.; Arvidsson, P. I.; Schreiber, J. V; Seebach, D. *ChemBioChem* **2001**, 2 (6), 445–455.
- (81) Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. *Chem. Rev.* **2001**, 101 (10), 3219–3232.
- (82) *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, 206 (2), 458–462.
- (83) Kant, R.; Pasi, S.; Surolia, A. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 8205.
- (84) Wakula, P.; Beullens, M.; Ceulemans, H.; Stalmans, W.; Bollen, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (21), 18817–18823.
- (85) Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. Walker, J. M., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2005; pp 571–607.

- (86) Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Finn, R. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (D1), D343–D350.
- (87) Strange, P. G. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153* (7), 1353–1363.
- (88) Karatas, H.; Townsend, E. C.; Cao, F.; Chen, Y.; Bernard, D.; Liu, L.; Lei, M.; Dou, Y.; Wang, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (2), 669–682.
- (89) Kumar, N.; Kishore, R. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16* (9), 456–464.
- (90) Mechler, R. S. S. and M. G. H. and D. J. D. W. and C. G. A. and M. D. B. and M.-I. A. and P. P. and A. *Nanotechnology* **2016**, *27* (13), 135606.
- (91) Wu, Y.-D.; Han, W.; Wang, D.-P.; Gao, Y.; Zhao, Y.-L. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (10), 1418–1427.
- (92) Vasudev, P. G.; Rai, R.; Shamala, N.; Balaram, P. *Pept. Sci.* **2008**, *90* (2), 138–150.
- (93) Kumar Thakur, A.; Venugopalan, P.; Kishore, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *273* (2), 492–498.
- (94) Chatterjee, S.; Roy, R. S.; Balaram, P. *J. R. Soc. Interface* **2007**, *4* (15), 587–606.
- (95) Ahmad, S.; Ngu, K.; Combs, D. W.; Wu, S. C.; Weinstein, D. S.; Liu, W.; Chen, B.-C.; Chandrasena, G.; Dorso, C. R.; Kirby, M.; Atwal, K. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (1), 177–180.

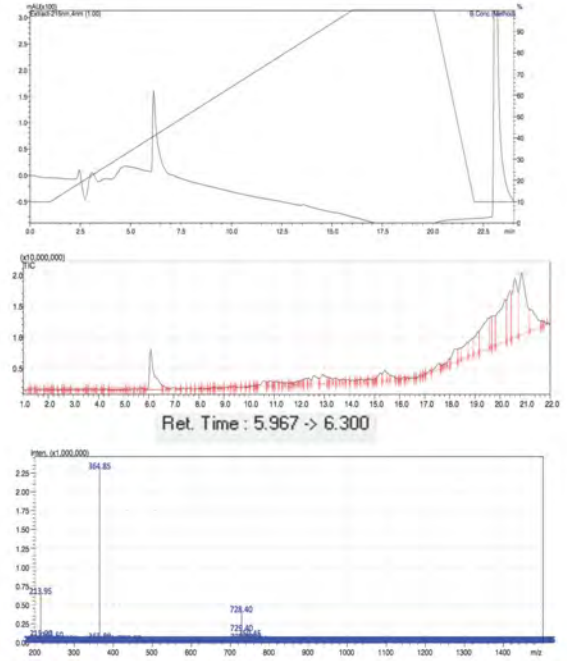
APÉNDICE 1

Cromatogramas HPLC/MS de los péptidos puros.

