



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Construcción quimioselectiva de células
artificiales funcionales**

**Construción quimioselectiva de células
artificiais funcionais**

**Chemoselective construction of
functional artificial cells**

Lucía Lomba Riego

Curso: 2021 – 2022

Convocatoria: junio

Directores:

Roberto Javier Brea Fernández

Jaime Rodríguez González

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director, el Dr. Roberto Brea, por permitirme ser partícipe del inicio de su grupo de investigación, que estoy segura de que va a llegar muy lejos. Gracias por haber sido un tutor excepcional, por la confianza depositada en mí desde el principio y por todas las anécdotas compartidas. También a mi codirector, el Dr. Jaime Rodríguez, por haber estado siempre disponible y por su ayuda con la interpretación de resultados.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer los días más amenos. En especial a Esther, que ha sido la mejor compañera de laboratorio y un pilar fundamental.

Después de seis años queriendo que llegara este momento, no me creo que esté escribiendo estas palabras. Agradecer a mi familia su paciencia y apoyo incondicional, y a Kevin, por haberme querido todos estos años.

Por último, no quiero olvidarme de mis amigas, que siempre están ahí cuando las necesito. Tampoco de mis compañeros de carrera, que han hecho que esta época fuese muy feliz.

Gracias a todos.

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
δ:	Desplazamiento químico
d:	Doblete
dd:	Doble doblete
DIEA:	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMAP:	4-dimetilaminopiridina
EDC·HCl:	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ESI:	Ionización por electrospray (<i>electrospray ionization</i>)
h:	Hora
HATU:	1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol[4,5- <i>b</i>]piridinio 3-óxido hexafluorofosfato
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico
HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>High performance liquid chromatography</i>)
Hz:	Hercios
J:	Constante de acoplamiento
LR:	Baja resolución (<i>Low resolution</i>)
m:	Multiplete
M:	Molar
MESNA:	2-mercaptoetanosulfonato de sodio
min:	Minuto
mM:	Milimolar
ms:	Milisegundos
MS:	Espectrometría de masas (<i>Mass spectrometry</i>)
m/z:	Relación masa-carga
NCL:	Ligación química nativa (<i>Native chemical ligation</i>)
PB:	Tampón fosfato (<i>Phosphate buffered</i>)
P_M:	Peso molecular
ppm:	Partes por millón
q:	Quintuplete
RMN:	Resonancia magnética nuclear

s: Singulete
t: Triplete
tr: Tiempo de retención
TCEP·HCl: Hidrocloruro de tris(2-cloroetil)fosfato

RESUMEN

Uno de los principales objetivos de la biología sintética es crear células artificiales a partir de precursores no vivos. Ser capaces de reproducir las características de la vida en el laboratorio permite, no solamente entender mejor los procesos celulares y los requerimientos de la vida, sino desarrollar nuevas aplicaciones en la industria farmacéutica y biotecnológica. Además, este campo de estudio también ha ganado popularidad por su capacidad para vislumbrar cómo surgió la vida en la Tierra. Para la fabricación de este tipo de sistemas es necesario mimetizar la membrana celular, la cual es indispensable para la vida porque permite la compartimentalización, presente en todos los organismos vivos. En el presente Trabajo de Fin de Grado se ha desarrollado una ambiciosa estrategia para la construcción de nuevos modelos de células sintéticas funcionales basada en la preparación *in situ* de conjugados anfifílicos aminoácido-lípido, los cuales se autoensamblan en forma de vesículas biomiméticas de la membrana celular. La aproximación hace uso de diferentes reacciones quimioselectivas llevadas a cabo en medio acuoso, utilizando precursores sencillos que puedan ser plausibles desde el punto de vista del origen de la vida. Dichas metodologías resultan especialmente útiles como herramientas para el establecimiento de compartimentos únicos que faciliten el transporte dirigido de fármacos, la construcción de microrreactores y la reconstitución de proteínas. Estos estudios brindan un mayor entendimiento sobre la naturaleza de los sistemas vivos y ofrecen nuevos conocimientos sobre el origen de la vida celular.

Palabras clave: células artificiales, membrana, aminólisis, ligación química nativa, autoensamblaje.

RESUMO

Un dos principais obxectivos da bioloxía sintética é crear células artificiais a partir de precursores non vivos. Ser capaces de reproducir as características da vida no laboratorio permite, non soamente entender mellor os procesos celulares e os requirimentos da vida, senón desenvolver novas aplicacións na industria farmacéutica e biotecnolóxica. Ademais, este campo de estudo tamén gañou popularidade pola súa capacidade para albiscar como xurdiu a vida na Terra. Para a fabricación deste tipo de sistemas é necesario mimetizar a membrana celular, a cal é indispensable para a vida porque permite a compartimentalización, presente en todos os organismos vivos. No presente Traballo de Fin de Grao desenvolveuse unha ambiciosa estratexia para a construción de novos modelos de células sintéticas funcionais, baseada na preparación *in situ* de conxugados anfifílicos aminoácido-lípido, os cales se autoensamblan en forma de vesículas biomiméticas da membrana celular. A aproximación fai uso de diferentes reaccións quimioselectivas levadas a cabo no medio acuoso, utilizando precursores sinxelos que poidan ser plausibles dende o punto de vista da orixe da vida. Ditas metodoloxías resultan especialmente útiles como ferramentas para o establecemento de compartimentos únicos que faciliten o transporte dirixido de fármacos, a construción de microrreactores e a reconstitución de proteínas. Estes estudos brindan un maior entendemento sobre a natureza dos sistemas vivos e ofrecen novos coñecementos sobre a orixe da vida celular.

Palabras chave: células artificiais, membrana, aminólisis, ligadura química nativa, autoensamblaxe.

ABSTRACT

One of the main goals of synthetic biology is to create artificial cells from non-living precursors. Being able to reproduce the characteristics of life in the laboratory allows not only to better understand cellular processes and the requirements of life, but also to develop new applications in the pharmaceutical and biotechnology industries. In addition, this field of study has also gained popularity for its ability to provide a glimpse of how life arose on Earth. For the fabrication of this type of systems it is necessary to mimic the cell membrane, which is indispensable for life because it allows compartmentalization, present in all living organisms. In this thesis we have developed an ambitious strategy for the construction of new models of functional synthetic cells based on the *in situ* preparation of amphiphilic amino acid-lipid conjugates, which self-assemble in the form of biomimetic vesicles of the cell membrane. The approach makes use of different chemoselective reactions conducted in aqueous media, using simple precursors that may be plausible from the point of view of the origin of life. Such methodologies are particularly useful as tools for the establishment of single compartments to facilitate targeted drug delivery, the construction of microreactors and protein reconstitution. These studies provide a better understanding of the nature of living systems and offer new insights into the origin of cellular life.

Keywords: artificial cells, membrane, aminolysis, native chemical ligation, self-assembly.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Antecedentes históricos	1
2. Células artificiales	3
2.1. Definición	3
2.2. Requisitos para ser consideradas células sintéticas	4
2.3. Aplicaciones	5
3. Química mimética de membrana.....	6
OBJETIVOS.....	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
1. Estrategia general	9
2. Síntesis y caracterización.....	9
2.1 Preparación de tioésteres	9
2.2 Formación de conjugados aminoácido-lípido	11
3. Estudios de microscopía	20
CONCLUSIONES.....	22
CONCLUSIÓNS	23
CONCLUSIONS	24
SECCIÓN EXPERIMENTAL	25
1. Materiales y métodos.....	25
1.1 Reactivos, disolventes y otros	25
1.2 Técnicas e instrumentos de laboratorio	26
2. Procedimientos experimentales	27
2.1 Obtención de los tioésteres de MESNA	27
2.2 Reacción de aminólisis directa en agua.....	29
2.3 Reacción de aminólisis en disolvente orgánico.....	30

2.4 Ligación Química Nativa (NCL).....	31
3. Técnicas de caracterización.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33
ANEXOS.....	36

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes históricos

Las células fueron descubiertas en 1665 por Robert Hooke. Utilizando un microscopio primitivo, fue capaz de observar células vegetales muertas en una lámina de corcho. Desde ese momento, el estudio de las células ha adquirido una vital importancia para entender el funcionamiento de un organismo (Figura 1).

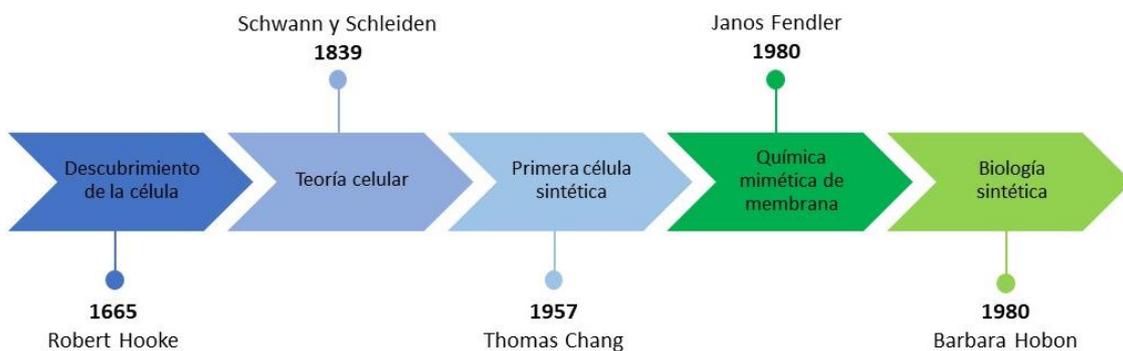


Figura 1. Cronología del estudio de las células sintéticas.

En 1839, Schwann y Schleiden propusieron la teoría celular, que postula que la célula es la unidad estructural y funcional básica de todos los organismos vivos. Este hecho significativo provocó que la célula pasase a considerarse como el bloque de construcción fundamental de la vida.¹ Sin embargo, la biología moderna no se conforma estudiando únicamente la estructura y funciones de la célula. La investigación biológica se ha expandido a múltiples áreas, incluyendo el estudio del origen de la vida, la ingeniería celular, la biotecnología, la medicina, la liberación de fármacos, los biosensores y la biorremediación. El desarrollo de nuevas técnicas y estrategias para abordar muchas de estas disciplinas ha facilitado el surgimiento de la biología sintética.²

El término biología sintética apareció por primera vez en la bibliografía en 1980, cuando Barbara Hobon lo utilizó para referirse a bacterias que fueron modificadas genéticamente mediante ADN recombinante.³ No obstante, a principios de este siglo fue reintroducido por Eric Kool para hacer referencia al “rediseño” de la vida.⁴ Cabe destacar que la biología sintética se basa en obtener nuevo conocimiento mediante la creación de nueva biología. Teniendo en cuenta este hecho, se puede considerar un campo de estudio centrado en el diseño de sistemas biológicos no presentes en el mundo natural,

permitiendo así encontrar soluciones a problemas actuales como el cambio climático o las enfermedades.⁵

El doctor Thomas Chang fue el primero en proponer el concepto de células artificiales en 1957. Sus estudios preliminares permitieron obtener células sintéticas de tamaño micrométrico constituidas por *nylon* o proteínas reticulares, las cuales contenían en su interior material biológico relevante, fundamentalmente proteínas funcionales (enzimas, hemoglobina).⁶ Los resultados obtenidos sirvieron como base fundamental para establecer la importancia de las células sintéticas como sistemas biomiméticos eficientes en el estudio de las propiedades de las células naturales, el análisis de las dinámicas celulares sin que interfiera su complejidad y la exploración de nuevas aplicaciones.²

En la ingeniería de células sintéticas existen dos estrategias complementarias (Figura 2): i) la estrategia de abajo hacia arriba (*bottom-up*), y ii) la estrategia de arriba hacia abajo (*top-down*). La primera de ellas conlleva obtener una célula mínima desde cero, a partir de bloques de construcción simples e inanimados. Por otro lado, el segundo enfoque consiste en modificar las células naturales mediante biología molecular y técnicas de ingeniería metabólica y genética, hasta que se obtiene un organismo vivo más simple.⁷

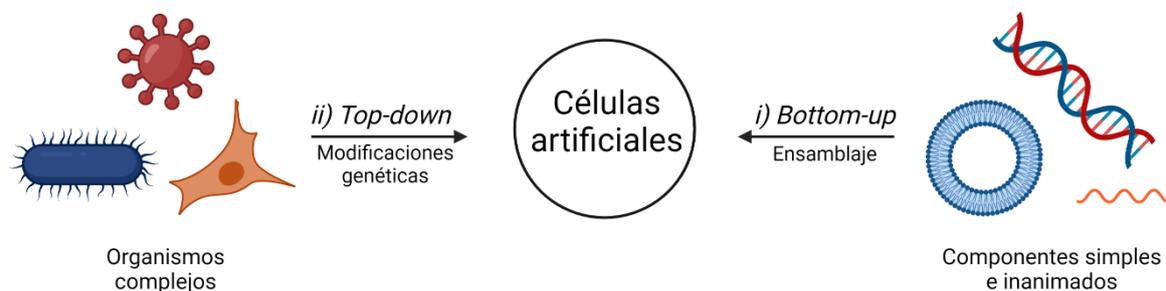


Figura 2. Estrategias utilizadas en ingeniería de células artificiales.

