



INSTITUTE
FOR RESEARCH
IN BIOMEDICINE

INFORME DE SEGUIMIENTO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

**Lanzaderas peptídicas para el desarrollo de una terapia de
reemplazamiento proteico de la Ataxia de Friedreich**

(Duración: 18 meses)

Equipo investigador:

- Ernest Giralt, Prof. (Investigador Principal)
- Meritxell Teixidó, Dr.
- Macarena Sánchez, Dr.
- Toni Todorovski, Dr.

Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona)
Programa de Química y Farmacología Molecular
Baldri Reixac 10, 08028 Barcelona España

Barcelona, 14 de noviembre 2017



INSTITUTE
FOR RESEARCH
IN BIOMEDICINE

Resumen del proyecto

El proyecto “lanzaderas peptídicas para el desarrollo de una terapia de reemplazamiento proteico de la ataxia de Friedreich” define dos objetivos principales:

Objetivo 1: Síntesis de fragmentos estructurados de frataxina y modificación con péptidos lanzadera. Evaluación de estos constructos en modelos celulares de transporte de barrera hematoencefálica.

Objetivo 2: Evaluación de la estabilidad de la frataxina madura (FXNm) y modificación con péptidos lanzadera. Evaluación de las proteínas preparadas en modelos celulares de transporte de barrera hematoencefálica.

Durante el transcurso de estos primeros nueve meses hemos iniciado ambos objetivos en paralelo.

Resultados obtenidos

Objetivo 1.

El objetivo 1 se organiza en cuatro bloques:

- a) Síntesis, purificación y caracterización de los tres fragmentos seleccionados.
- b) Evaluación de la estabilidad de cada fragmento de frataxina y análisis de su conformación.
- c) Conjugación a lanzaderas peptídicas, si se obtienen fragmentos suficientemente estables.
- d) Evaluación del transporte a través del modelo celular *in vitro* de barrera hematoencefálica disponible en el laboratorio.

En primer lugar, se procedió a la síntesis de los tres fragmentos seleccionados.

Una vez sintetizados los diferentes fragmentos peptídicos, los crudos obtenidos se purificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (fase reversa, HPLC preparativo) y los péptidos se caracterizaron exhaustivamente por UPLC y UPLC-MS.

El siguiente paso fue la caracterización estructural de los tres fragmentos. Para ello se analizaron por dicroísmo circular. Del análisis de los datos obtenidos,

tanto en agua como en mezclas agua:trifluoroetanol, se puede concluir que solo uno de los fragmentos conserva la tendencia a formar la estructura nativa.

Una vez completada la caracterización de los tres péptidos diseñados, y sus tres variantes, se procedió a su funcionalización con péptidos lanzadera. Para ello se eligieron dos metodologías: la conjugación vía reacción tiol maleimida y la cicloadición 1,3-dipolar entre grupos azida y alquino catalizada por cobre, más conocida como “química click”.

El siguiente paso será la evaluación de la estabilidad en suero de los péptidos preparados, tanto conjugados como no. Por otra parte, se evaluará la capacidad de los péptidos como quelantes de átomos de hierro (Fe). En esta dirección, si se confirma la capacidad de estos fragmentos de unir átomos de hierro, se confirmaría el potencial terapéutico de los fragmentos sintetizados. Posteriormente se procederá a la evaluación del transporte de los fragmentos conjugados a lanzaderas a través de la barrera hematoencefálica.

Objetivo 2.

Este objetivo se divide en cuatro etapas:

- a) Evaluación de la estabilidad de dos versiones de frataxina madura (FXNm) expresadas en *E. coli* a temperatura ambiente, en suero a 37 °C.
- b) Funcionalización con varias lanzaderas peptídicas.
- c) Evaluación de la estabilidad de los conjugados proteína-péptido lanzadera.
- d) Evaluación del transporte a través del modelo de barrera hematoencefálica.

Se ha expresado con éxito la purificación de dos variantes de frataxina madura con técnicas de cromatografía estándares.

Una vez purificadas las proteínas, el primer hito a cumplir era la evaluación de su estabilidad. Este estudio aún no ha finalizado, pero se ha comprobado que ambas proteínas son estables a -20 °C durante varios meses (comprobado hasta seis meses). Esta estabilidad es suficiente para permitir la modificación y evaluación de los derivados preparados.

La metodología seleccionada para modificar las dos proteínas se basa en la reacción tiol-maleimida, caracterizada por una alta velocidad y buen rendimiento. Se han seleccionado cuatro péptidos lanzadera para estudiar el transporte de las diferentes FXNs a través de modelo de barrera. La modificación de ambas variantes se llevó a cabo con éxito.



INSTITUTE
FOR RESEARCH
IN BIOMEDICINE

El siguiente paso será la evaluación de la estabilidad de los conjugados preparados seguido del estudio del transporte a través de los modelos de barrera disponibles en nuestro laboratorio.

Por último, señalar que el proyecto “**Lanzaderas peptídicas para el desarrollo de una terapia de reemplazamiento proteico de la ataxia de Friedreich**” se desarrolla de manera satisfactoria. De momento no se han encontrado obstáculos importantes. Los resultados obtenidos hasta ahora permiten abordar el resto de los objetivos planteados durante la segunda mitad del proyecto. En concreto, se procederá a la evaluación del transporte en los modelos de barrera disponibles tanto de los fragmentos de frataxina como de las variantes de frataxina sintetizadas.