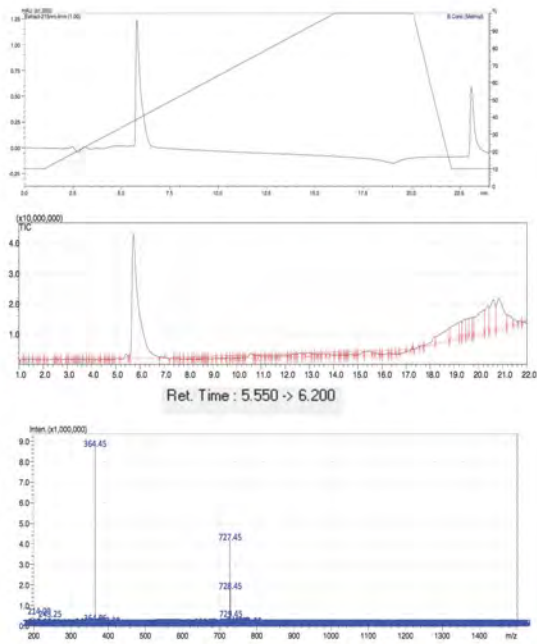
1



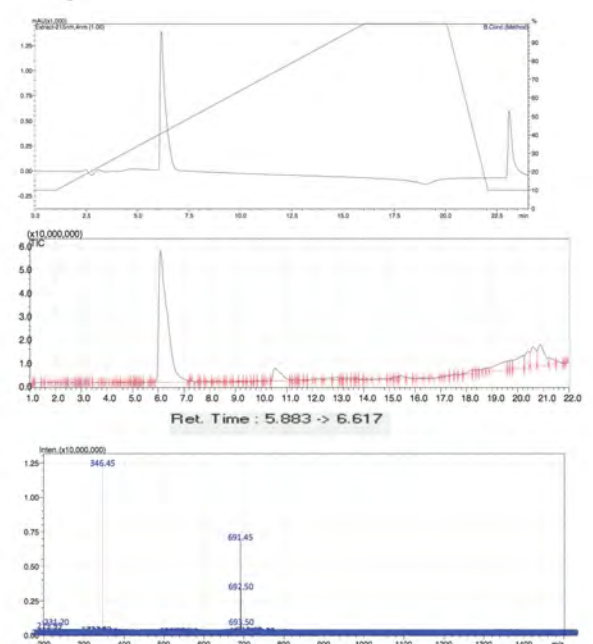
2



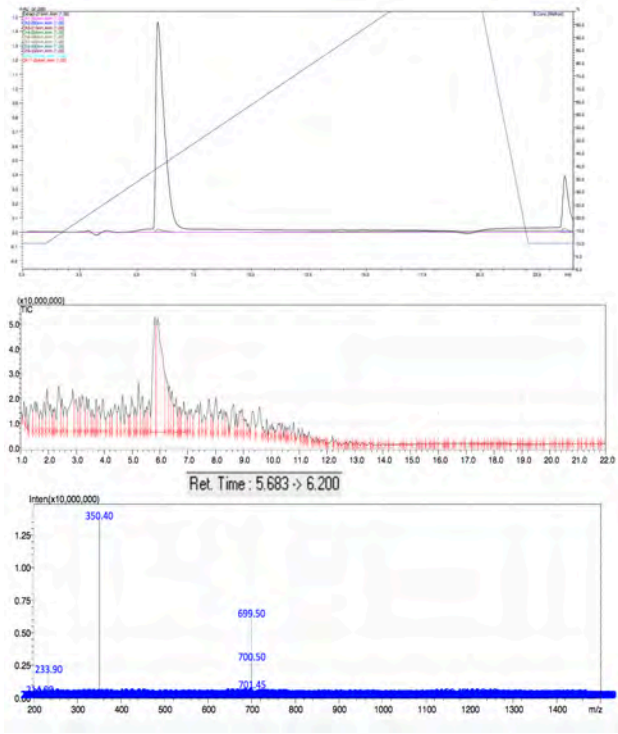
3