El presente Trabajo de Fin de Grado se centra en la obtención de vesículas biomiméticas de células biológicas mediante el empleo de la estrategia *bottom-up*. Esta estrategia, que surgió en la década de los noventa por trabajos pioneros de Luisi y Yomo,⁸⁻¹⁰ aporta un mayor control sobre las propiedades funcionales y estructurales de los sistemas generados.¹¹ De esta forma, se pueden diseñar modelos sintéticos funcionales con mayor precisión.

2. Células artificiales

2.1. Definición

No existe un consenso absoluto sobre cómo definir apropiadamente las células artificiales. Una posible definición de células artificiales, también conocidas como células sintéticas o protocélulas, se basa en establecerlas como sistemas químicos o bioquímicos que tratan de mimetizar tanto la estructura como el comportamiento de las células biológicas.¹² Sin embargo, probablemente la definición más estricta es la que solamente considera como célula artificial aquella que es totalmente autónoma, autosuficiente, capaz de replicarse y de evolucionar.⁵

Los sistemas celulares artificiales se caracterizan por poseer microcompartimentos bien definidos que pueden ser adecuadamente funcionalizados mediante la integración de componentes biomoleculares, tales como canales transmembrana, enzimas, elementos del citoesqueleto, circuitos genéticos y maquinaria de transcripción y traducción. Estos sistemas supramoleculares artificiales pueden ser de diferente naturaleza (Figura 3), aunque la mayor parte de ellos son de carácter lipídico.¹² En este último caso, el chasis básico de las células sintéticas mínimas estaría habitualmente formado por liposomas esféricos con diámetros comprendidos entre 0,1 y 100 micras, normalmente construidos a partir de fosfolípidos y colesterol.¹³

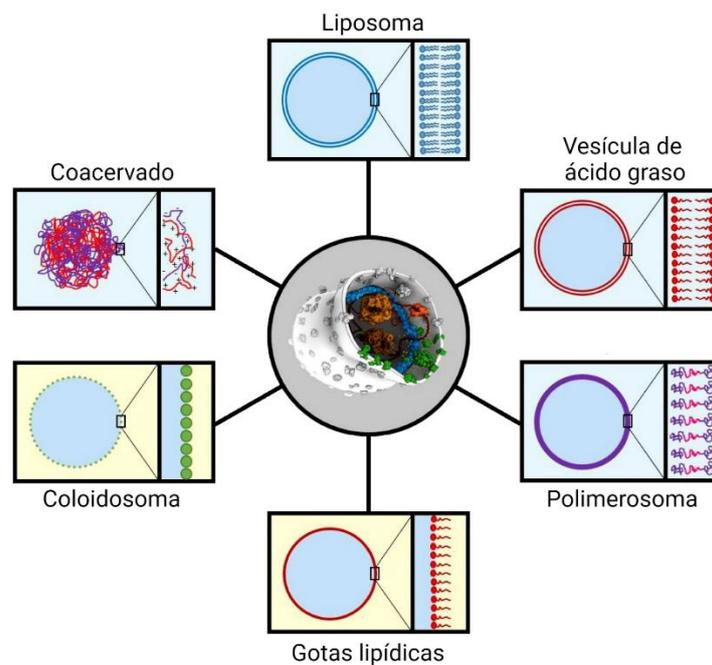


Figura 3. Diferentes tipos de compartimentos [Adaptado de Spoelstra *et al.*¹⁴].

Uno de los objetivos más ambiciosos de la biología sintética es la construcción de células “vivas”. Aunque definir con precisión qué implica el término de células “vivas” es arduamente complicado, existe un consenso general en el que se considera que dichas células deben ser capaces de automantenerse, autorreproducirse, evolucionar y morir.² Desafortunadamente, todavía no se ha logrado obtener una célula “viva” a partir de materiales no vivos, pero cada vez hay un mayor progreso en mimetizar las características de la vida. Es de resaltar que la mayoría de los grupos de investigación que trabajan en esta temática intentan obtener células artificiales que presentan una membrana lipídica, que siguen el dogma central de ADN, ARN y proteínas, que disponen de un metabolismo propio y que son capaces de producir energía.⁷ No obstante, es evidente que actualmente las células artificiales no tienen el comportamiento sofisticado de las biológicas.⁵

2.2. Requisitos para ser consideradas células sintéticas

Las características que deben presentar las células sintéticas para ser consideradas como tal están todavía sometidas a debate. Ciertos grupos de investigación enfatizan la necesidad de que, para ser consideradas células sintéticas, deben mimetizar comportamientos celulares distintivos de la vida. Además, también hay considerables discordancias a la hora de establecer si es un requisito indispensable que contengan componentes genómicos, si los bloques de construcción deben ser de origen biológico o si la similitud respecto a las células naturales es suficiente en lo referente a morfología.⁵

Las células biológicas presentan tres componentes principales para realizar las funciones esenciales de la vida, esquematizados en la Figura 4:

1. Una membrana estable y semipermeable que encierra los componentes celulares y los protege de daños y del ambiente externo, permitiendo así intercambiar materiales y energía.
2. Macrobiomoléculas (ADN o ARN) que contienen la información genética y que controlan las dinámicas de la célula, incluyendo la capacidad de evolución. También la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas.
3. Una serie de rutas metabólicas utilizadas para darles energía.

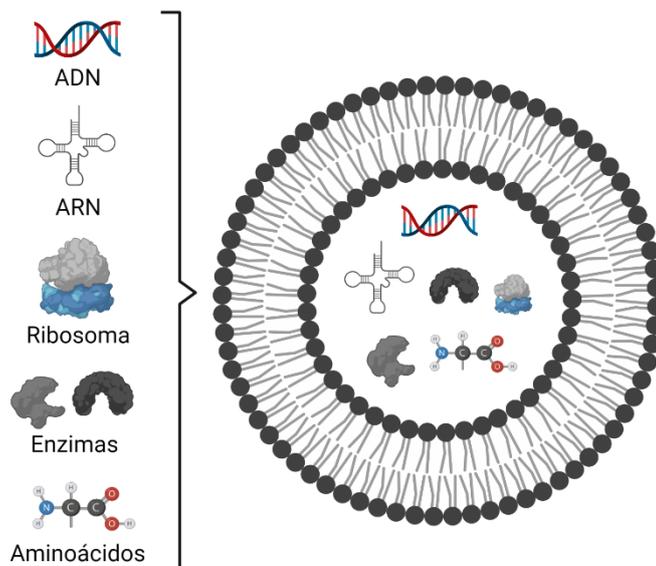


Figura 4. Representación esquemática de una célula sintética [Adaptado de Chiarabelli *et al.*¹⁵].

Aunque todavía no se ha logrado fabricar una célula sintética con todas las propiedades que presenta una natural, los avances realizados en los últimos años han permitido vislumbrar que este ambicioso objetivo resulta cada vez más factible.

2.3. Aplicaciones

El diseño de células artificiales tiene dos grandes objetivos. El primero de ellos se fundamenta en comprender los orígenes y la evolución de la vida celular construyendo un sistema modelo a partir de bloques de construcción mínimos. El segundo objetivo se basa en desarrollar nuevas propiedades para conseguir aplicaciones novedosas. Teniendo en cuenta ambos objetivos, se puede llegar a entender como el estudio de este tipo de sistemas resulta extremadamente interdisciplinar, pues el abanico de aplicaciones comprende áreas que van desde la biología básica a la industria farmacéutica y la biomedicina. Estas estructuras también permiten organizar las reacciones químicas en compartimentos bien definidos con tamaños del orden de micrómetros (microrreactores).

Con respecto a la biología básica, una de las aplicaciones más ambiciosas es el empleo de células artificiales para poder comprender cómo surgieron las células naturales en la Tierra a partir de materiales no vivos. Además, esto también permitiría establecer cuáles son los requisitos de la vida.¹⁶ Ha de tenerse en cuenta que, para poder investigar adecuadamente el origen de la vida, las protocélulas deben ser sintetizadas a partir de materiales prebióticos plausibles.¹⁴

En el campo de la biomedicina, la mayoría de las células sintéticas empleadas para la liberación de fármacos están basadas en sistemas lipídicos, y más concretamente, en liposomas. La utilización de liposomas presenta como ventaja la inmunogenicidad reducida de la que disponen. De esta forma, no desencadenan una respuesta inmune fuerte debido a que no presentan receptores en la superficie celular. Uno de los objetivos más ambiciosos en este campo sería la construcción de células artificiales que puedan actuar como laboratorios programables, siendo capaces así de sintetizar varios fármacos a demanda en el momento en que localizan el tejido diana en el cuerpo.⁷ En este sentido, cabe resaltar los trabajos de Krinsky *et al.* basados en la generación de células sintéticas de naturaleza lipídica, que se pueden observar en la Figura 5, con capacidad para secretar una exotoxina que causa apoptosis en células malignas de cáncer de mama.¹⁷

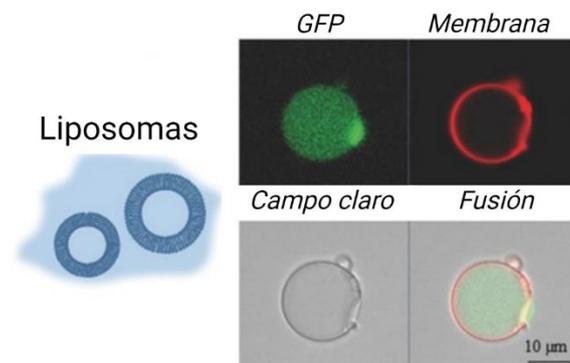


Figura 5. Estudios de microscopía de los liposomas generados por Krinsky *et al.*¹⁷

3. Química mimética de membrana

En la década de los ochenta, Janos Fendler popularizó el término química mimética de membrana, el cuál definió como el esfuerzo de utilizar nanoestructuras lipídicas (vesículas, micelas...) para facilitar reacciones químicas. En un principio, mimetizar fenómenos biológicos no era uno de los objetivos de dicha disciplina.¹⁸ Sin embargo, éste sí lo es actualmente, debido al gran número de científicos interesados en construir estructuras lipídicas que imiten adecuadamente las propiedades de las membranas celulares. Este hecho permite lograr un mayor entendimiento de la química lipídica fundamental, mejorar nuestra habilidad de generar membranas biomiméticas y acelerar el desarrollo de aplicaciones en las que se utilizan herramientas basadas en lípidos.¹⁹

El grupo de investigación BioMemChem (*Biomimetic Membrane Chemistry*), en el cual se ha realizado este trabajo, tiene como una de sus principales líneas de investigación la utilización de sistemas químicos mínimos para mimetizar las membranas celulares. En los últimos años, este grupo ha desarrollado nuevas estrategias para obtener de forma eficiente células artificiales funcionales (Figura 6). Así, por ejemplo, han podido fabricar espontáneamente liposomas biomiméticos mediante el empleo de metodologías *in situ* que van desde aquellas típicamente peptídicas (como la ligación de histidina o la química de iminas), hasta cicloadiciones de cobre y estrategias quimioenzimáticas que combinan reacciones químicas con enzimas biológicas.²⁰ En todas ellas, se busca generar sistemas celulares artificiales a partir de precursores solubles en agua, sin necesidad de catalizadores y mediante reacciones quimioselectivas.