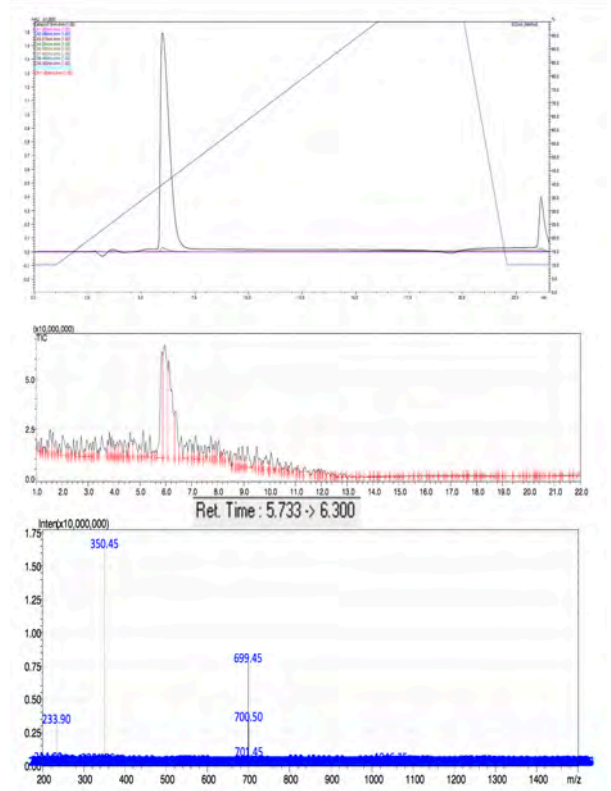
4



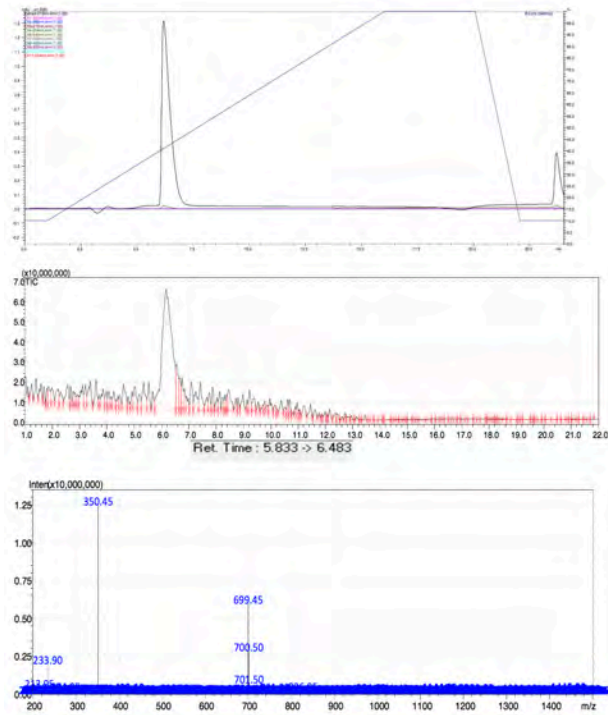
9



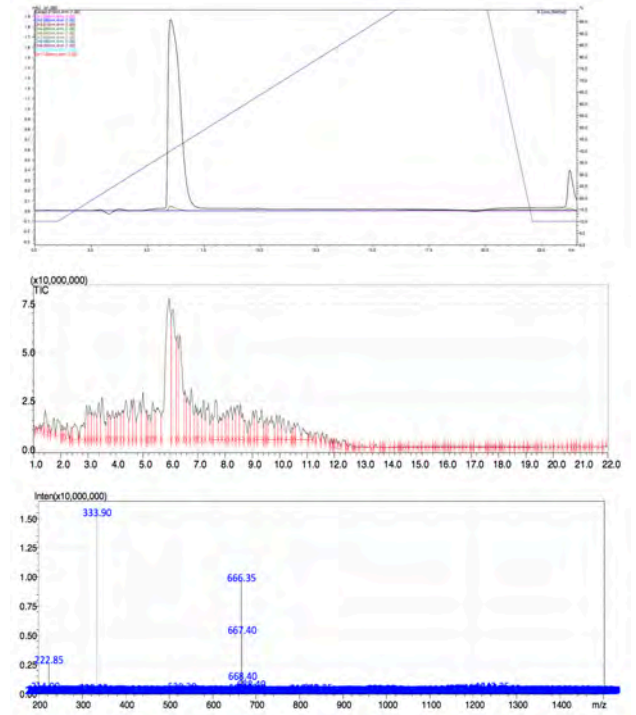
10



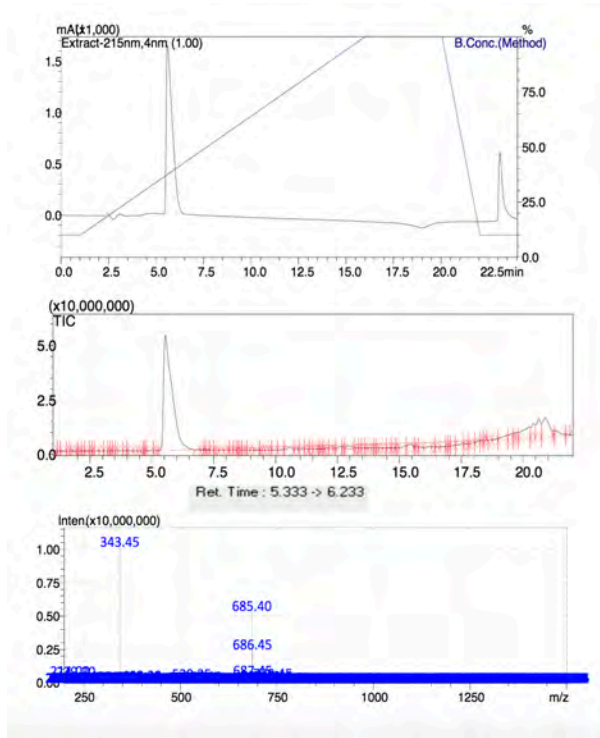
11



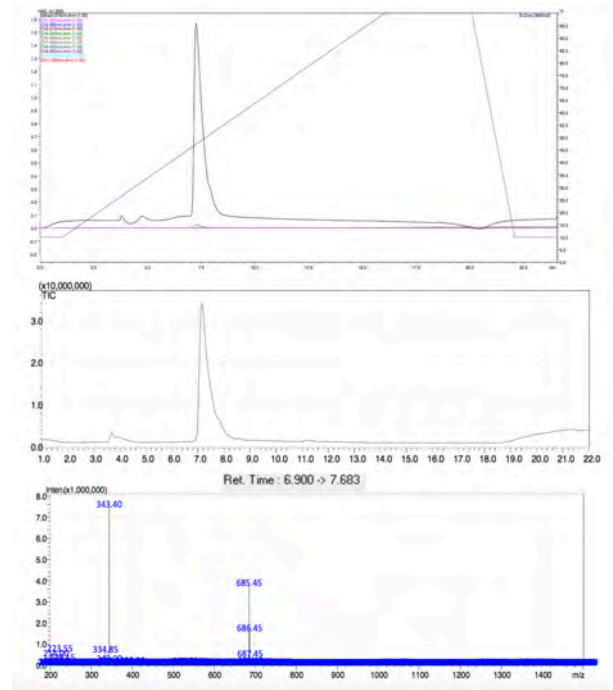
12



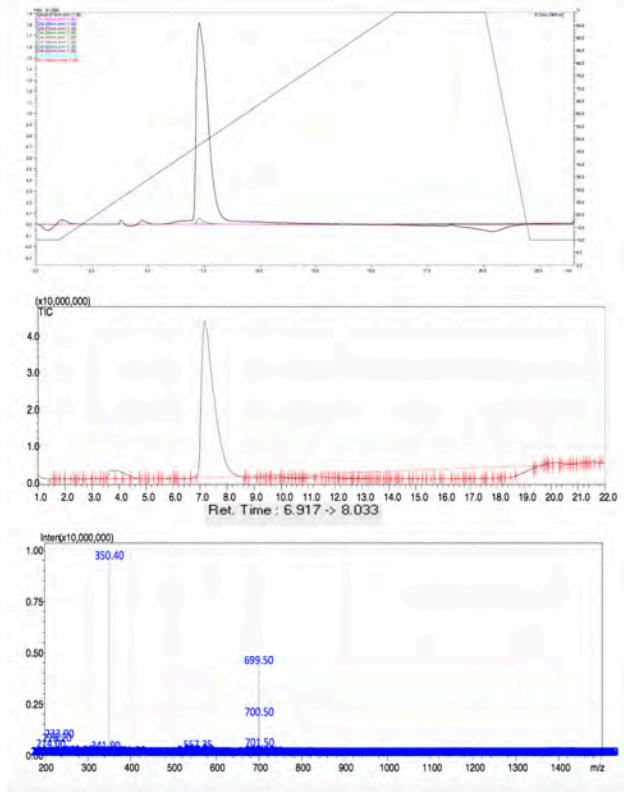
13



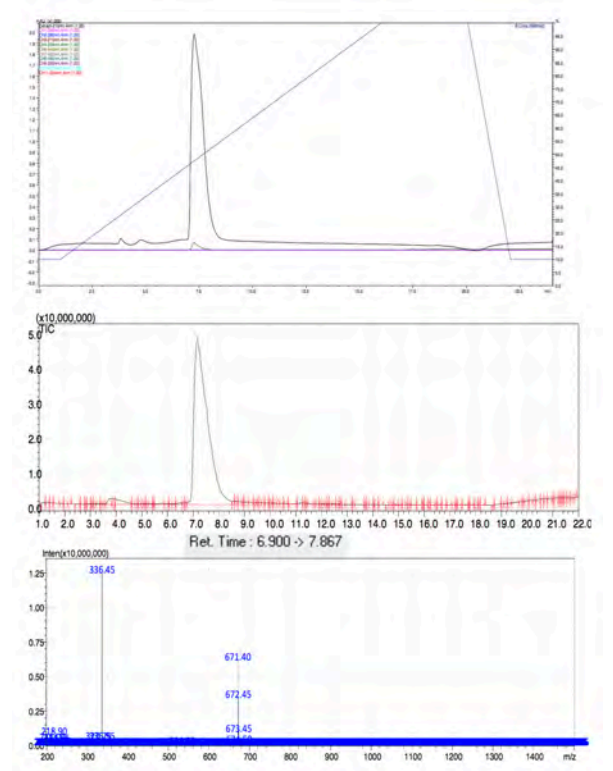
14