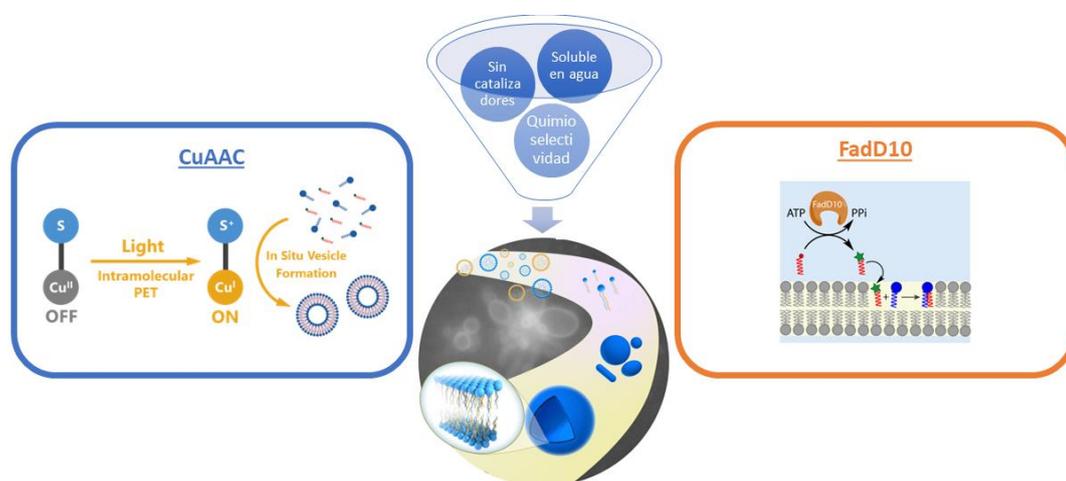


Figura 6. Estrategias utilizadas por el grupo BioMemChem para la formación de células artificiales.

En este Trabajo de Fin de Grado se han desarrollado nuevas estrategias de construcción de células artificiales mediante la utilización de reacciones de aminólisis y de ligación química nativa (NCL).

OBJETIVOS

El presente Trabajo de Fin de Grado ha sido realizado en el grupo BioMemChem del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), en la línea de investigación enfocada en la obtención de células sintéticas funcionales.

El objetivo principal del proyecto de investigación es la fabricación de nuevos modelos de células artificiales basados en conjugados aminoácido-lípido autoensamblantes mediante el empleo de reacciones sencillas y quimioselectivas a partir de precursores solubles en agua. Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Síntesis y caracterización de diferentes precursores de tipo tioéster alquílico relacionados con el origen de la vida. Evaluación de la influencia de la longitud de cadena y la presencia de insaturaciones en la construcción de liposomas biomiméticos.
- Formación *in situ* de aminoácidos diacilados capaces de autoensamblarse en vesículas lipídicas: *N α ,N ϵ* -dioleoil-*L*-lisina mediante aminólisis directa y *N,S*-dilaureoil-*L*-cisteína mediante ligación química nativa.
- Caracterización de los conjugados aminoácido-lípido resultantes de ambas reacciones. Comprobación de la formación de vesículas mediante microscopía óptica de campo claro y de fluorescencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estrategia general

En el presente Trabajo de Fin de Grado se han obtenido células sintéticas funcionales mediante la generación *in situ* de moléculas anfifílicas capaces de autoensamblarse en forma de vesículas lipídicas de tamaño micrométrico. Al igual que los fosfolípidos, estas moléculas están formadas por dos partes bien definidas; por un lado, dos colas hidrófobas constituidas por cadenas de ácidos grasos y, por otro, una cabeza hidrofílica de naturaleza polar. En nuestro caso particular, abordamos la construcción espontánea de dichas especies anfifílicas mediante reacciones en medio acuoso entre tioésteres de cadena larga relacionados con el origen de la vida (tiooleato, tiopalmitato, tiolaurato, tiocaprilato) -que aportarían el componente hidrófobo- y aminoácidos con capacidad para diacilarse (serina, lisina, cisteína) -que constituirían la parte hidrofílica (Figura 7).

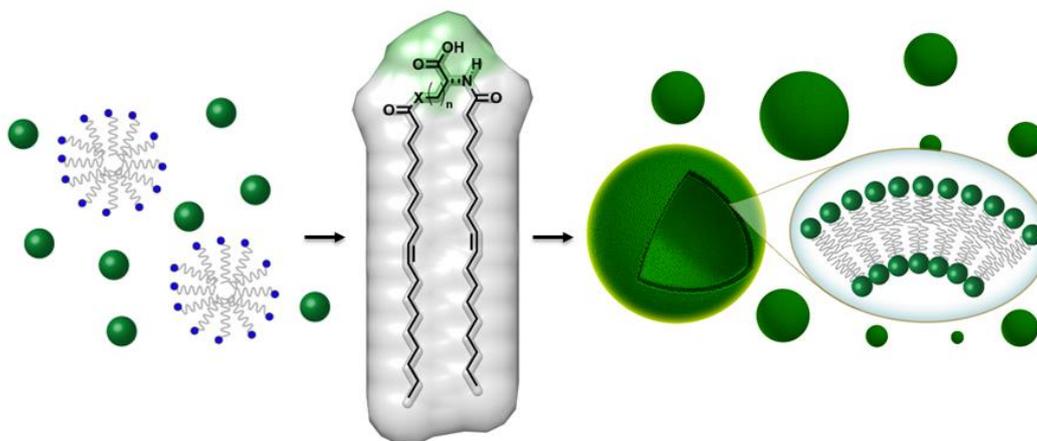


Figura 7. Estrategia empleada para la fabricación de células sintéticas funcionales.

2. Síntesis y caracterización

2.1 Preparación de tioésteres

Los tioésteres de cadena larga empleados (**6-9**) fueron sintetizados a partir de su ácido graso correspondiente (**2-5**), siguiendo el esquema de reacción de la Figura 8. Inicialmente, se realizó la activación del grupo carboxilo en diclorometano a 0 °C utilizando como agente de acoplamiento una carbodiimida (EDC·HCl) y 4-

metilaminopiridina (DMAP) como catalizador. Esta preactivación permitió el posterior ataque nucleófilo del 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) (**1**), generando el tioéster deseado (**6-9**), el cual fue extraído en agua. La fase acuosa se evaporó a sequedad, dando lugar a un residuo transparente que se lavó con acetonitrilo y se filtró a vacío, consiguiendo rendimientos de 42% (**6**), 62% (**7**), 19% (**8**) y 28% (**9**). La síntesis de estos compuestos no es sencilla, pues al tratarse de moléculas anfifílicas pueden estar en ambas fases a la hora de realizar la extracción. Además, también son buenos detergentes, generando problemas a la hora de concentrarlos en el rotavapor.

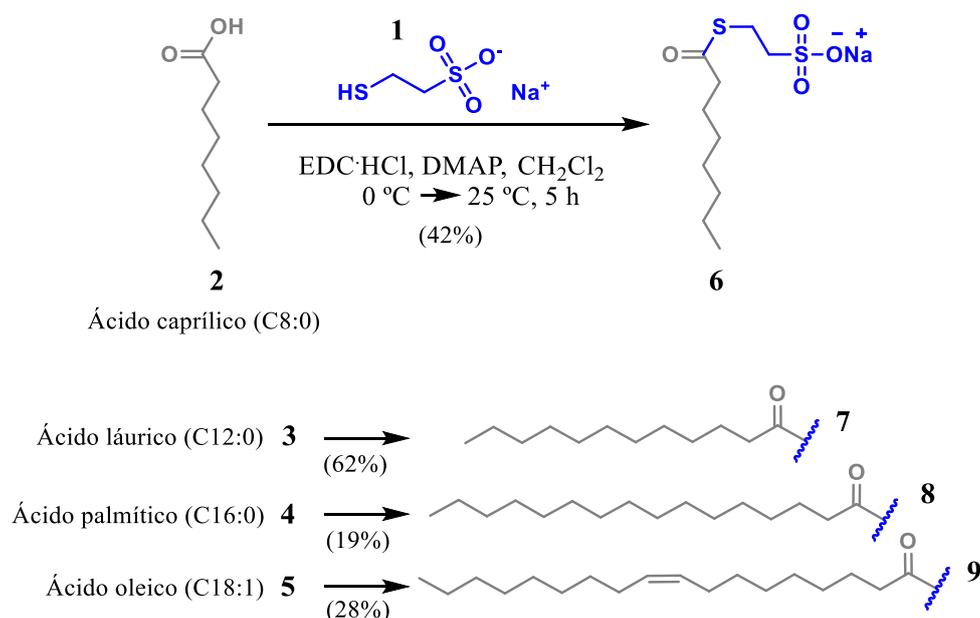


Figura 8. Formación de los tioésteres de MESNA.

Para confirmar que los sólidos blancos obtenidos tras el filtrado se corresponden con los diferentes tioésteres, se realizó su caracterización mediante ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. En las Figuras A1-4 del Anexo se muestran dichos espectros, donde aparecen señales correspondientes a la parte MESNA (señales 1' y 2'), permitiendo diferenciar los compuestos **6-9** de los ácidos grasos de partida (**2-5**).

Además, también se caracterizaron los tioésteres mediante espectrometría de masas (Figuras A5-8). La relación m/z de cada tioéster coincide con los pesos moleculares esperados sin el ion Na^+ , el cual no es detectado al realizar el análisis en modo de ionización negativa.

2.2 Formación de conjugados aminoácido-lípido

Una vez se sintetizaron y caracterizaron los precursores tioésteres, se llevó a cabo la preparación de los conjugados anfifílicos aminoácido-lípido, los cuales deberían poder autoensamblarse en forma de vesículas. Para ello, se siguieron dos estrategias sintéticas diferentes, ambas basadas en la utilización de reacciones sencillas y quimioselectivas entre precursores solubles en agua.

2.2.1 Reacción de aminólisis

La primera reacción explorada fue la aminólisis directa en agua de los diferentes tioésteres previamente sintetizados con *L*-lisina. Aunque esta reacción no es extremadamente quimioselectiva, su sencillez y versatilidad son parámetros beneficiosos a considerar a la hora de establecer una diacilación en agua. Desafortunadamente, las velocidades de esta reacción no suelen ser muy altas, por lo que es conveniente el empleo de algún tipo de catalizador (imidazol, metales) para poder así incrementar sus cinéticas. Así, por ejemplo, Li *et al.* demostraron que la catálisis con imidazol permitiría la aminólisis intramolecular en disolución acuosa de una secuencia peptídica, generando el correspondiente péptido cíclico (Figura 9).²¹

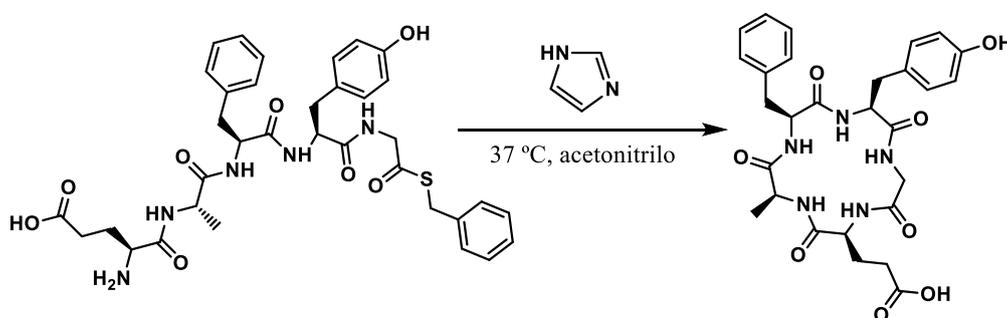


Figura 9. Formación de péptidos cíclicos mediante una reacción de aminólisis catalizada por imidazol [Adaptado de Li *et al.* ²¹].

En primer lugar, se hizo reaccionar el ácido oleico (**5**) con la *L*-lisina (**10**) en ausencia y presencia de imidazol (Figura 10A). Al inyectar las reacciones en el HPLC, no se observó ningún pico correspondiente al producto esperado (Figura 10B). Este hecho puso de manifiesto que la activación del ácido carboxílico en forma de tioéster debe ser necesaria para que se produzca la diacilación del aminoácido en disolución acuosa.

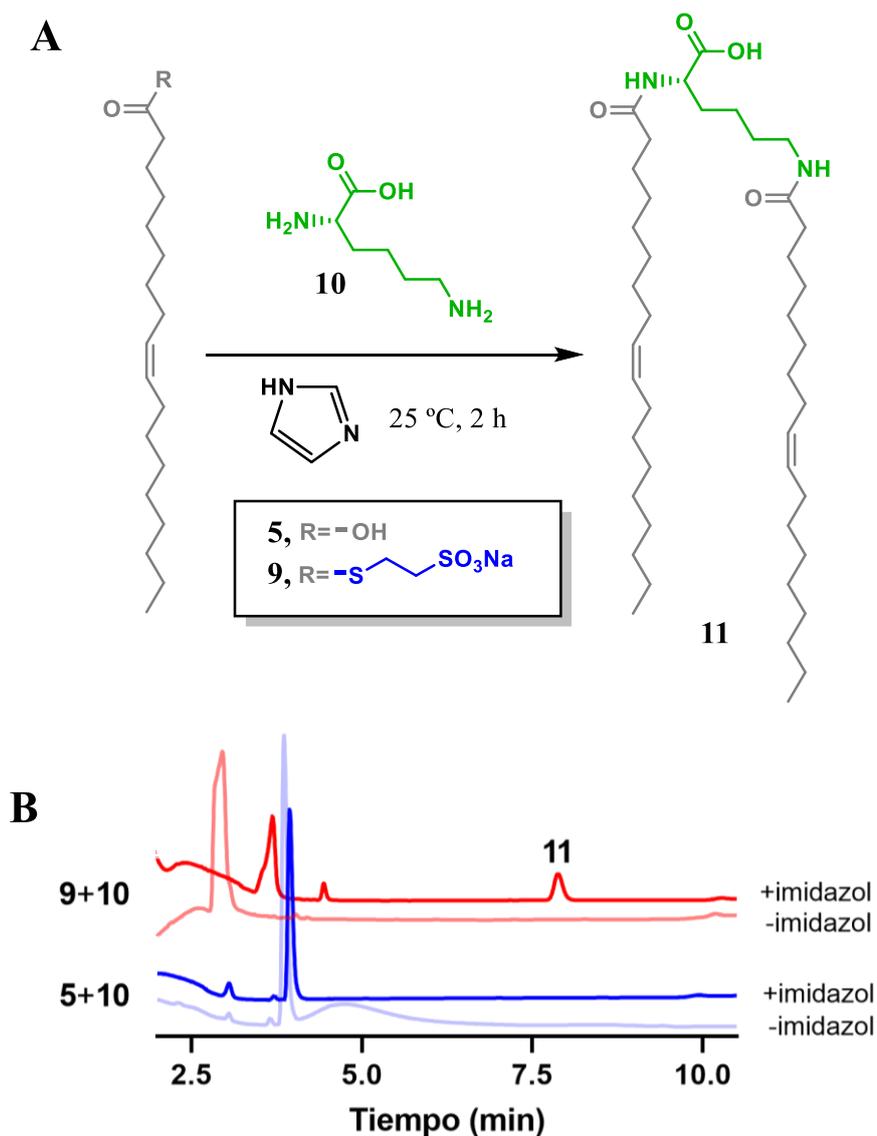


Figura 10. Reacciones de aminólisis del oleoil derivado [ácido oleico (**5**) o tiooleato de MESNA (**9**)] con la *L*-lisina (**10**). A) Esquema de la reacción. B) Cromatogramas de las reacciones en presencia y ausencia de imidazol.

Teniendo en cuenta nuestros resultados preliminares con el ácido oleico (**5**), se realizó a continuación la reacción de aminólisis del tiooleato de MESNA (**9**) con la *L*-lisina (**10**) en ausencia de catalizadores. De nuevo, al inyectar la reacción en el HPLC no se observó ningún pico que se pudiese corresponder con el producto esperado (Figura 10B). De esta forma, consideramos el empleo de imidazol para favorecer la reacción de aminólisis.

Se realizó la misma reacción modelo entre el tiooleato **9** y el aminoácido **10** para la obtención de *Nα,Nε*-dioleoil-*L*-lisina (**11**), pero esta vez en presencia de imidazol. Para

ello se combinaron el compuesto **9** (concentración final: 5 mM), el aminoácido **10** (concentración final: 2,5 mM) y el imidazol (concentración final: 1,5 M), y se dejaron reaccionar durante 2 h (Figura 10A). Una vez transcurrido ese tiempo, se observó por HPLC la aparición de un nuevo pico a un tiempo de retención (t_R) de 7,87 min correspondiente al producto **11** (Figura 10B). Este hecho indica que el imidazol actúa como un excelente catalizador de la reacción y es imprescindible para que la misma ocurra. Por desgracia, el mecanismo por el cual el imidazol acelera la reacción de aminólisis es todavía desconocido. No obstante, basándonos en un mecanismo similar,²² podemos hipotetizar que en nuestro caso particular se puede estar favoreciendo la formación *in situ* de un intermedio “acil-imidazol” que dinamiza la reacción de aminólisis.

Además de la formación del producto diacilado **11**, también se observó una clara disminución del precursor tiooleato de MESNA (**9**), corroborando nuevamente que la reacción de aminólisis estaba teniendo lugar. Mediante inyección previa en HPLC de este tioéster, se observó la aparición del pico correspondiente a un t_R de 2,95 min. La comparación con la reacción de aminólisis de **9** con **10** en presencia de imidazol se recoge en la Figura 11.

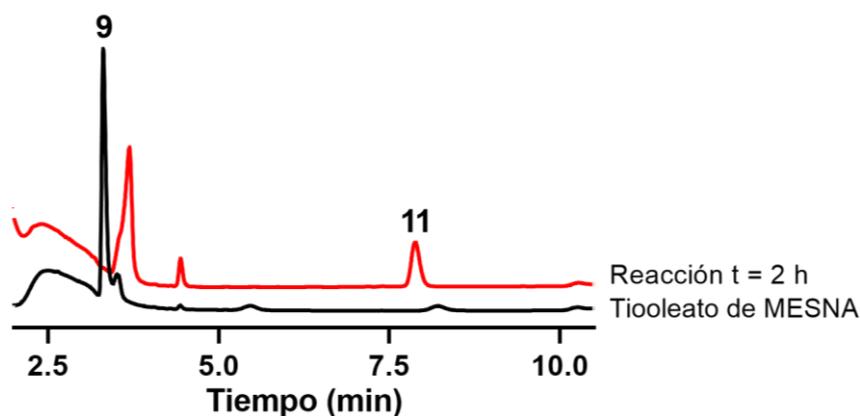


Figura 11. Cromatogramas obtenidos para el precursor **9** y para una mezcla de dicho precursor con la *L*-lisina (**10**) en presencia de imidazol tras 2 h de reacción.

A continuación, se probó la reacción de aminólisis para el resto de los tioésteres (**6-8**) frente a *L*-lisina (**10**), empleando para ello las condiciones de reacción optimizadas con el tioéster **9**. Tal y como se muestra en la Figura 12, al inyectar las reacciones en el HPLC no se observó la aparición de ningún pico que pudiese identificarse con los productos de las reacciones, incluso incrementando el tiempo de reacción. Este hecho parece indicar

que estamos ante la presencia de una reacción selectiva para el tioleato de MESNA (**9**), lo que probablemente se deba a que las micelas generadas por dicho tioéster facilitan que la aminólisis tenga lugar de manera más adecuada. Cabe mencionar el especial interés que tenemos en la realización de estudios futuros que nos permitan entender mucho mejor la dinámica de nuestro proceso. Por ejemplo, estaríamos interesados en probar la reacción con algún tioéster de cadena más corta que, al igual que el derivado **9**, presentase un doble enlace en su estructura. Así, se podría verificar si la selectividad de la reacción es debida a la mayor longitud de la cadena, a la presencia de la insaturación o a un conjunto de ambas.

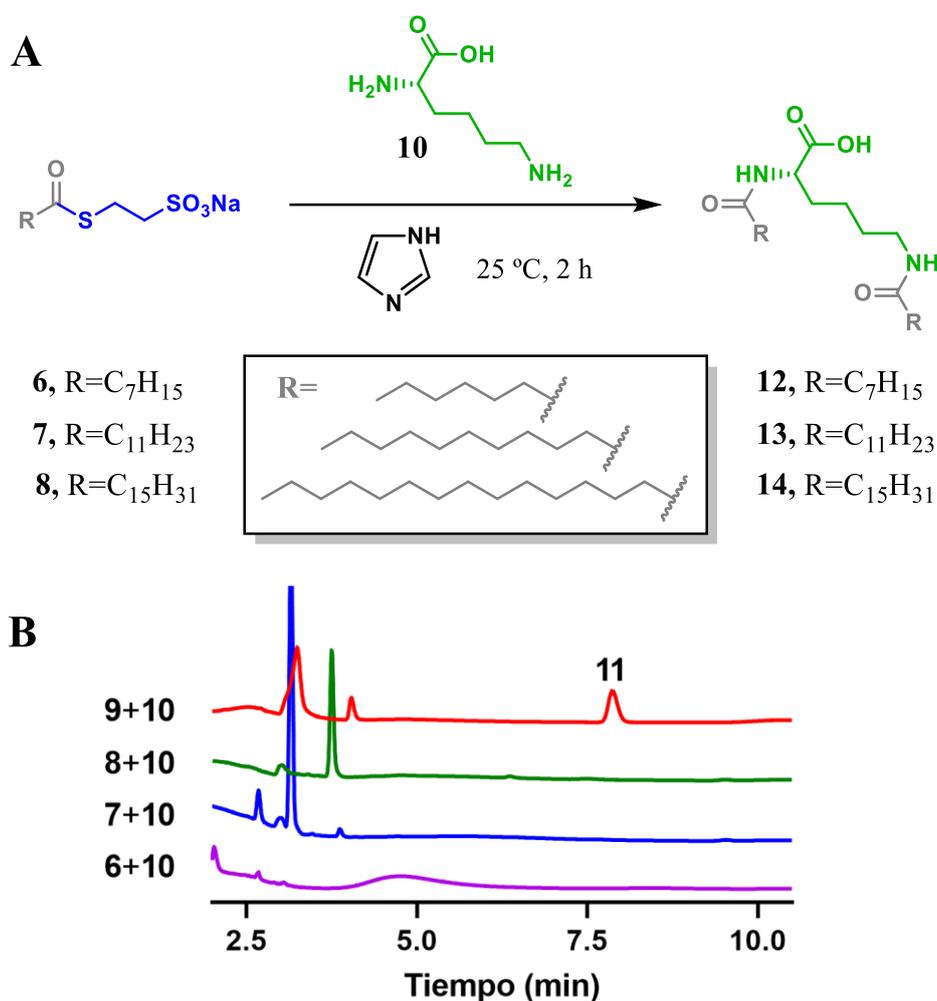


Figura 12. Reacción de aminólisis de los diferentes tioésteres de MESNA con *L*-lisina en presencia de imidazol. A) Esquema de la reacción. B) Cromatogramas obtenidos para las reacciones con: tiocaprilato **6** (morado), tiolaurato **7** (azul), tiopalmitato **8** (verde) y tioleato **9** (rojo).