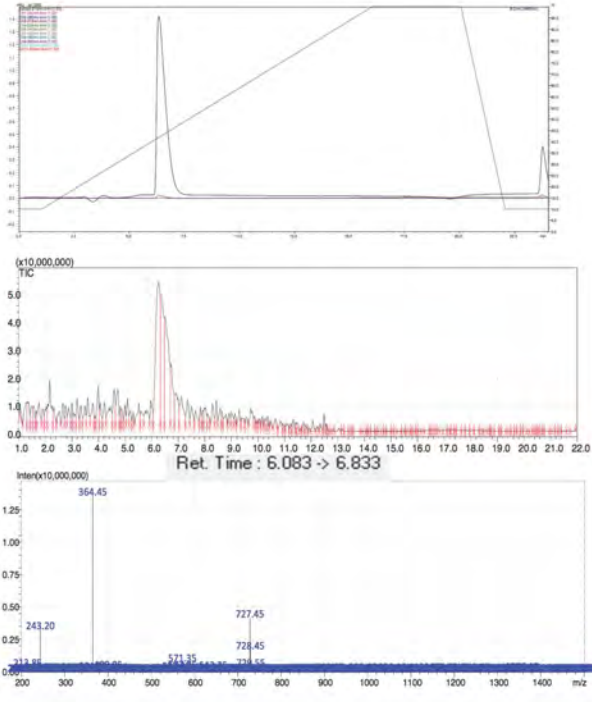
15



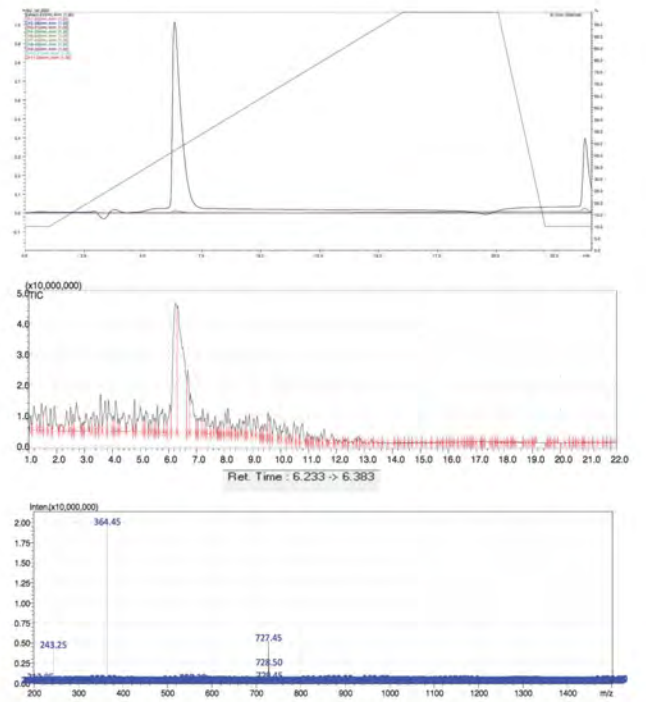
16



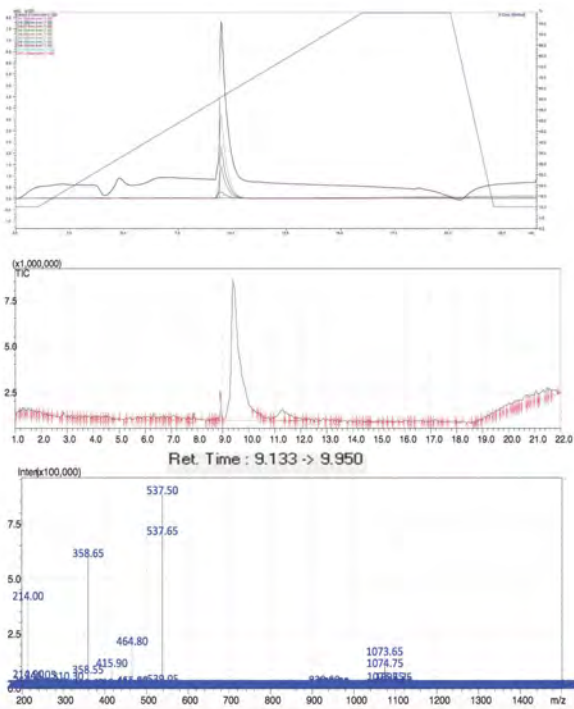
17



18