Decidimos a continuación llevar a cabo la reacción de aminólisis en disolvente orgánico, pudiendo así preparar y aislar de manera sencilla un estándar del producto de la reacción. Además, la facilidad que aporta el disolvente orgánico para aumentar el escalado de la reacción, nos permitirá la obtención de una mayor cantidad de producto diacilado, favoreciendo su completa caracterización. Para lograr este objetivo, el ácido oleico (**5**) disuelto en diclorometano se trató a 0 °C con el agente de acoplamiento 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridinio3-óxido hexafluorofosfato (HATU) en presencia de la base *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA), permitiendo así la preactivación del ácido carboxílico. Finalmente, se añadió el aminoácido *L*-lisina (**10**) y se dejó reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. El análisis por HPLC de una alícuota de la reacción mostró la aparición de un nuevo pico a un t_R de 7,90 min, el cual se corresponde con el compuesto diacilado **11**. De esta forma, corroboramos que el producto obtenido para ambas condiciones de reacción (agua y diclorometano) era el mismo.

Posteriormente, se purificó el producto deseado mediante HPLC a través de una columna semipreparativa, observando su presencia a un t_R de 16,76 min para el método utilizado. Una vez recogidas las fracciones correspondientes a este pico, se concentraron para eliminar los disolventes (agua y metanol de calidad HPLC). El residuo aislado se diluyó en MeOH y se inyectó en el HPLC a través de una columna analítica, pudiendo corroborar así la presencia del producto diacilado **11** esperado y validar su pureza. Dicho análisis mostró el compuesto **11** deseado en forma de un solo pico a un t_R de 7,20 min (Figura 13).

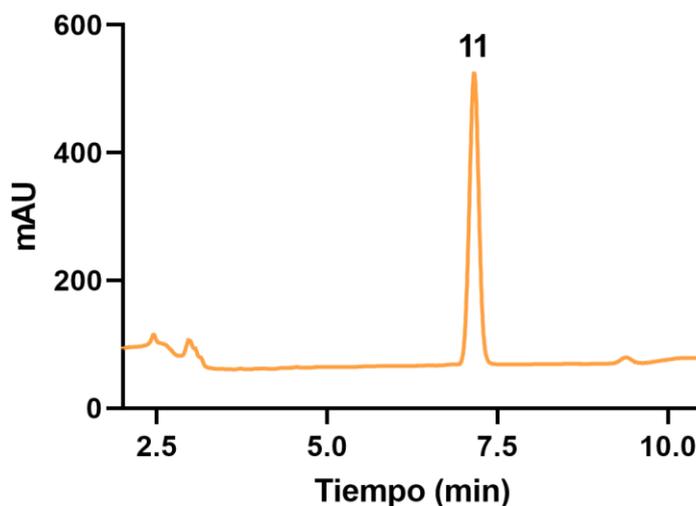


Figura 13. Cromatograma correspondiente al compuesto **11** puro.

Una vez distribuido el producto en diferentes viales, se pesó (cantidad total resultante: 24,5 mg) y se comprobó que el rendimiento obtenido fue del 53%.

El compuesto **11** se caracterizó mediante espectroscopía de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, cuyos resultados se pueden observar en las Figuras A9 y A10. Los espectros recogidos permitieron identificarlo convenientemente, siendo clave las señales de los seis protones correspondientes a los grupos metilo (señal 18) y los cuatro protones correspondientes a los dobles enlaces de las cadenas de ácido graso (señales 9 y 10), las cuales nos sirven para corroborar que se ha producido la diacilación. Además, se observa una señal correspondiente al protón del aminoácido (señal 2'), lo que indica que la cabeza polar de nuestro sistema proveniente de la *L*-lisina está presente.

El producto de la aminólisis también se caracterizó mediante espectrometría de masas, observándose una señal con una relación m/z de 697,54 (Figura A11). A pesar de no ser el peso molecular exacto del compuesto (P_M (**11**) = 675,11 g/mol), la presencia habitual de átomos de sodio en disoluciones acuosas provocó la aparición del aducto $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (P_M = 698,09 g/mol). De esta forma, la espectrometría de masas permitió también corroborar la obtención del producto esperado.

2.2.2 Ligación química nativa

La segunda reacción empleada para la síntesis de moléculas anfifílicas aminoácido-lípido autoensamblantes fue la ligación química nativa (NCL; del inglés, *Native Chemical Ligation*). Esta reacción es típicamente utilizada en la síntesis de péptidos. Inicialmente, tiene lugar un intercambio de tioles entre un péptido tioéster C-terminal y el grupo sulfhidrilo de una cisteína residual *N*-terminal de otro péptido. El posterior ataque nucleofílico del grupo amino de la cisteína da lugar a la formación de un enlace amida, obteniendo así la construcción del péptido deseado.

En 2014, Brea *et al.* emplearon esta reacción para acoplar en fase acuosa y de forma quimioselectiva tioésteres de cadena larga con lisofosfolípidos funcionalizados con cisteína, generando así fosfolípidos *in situ* capaces de autoensamblarse en vesículas lipídicas (Figura 14). Las ventajas de este método frente a otros utilizados previamente para la construcción de células sintéticas radicaban en la utilización de precursores solubles en agua y la ausencia de catalizadores.²³ Estudios posteriores permitieron acoplar la NCL a la utilización de enzimas, permitiendo obtener lípidos artificiales *in situ* de

forma quimioenzimática. Estos lípidos no canónicos tienen un enorme potencial para llevar a cabo estudios del origen de la vida, análisis de señalización celular y fabricación de sistemas de liberación de fármacos.²⁴

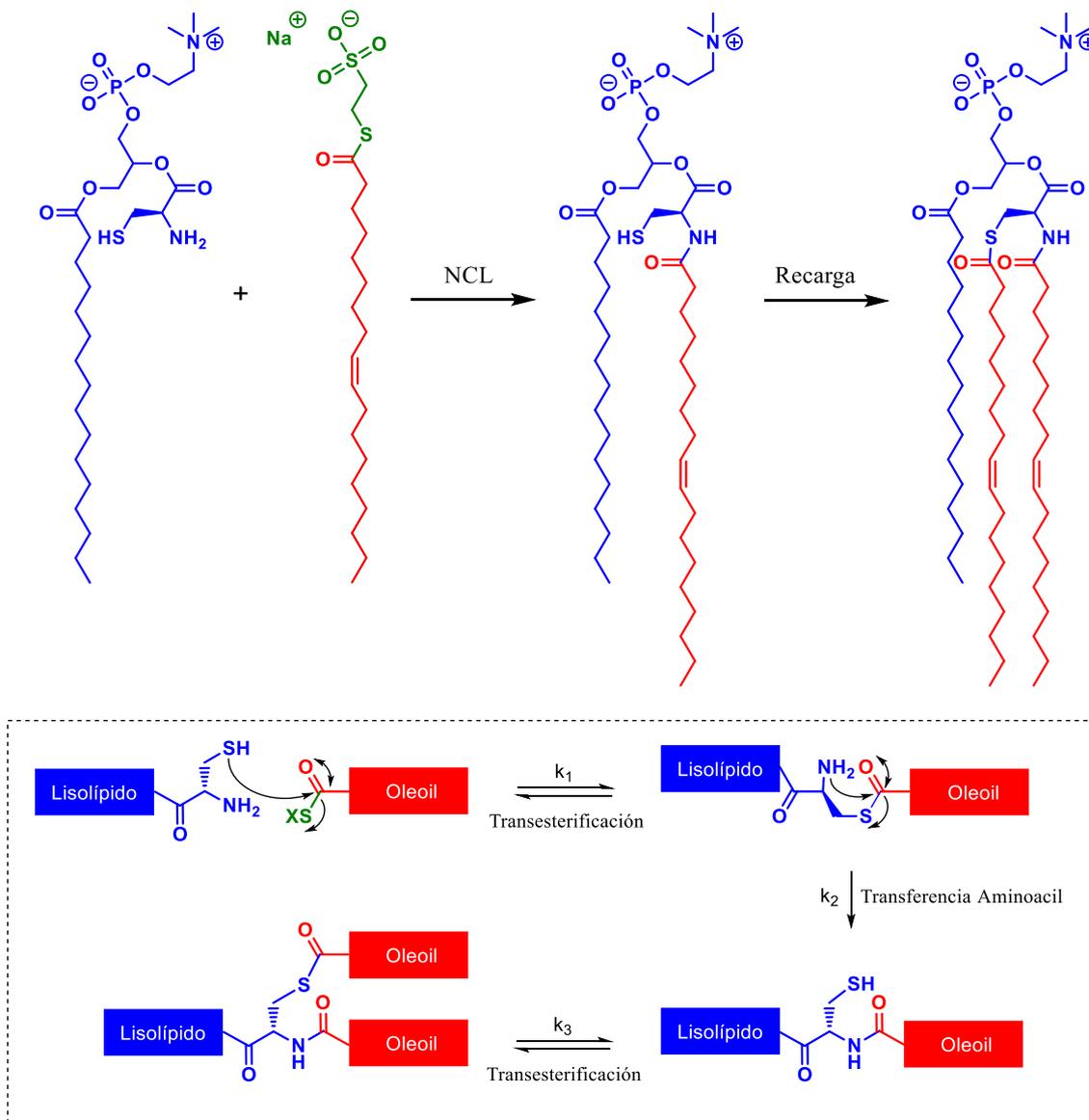


Figura 14. Representación esquemática y mecanismo de la reacción de NCL para la obtención de biomiméticos fosfolípidicos [Adaptado de Brea *et al.*²³].

En nuestro caso particular, también se empleó una reacción de NCL para la formación de las moléculas anfifílicas responsables de la construcción de la célula sintética. Sin embargo, en vez de utilizar como parte hidrofílica un lisofosfolípido funcionalizado con cisteína, se utiliza únicamente el aminoácido *L*-cisteína, el cual es una molécula no anfifílica. Esto permite simplificar la reacción manteniendo la

quimioselectividad. Además, se emplea un componente prebiótico mucho más plausible (*L*-Cys), lo que hace que este trabajo entre en el marco de estudio del origen de la vida.

En primer lugar, se hizo reaccionar los diferentes tioésteres de MESNA (**6-9**) con la *L*-cisteína (**15**) en una disolución acuosa 100 mM de tampón HEPES, pH=8 conteniendo el agente reductor TCEP·HCl (responsable de evitar la formación de enlaces disulfuro) durante 48 h a temperatura ambiente (Figura 15).

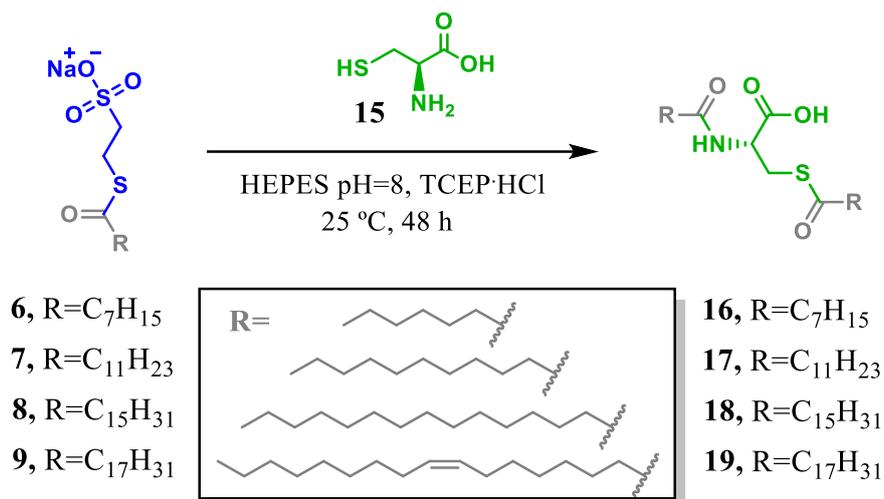


Figura 15. Reacción de NCL llevada a cabo entre diferentes tioésteres de MESNA (**6-9**) y *L*-cisteína (**15**).

El estudio exhaustivo por HPLC de las diferentes reacciones mostró que la NCL que daba lugar a mejores conversiones era la que empleaba como precursor el tiolaurato de MESNA (**7**). La reacción de dicho tioéster con *L*-cisteína (**15**) condujo a la formación del producto dilaurado **17**, tal y como se muestra en el cromatograma de la Figura 16.

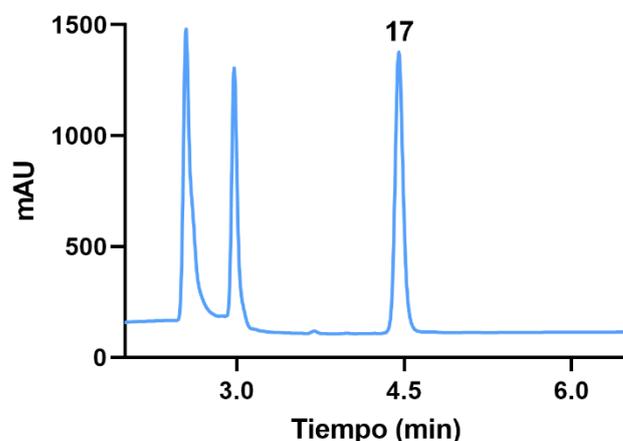


Figura 16. Cromatograma obtenido de la reacción de NCL entre el tiolaurato de MESNA (**7**) y *L*-cisteína (**15**).

El conjugado aminoácido-lípido **17** se corresponde con el pico situado a un t_R de 4,45 min.

Tras comprobar la formación del producto dilipidado, se decidió escalar la reacción empleando cantidades de precursores y concentraciones mucho mayores, pudiendo así purificar finalmente una cantidad considerable del producto **17**. Utilizando una columna semipreparativa, se observó como el compuesto deseado aparecía a un t_R de 10,21 min. El análisis de HPLC en columna analítica de una pequeña alícuota del residuo aislado permitió validar su alta pureza (Figura 17).

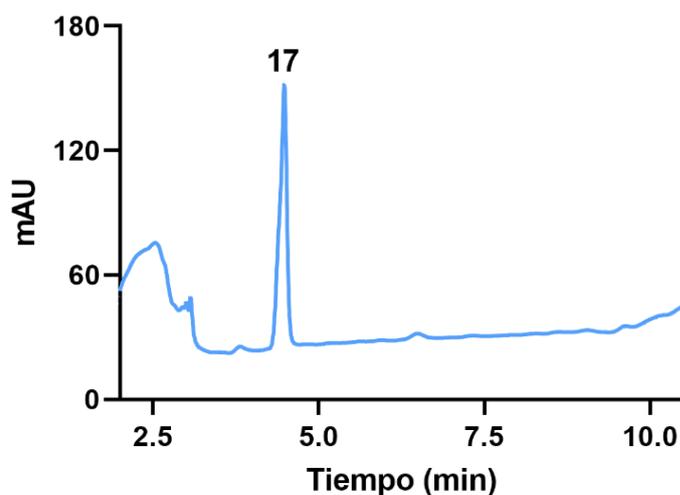


Figura 17. Cromatograma del compuesto **17** puro.

Tras el aislamiento del producto se comprobó que la cantidad obtenida fue de 1,88 mg, lo que se corresponde con un rendimiento del 47%.

El compuesto **17** se caracterizó por ^1H -RMN, 1D-TOCSY, ^1H - ^1H COSY y HSQC-Editado (Figuras A12-A14). Esto permitió identificarlo adecuadamente, siendo clave las señales de los grupos metilo (señal 18) para confirmar la diacilación y la señal del protón H-C (señal 2''), confirmando que la cabeza polar de la cisteína también estaba presente. Desafortunadamente, la cantidad de producto obtenida no fue suficiente como para llevar a cabo una caracterización adecuada por ^{13}C -RMN. Cabe destacar que se realizó un estudio de espectrometría de masas con el fin de corroborar que el compuesto obtenido era el deseado (Figura A15). De este modo, se pudo observar la aparición de una señal con una relación m/z de 486,36, que se corresponde con el P_M del compuesto ($P_M = 485,35$ g/mol) más la masa del protón $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ ($P_M = 486,35$ g/mol).

Una vez confirmada la obtención de los compuestos **11** y **17**, se procedió al estudio de su proceso de autoensamblaje en disolución acuosa mediante la observación por microscopía óptica de las posibles estructuras supramoleculares formadas, lo que se recoge en el siguiente apartado.

3. Estudios de microscopía

En primer lugar, para poder llevar a cabo los estudios de microscopía, se generó la película lipídica o *Lipid Film* de los derivados diacilados **11** y **17**. Dichas películas fueron posteriormente hidratadas con una disolución 100 mM de tampón fosfato (PB) a pH 7,4, dando lugar finalmente a disoluciones turbias. Las suspensiones resultantes fueron monitoreadas mediante microscopía óptica en campo claro, observando la presencia de numerosas vesículas de tamaño micrométrico con bastante tendencia a agregarse.

Respecto a las vesículas obtenidas para el producto **11** resultante de la reacción de aminólisis del tioéster **9** y el aminoácido **10**, se observó la presencia de liposomas de diferente tamaño y morfología (Figura 18). Además, se pudo comprobar la presencia de un número considerable de estructuras tubulares. Dichas estructuras se suelen asociar a etapas tempranas de la hidratación, y habitualmente tienden a transformarse en estructuras vesiculares esféricas con el paso del tiempo.

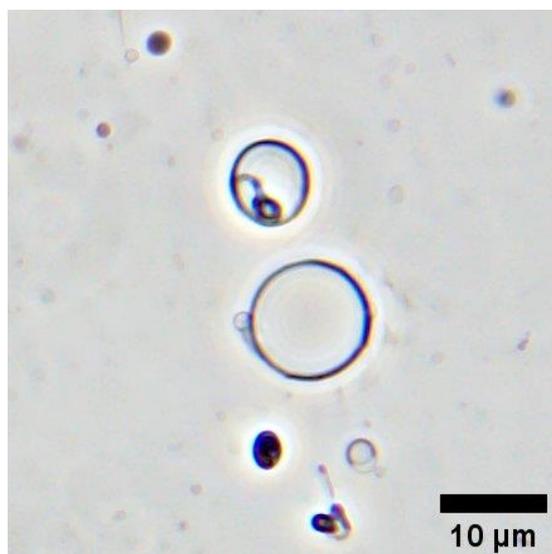


Figura 18. Fotografía de las vesículas del derivado **11** tomada en el microscopio óptico en campo claro (objetivo 100X).

A continuación, se añadió el fluoróforo marcador de membranas *Nile Red* (concentración final: 0.1 mol%) a una alícuota de la muestra de **11** previamente hidratada.

Debido a que las vesículas lipídicas son estructuras esféricas cerradas, se esperaba que este compuesto tiñera únicamente la membrana. Este hecho fue confirmado mediante empleo del microscopio óptico de fluorescencia (Figura 19).

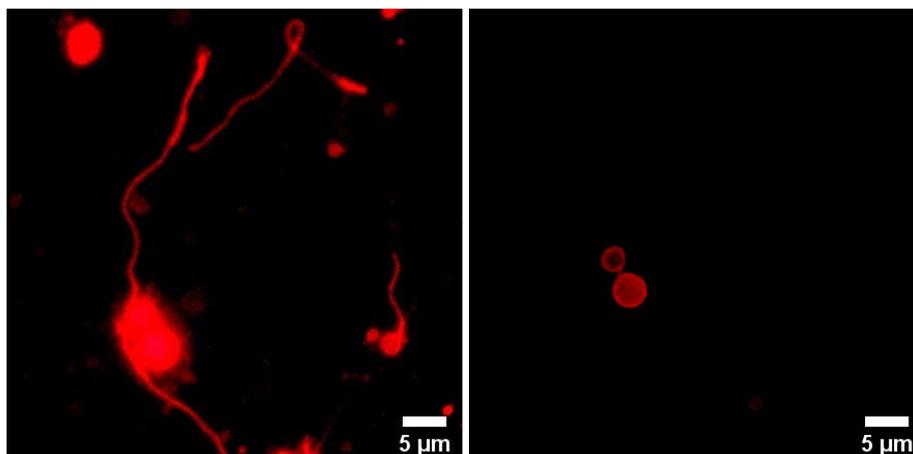


Figura 19. Microscopía de fluorescencia (objetivo 100X). Imagen de las estructuras tubulares (*izquierda*) frente a las vesiculares (*derecha*).

Por su parte, el compuesto **17**, resultante de la reacción del aminoácido **15** con el tiolaurato (**7**), generó liposomas de menor tamaño (Figura 20). Este hecho es debido fundamentalmente a la alta dificultad en el autoensamblaje y la baja fluidez que presenta el compuesto dilaurado **17** frente al dioleilado **11**, como consecuencia de la menor longitud de cadena (12 carbonos frente a 18) y la ausencia de dobles enlaces (colas saturadas frente a insaturadas). Cabe resaltar que la temperatura de transición que media el proceso gel/líquido en el caso de **17** debería ser mayor que para **11**, por lo que, para favorecer la formación vesicular, se llevó a cabo la hidratación a 37 °C.

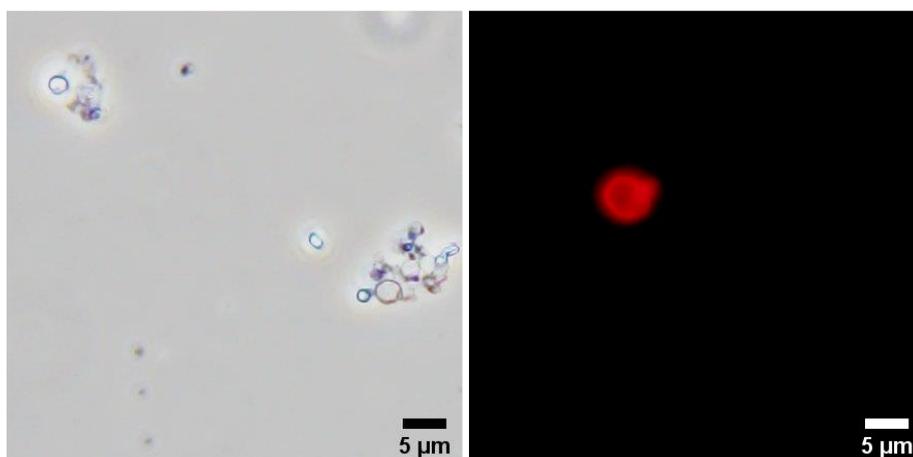


Figura 20. Fotografía de las vesículas formadas del derivado **17** tomada en el microscopio óptico (objetivo 100X) en campo claro (*izquierda*) y fluorescencia (*derecha*).