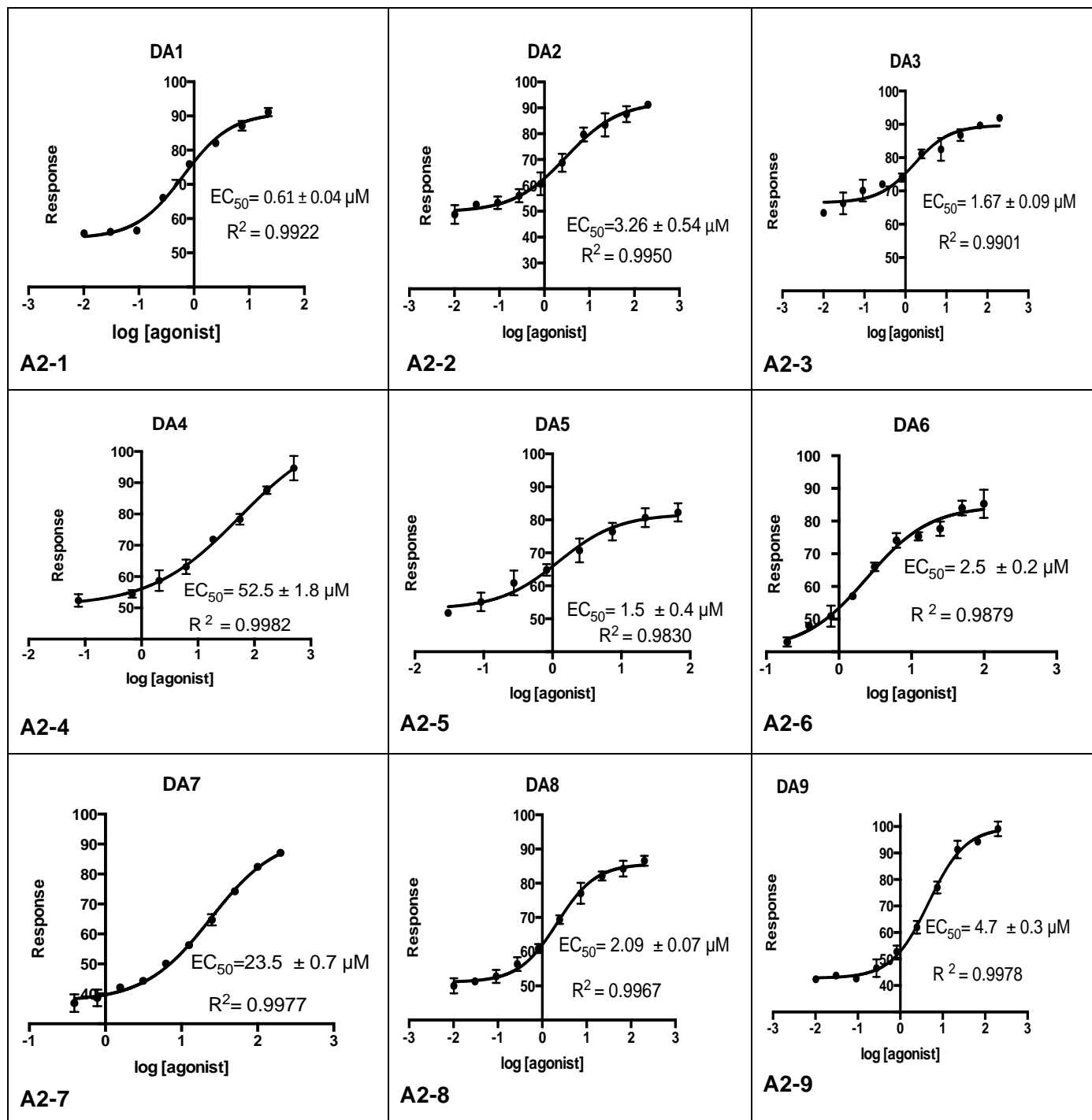


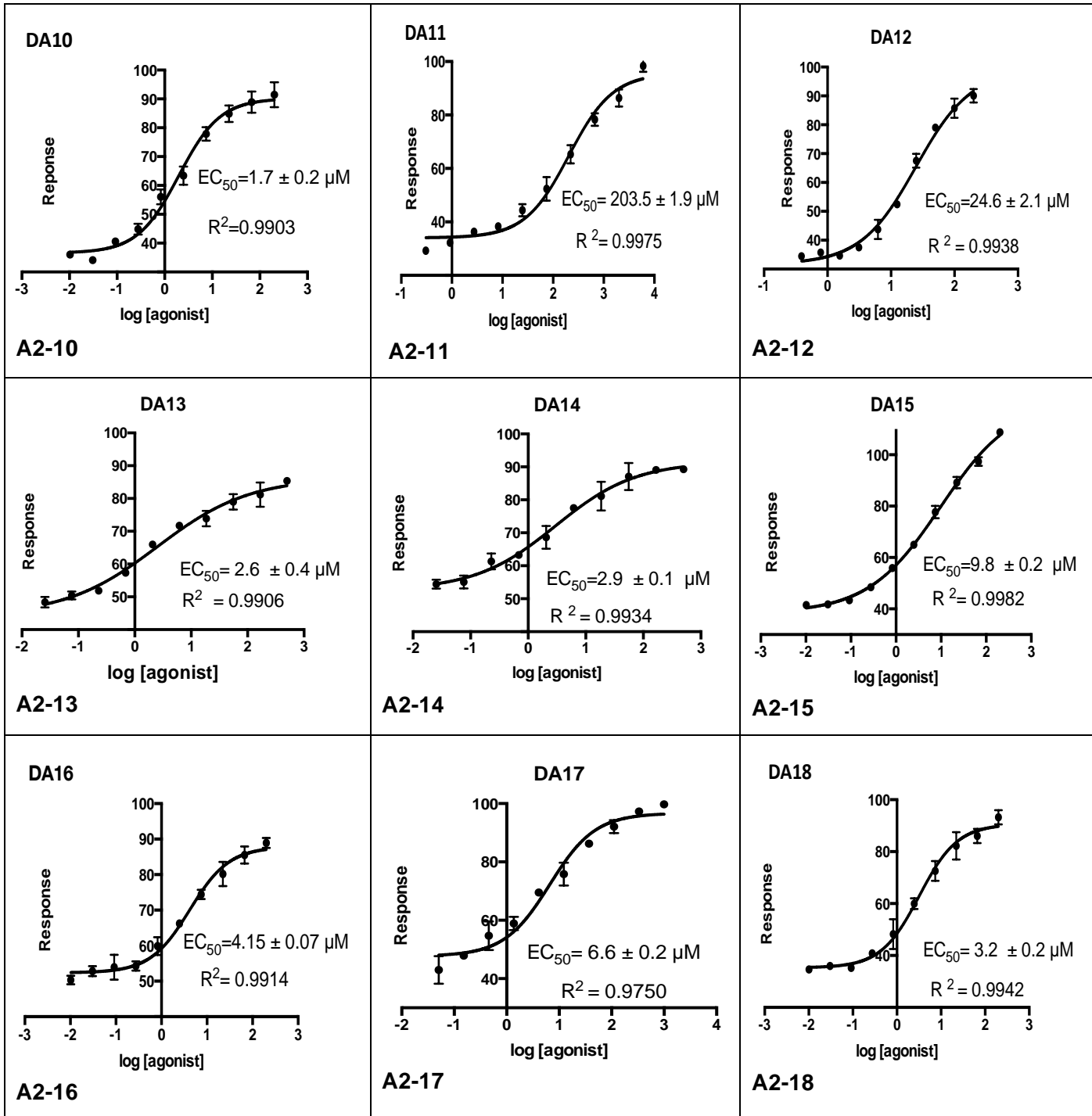
c-1



APÉNDICE 2

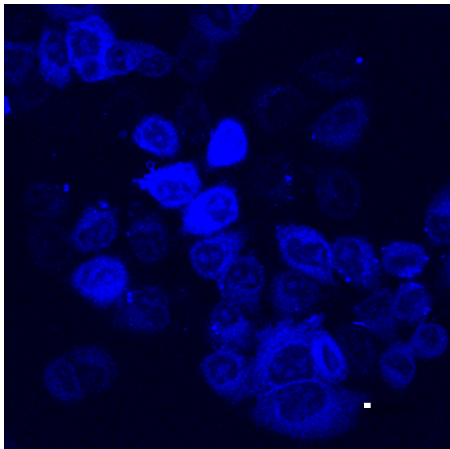
Curvas de activación (A2-1 a A2-18)