CONCLUSIONES

Atendiendo a los objetivos propuestos y a los resultados obtenidos a partir de las dos estrategias sintéticas diseñadas para la construcción de células artificiales, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se han sintetizado y caracterizado distintos precursores tioésteres (**6-9**) solubles en agua. Se ha comprobado que la longitud de la cadena y la presencia de insaturaciones afecta de forma considerable a las reacciones que median la formación de vesículas. De esta manera, se observó que el tiooleato de MESNA era el precursor más adecuado para la aminólisis directa y el tiolaurato de MESNA para la ligación química nativa.
- Se han sintetizado dos aminoácidos diacilados (**11** y **17**) mediante aminólisis directa y ligación química nativa, respectivamente.
- Se han caracterizado los conjugados aminoácido-lípido mediante espectroscopía de RMN y espectrometría de masas. Tras su hidratación, se comprobó su autoensamblaje en forma de vesículas de tamaño micrométrico mediante microscopía óptica de campo claro y fluorescencia, corroborando así la generación de una nueva clase de células sintéticas.

El estudio de este nuevo modelo de vesículas aminoácido-lipídicas como eficientes células artificiales funcionales no ha hecho más que comenzar. Cada vez son más los grupos de investigación capaces de sintetizar lípidos *in situ*, tanto naturales como artificiales, mediante la utilización de diferentes reacciones químicas y/o enzimáticas.²⁵ El empleo de estas metodologías permitirá la fabricación precisa de células sintéticas aminoácido-lípido con importantes aplicaciones en el campo de los biorreactores, el origen de la vida o el transporte y liberación de fármacos.

CONCLUSIÓNS

Atendendo aos obxectivos propostos e aos resultados obtidos a partir das dúas estratexias sintéticas deseñadas para a construción de células artificiais, pódense extraer as seguintes conclusións:

- Sintetizáronse e caracterizáronse distintos precursores tioésteres (**6-9**) solubles en auga. Comprobouse que a lonxitude da cadea e a presenza de insaturacións afecta de forma considerable ás reaccións que median a formación de vesículas. Desta maneira, observouse que o tiooleato de MESNA era o precursor máis adecuado para a aminólisis directa e o tiolaurato de MESNA para a ligadura química nativa.
- Sintetizáronse dous aminoácidos diacilados (**11 e 17**) mediante aminólisis directa e ligadura química nativa, respectivamente.
- Caracterizáronse os conxugados aminoácido-lípido mediante espectroscopia de RMN e espectrometría de masas. Tras a súa hidratación, comprobouse o seu autoensamblaxe en forma de vesículas de tamaño micrométrico mediante microscopía óptica de campo claro e fluorescencia, corroborando así a xeración dunha nova clase de células sintéticas.

O estudo deste novo modelo de vesículas aminoácido-lipídicas como eficientes células artificiais funcionais non fixo máis que comezar. Cada vez son máis os grupos de investigación capaces de sintetizar lípidos *in situ*, tanto naturais como artificiais, mediante a utilización de diferentes reaccións químicas e/ou encimáticas.²⁵ O emprego destas metodoloxías permitirá a fabricación precisa de células sintéticas aminoácido-lípido con importantes aplicacións no campo dos biorreactores, a orixe da vida ou o transporte e liberación de fármacos.

CONCLUSIONS

Based on the proposed objectives and the results obtained from the two synthetic strategies designed for the construction of artificial cells, the following conclusions can be drawn:

- Different water-soluble thioester precursors (**6-9**) have been synthesized and characterized. It has been found that chain length and the presence of unsaturations significantly affect the reactions mediating vesicle formation. Thus, MESNA thiooleate was found to be the most suitable precursor for direct aminolysis and MESNA thiolaurate for native chemical ligation.
- Two amino acid diacylates (**11** and **17**) have been synthesized by direct aminolysis and native chemical ligation, respectively.
- The amino acid-lipid conjugates have been characterized by NMR spectroscopy and mass spectrometry. After hydration, their self-assembly in the form of micrometer-sized vesicles was verified by brightfield and fluorescence optical microscopy, corroborating the generation of a new class of synthetic cells.

The study of this new model of amino acid-lipid vesicles as efficient functional artificial cells has only just begun. More research groups are able to synthesize lipids *in situ*, both natural and artificial, by using different chemical and/or enzymatic reactions²⁵. The use of these methodologies will allow the precise fabrication of amino acid-lipid synthetic cells with important applications in the field of bioreactors, the origin of life or the transport and release of drugs.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

1. Materiales y métodos

1.1 Reactivos, disolventes y otros

Los reactivos y disolventes comerciales no fueron modificados ni purificados previamente antes de ser empleados en la síntesis. Para trabajar bajo atmósfera inerte se utilizó la línea de nitrógeno.

Tabla 1. Reactivos utilizados en la síntesis química.

REACTIVOS	PROVEEDOR
1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol[4,5- <i>b</i>]piridinio 3-óxido hexafluorofosfato (HATU)	Fluorochem
2-Mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA)	BLD Pharmatech
4-Dimetilaminopiridina (DMAP)	Fluorochem
Ácido dodecanoico	BLD Pharmatech
Ácido octanoico	BLD Pharmatech
Ácido oleico	BLD Pharmatech
Ácido palmítico	BLD Pharmatech
<i>L</i> -cisteína	BLD Pharmatech
Hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC·HCl)	BLD Pharmatech
Hidrocloruro de tris(2-cloroetil)fosfato (TCEP·HCl)	BLD Pharmatech
Imidazol	BLD Pharmatech
<i>L</i> -lisina	BLD Pharmatech
<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina (DIEA)	TCI Chemicals

Tabla 2. Disolventes utilizados en la síntesis química.

DISOLVENTES	PROVEEDOR
Acetato de etilo, <i>ExpertQ</i>	Scharlau
Acetonitrilo, <i>UHPLC-MS</i>	Scharlau
Agua, <i>UHPLC-MS</i>	Scharlau
Cloroformo, <i>HPLC Grade</i>	Scharlau
Diclorometano anhidro, <i>99.9%</i>	Scharlau
Dimetilsulfóxido D6 <i>>99,8% D</i>	Fluorochem
Metanol D4 <i>>99,8% D</i>	Fluorochem
Metanol, <i>Supragradient HPLC Grade</i>	Scharlau

Tabla 3. Tampones utilizados en la síntesis química.

TAMPONES	PROVEEDOR
Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES)	Fluorochem
Fosfato sódico dibásico	BLD Pharmatech
Fosfato sódico monobásico	BLD Pharmatech

1.2 Técnicas e instrumentos de laboratorio

- **Hidratación de películas lipídicas.** Se trata de una técnica que permite generar vesículas lipídicas. Para ello, el producto diacilado (**11** o **17**) resultante de las diferentes reacciones (aminólisis o NCL, respectivamente) y con capacidad de autoensamblarse en vesículas se situó inicialmente en un vial de 1,5 mL. Posteriormente, se disolvió en cloroformo de grado HPLC (concentración final de 2,5 mM). A continuación, se evaporó el disolvente orgánico empleando una corriente de N₂, obteniendo así una película fina distribuida por las paredes del vial. Dicha película se secó a vacío en un desecador durante 2 h. Una vez

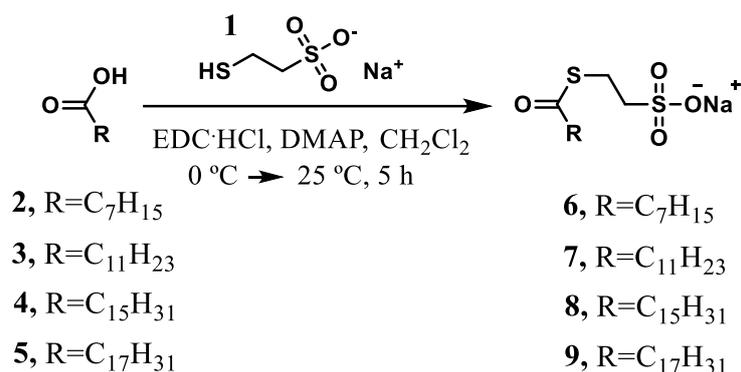
transcurrido ese tiempo, se añadió la disolución acuosa deseada (agua, tampón HEPES a pH=7,4, tampón fosfato a pH=7,4 o tampón fosfato a pH=8). Finalmente, el vial correspondiente se situó en un minirotador y la película lipídica se hidrató por rotación lenta durante 1 h.

- **Microscopía óptica (campo claro y fluorescencia).** Se utilizó el microscopio confocal *AIR* (Nikon) perteneciente a los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI). También se empleó el microscopio óptico Olympus BX53 del laboratorio del grupo BioMemChem. Como fluoróforo marcador de membranas se empleó *Nile Red* en una concentración final de 0,1 mol%.

2. Procedimientos experimentales

2.1 Obtención de los tioésteres de MESNA

Procedimiento general



En un matraz de fondo redondo de 25 mL con barra agitadora, previamente secado en estufa y purgado con N₂, se disolvió el ácido graso (**2**: 96,6 mg; **3**: 134,2 mg; **4**: 172,8 mg o **5**: 189,2 mg; 670 μmol) en 5 mL de diclorometano anhidro a 0 °C. A continuación, se añadió EDC·HCl (128,4 mg, 670 μmol) y DMAP (7,4 mg, 60,9 μmol). Tras agitar durante 10 min, se añadió MESNA (**1**) y se dejó agitando a temperatura ambiente durante 5 h.

Una vez terminada la reacción, la mezcla se extrajo con agua (2 x 3 mL) y las fases acuosas combinadas se lavaron con acetato de etilo (3 mL). Tras evaporar el agua a presión reducida, se lavó el residuo sólido con acetonitrilo (5 mL) y se filtró a vacío, dando lugar al tioéster deseado en forma de sólido blanco (**6**: 74,9 mg; **7**: 130,1 mg; **8**: 47,2 mg o **9**: 63,4 mg).

Tiocaprilato de MESNA (6). Aspecto: sólido blanco. Rendimiento: 42%. ¹H RMN (300,13 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 3,06-3,00 (m, 2H, 1 × CH₂); 2,61-2,50 (m, 4H, 2 × CH₂); 1,57-1,50 (m, 2H, 1 × CH₂); 1,29-1,22 (m, 8H, 4 × CH₂); 0,85 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, 1 × CH₃). ¹³C RMN (125,77 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 206,5; 198,7; 50,9; 43,3; 31,1; 30,7; 28,2; 25,1; 24,3; 22,0; 13,91. (-)-LRESI-MS *m/z* 267,07 (M-Na)⁺.