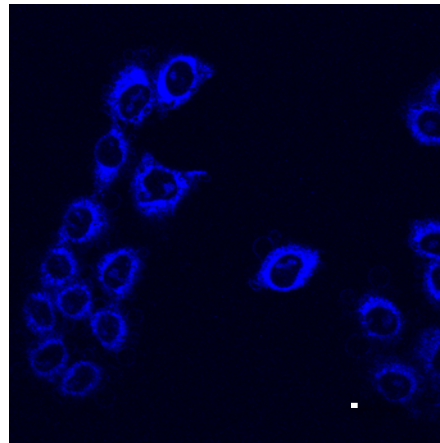


APÉNDICE 3

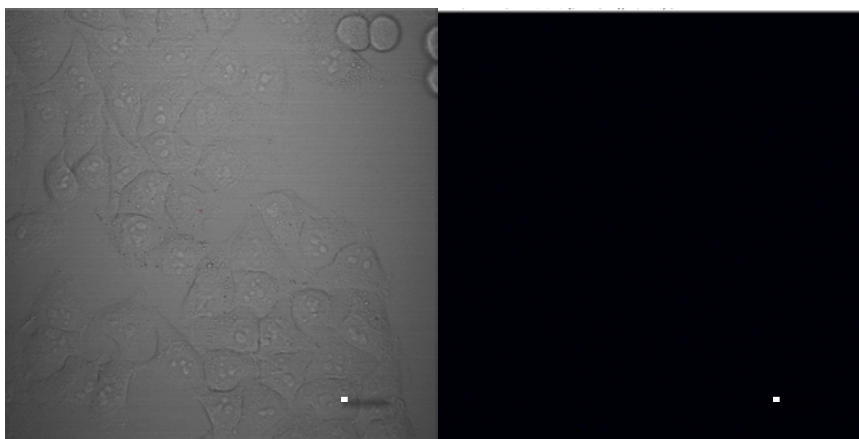
Ensayos de permeabilidad celular (c-1). Escala 10 μM .



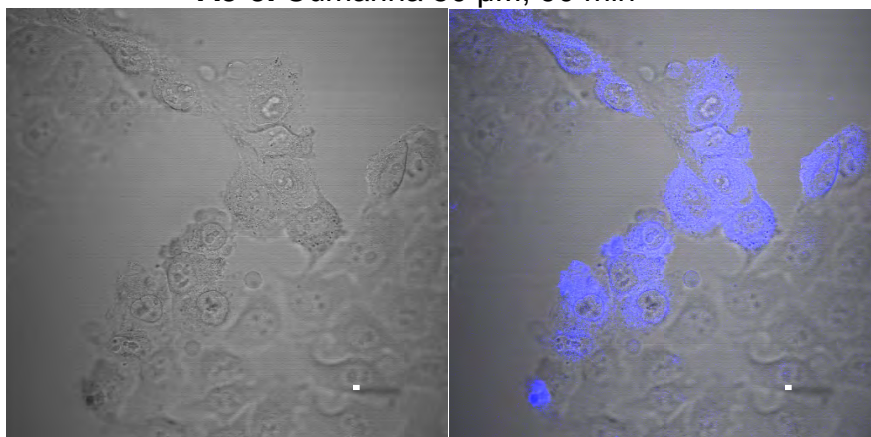
A3-1. c-1 50 μM , 90 min



A3-2. c-1 25 μM , 90 min



A3-3. Cumarina 50 μM , 90 min



A3-4. c-1 50 μM , 90 min