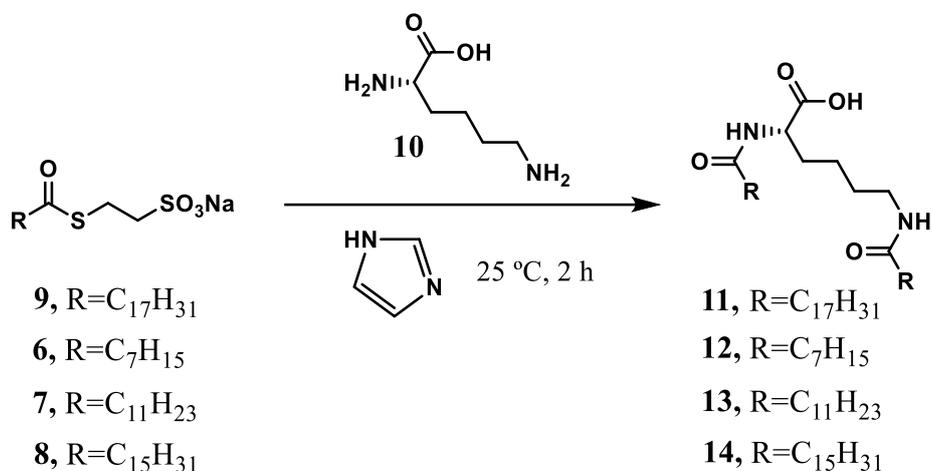
Tirolaurato de MESNA (7). Aspecto: sólido blanco. Rendimiento: 62%. ¹H RMN (300,13 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 3,03-3,00 (m, 2H, 1 × CH₂); 2,58-2,51 (m, 4H, 2 × CH₂); 1,53 (q, *J* = 7 Hz, 2H, 1 × CH₂); 1,31-1,24 (m, 16H, 8 × CH₂); 0,84 (t, *J* = 5,1 Hz, 3H, 1 × CH₃). ¹³C RMN (125,77 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 199,2; 51,4; 43,7; 31,8; 29,4; 29,3; 29,2; 29,1; 28,7; 25,5; 24,8; 22,6; 14,5. (-)-LRESI-MS *m/z* 323,14 (M-Na)⁺.

Tiopalmítico de MESNA (8). Aspecto: sólido blanco. Rendimiento: 19%. ¹H RMN (300,13 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 3,10-2,99 (m, 2H, 1 × CH₂); 2,64-2,51 (m, 4H, 2 × CH₂); 1,56-1,52 (m, 2H, 1 × CH₂); 1,34-1,14 (m, 24H, 12 × CH₂); 0,85 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, 1 × CH₃). ¹³C RMN (125,77 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 198,7; 50,9; 43,3; 31,3; 29,1; 29,1; 29,1; 29,0; 29,0; 29,0; 28,9; 28,8; 28,7; 28,2; 25,1; 24,3; 22,1; 14,0. (-)-LRESI-MS *m/z* 379,20 (M-Na)⁺.

Tiooleato de MESNA (9). Aspecto: sólido blanco. Rendimiento: 28%. ¹H RMN (300,13 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 5,36-5,16 (m, 2H, 2 × CH); 3,05-2,85 (m, 2H, 1 × CH₂); 2,60-2,51 (m, 4H, 2 × CH₂); 1,98-1,94 (m, 4H, 2 × CH₂); 1,48 (q, *J* = 7,4 Hz, 2H, 1 × CH₂); 1,34-1,08 (m, 24H, 12 × CH₂); 0,85 (t, *J* = 5,7 Hz, 3H, 1 × CH₃). ¹³C RMN (125,77 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 198,7; 129,8; 129,7; 51,0; 43,4; 31,4; 29,2; 29,1; 28,9; 28,8; 28,7; 28,6; 28,5; 28,3; 26,7; 26,6; 25,1; 24,4; 22,2; 14,1. (-)-LRESI-MS *m/z* 405,21 (M-Na)⁺.

2.2 Reacción de aminólisis directa en agua

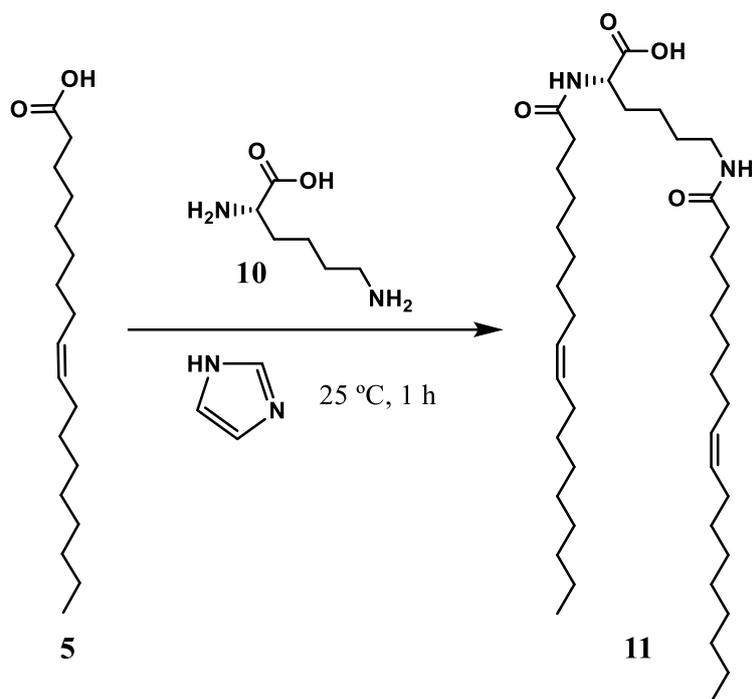
Procedimiento general



En un vial de 1.5 mL conteniendo una barra agitadora y 500 μ L de agua milliQ se añadió el tioéster deseado (**6**: 0,36 mg; **7**: 0,87 mg; **8**: 1,01 mg o **9**: 1,07 mg; 2,5 μ mol), el aminoácido *L*-lisina (0,18 mg, 1,25 μ mol) y el imidazol (51,06 mg, 750 μ mol). La mezcla se dejó agitando durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se inyectó una pequeña alícuota de la muestra en el HPLC, observando la formación del producto diacilado **11**.

***N* α ,*N* ϵ -dioleoil-*L*-lisina (11). HPLC:** $t_R = 7,87$ min (*Columna: Eclipse Plus C8 analítica, Método: Lucía_diacilación_3; Fase A: H₂O con 0,1% de ácido fórmico; Fase B: MeOH con 0,1% de ácido fórmico; 50-95% Fase B en Fase A, de 0 a 1 min; 95% Fase B en Fase A, de 1 a 8 min; 95-100% Fase B de 8 a 10 min; 100% Fase B de 10 a 13 min; 100-50% Fase B en Fase A de 13 a 15 min*).

2.3 Reacción de aminólisis en disolvente orgánico



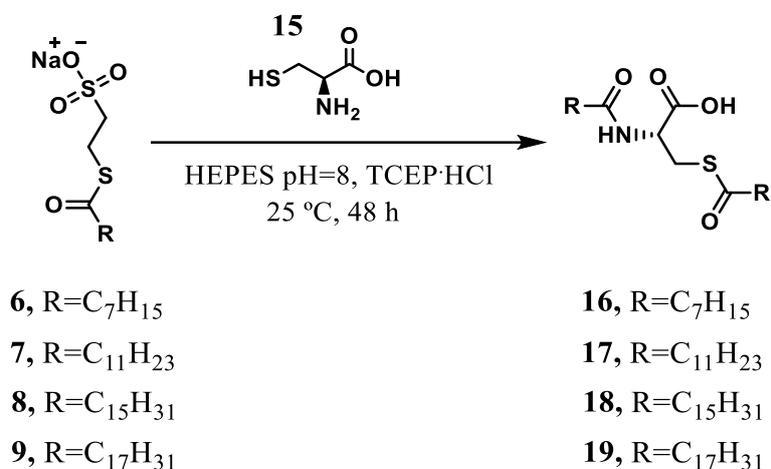
En un matraz de fondo redondo de 25 mL seco conteniendo una barra agitadora y purgado con N₂ se disolvió ácido oleico (**5**) (57,96 mg, 205 μmol) en 700 μL de diclorometano anhidro a 0 °C. A continuación, se añadió sucesivamente HATU (78,03 mg, 205 μmol) y DIEA (95,3 μL, 547,2 μmol). Tras 10 minutos de agitación, se adicionó la L-Lisina (10,0 mg, 68,4 μmol) y la mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se evaporó el disolvente mediante el uso de una corriente de N₂. El residuo obtenido se disolvió en MeOH y se purificó por HPLC, dando lugar a 24,5 mg de producto diacilado.

N α ,N ϵ -dioleoil-L-lisina (11). **Aspecto:** aceite transparente. **Rendimiento:** 53%. **¹H RMN** (300,13 MHz, MeOH-*d*₄, δ): 5,50-5,29 (m, 4H, 4 \times CH); 4,35 (dd, J = 9 Hz; 4,7 Hz; 1H, 1 \times CH); 3,20-3,14 (m, 2H, 1 \times CH₂); 2,24 (d, J = 7,7 Hz, 8H, 4 \times CH₂); 2,16 (t, J = 7,4 Hz, 2H, 1 \times CH₂); 2,06-1,99 (m, 8H, 4 \times CH₂); 1,76-1,58 (m, 6H, 3 \times CH₂); 1,34-1,19 (m, 44H, 22 \times CH₂); 0,90 (t, J = 6,9 Hz, 6H, 2 \times CH₃). **¹³C RMN** (125,77 MHz, MeOH-*d*₄, δ): 210,0; 176,2; 130,8; 53,8; 37,2; 33,1; 30,9; 30,9; 30,7; 30,5; 30,4; 30,4; 30,3; 30,3; 28,2; 27,0; 24,2; 23,8; 14,5. **HPLC:** t_R = 7,90 min (Columna: Eclipse Plus C8 analítica, Método: Lucía_diacilación_3; Fase A: H₂O con 0,1% de ácido fórmico; Fase B: MeOH con 0,1% de ácido fórmico; 50-95% Fase B en Fase A, de 0 a 1 min; 95% Fase B en Fase A, de 1 a 8 min; 95-100% Fase B de 8 a 10 min; 100% Fase B de 10 a 13 min;

100-50% *Fase B* en *Fase A* de 13 a 15 min). **HPLC (purificación):** $t_R = 16,76$ min (*Columna: Zorbax SB-C18; Método: Lucía_Semiprep; Fase A: H₂O con 0,1% de ácido fórmico; Fase B: MeOH con 0,1% de ácido fórmico; 50-95% Fase B en Fase A, de 0 a 3 min; 95-100% Fase B en Fase A, de 3 a 5 min; 100% Fase B de 5 a 25 min; 100-50% Fase B en Fase A de 25 a 27 min; 50% Fase B en Fase A, de 27 a 30 min*). **(+)-LRESI-MS** m/z 697,54 ($M+Na$)⁺.

2.4 Ligación Química Nativa (NCL)

Procedimiento general



En un vial de 1.5 mL que dispone de una barra agitadora se disolvió el tioéster de MESNA (**6**: 0,36 mg; **7**: 0,50 mg; **8**: 1,01 mg o **9**: 1,07 mg; 2,5 μmol) y el aminoácido *L*-cisteína (0,15 mg; 1,25 μmol) en 500 μL de disolución tampón 100 mM de HEPES pH=8 conteniendo el agente reductor TCEP·HCl (2,87 mg; 5 μmol). La mezcla de reacción se agitó durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, se inyectó una pequeña alícuota de la muestra en el HPLC (únicamente de la reacción a partir de **7**), observando la formación del producto diacilado **17**.

***N,S*-dilaureoil-*L*-cisteína (**17**). Aspecto:** aceite transparente. **Rendimiento:** 47%. **¹H RMN** (300,13 MHz, MeOH-*d*₄, δ): 4,60 (s, 1H, 1 \times CH); 3,55 (dd, 1H, 1 \times CH); 3,20 (dd, 1H, 1 \times CH); 2,56 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, 1 \times CH₂); 2,20 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, 1 \times CH₂); 1,61 (m, 4H, 2 \times CH₂); 1,30 (m, 32H, 16 \times CH₂); 0,84 (t, $J = 5,1$ Hz, 6H, 2 \times CH₃). **(+)-LRESI-MS** m/z 486,36 [$M+H$]⁺.

3. Técnicas de caracterización

Las técnicas de caracterización utilizadas para confirmar la identidad de los compuestos sintetizados fueron:

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Los cromatogramas fueron obtenidos en el cromatógrafo *Agilent 1260 Infinity II* del laboratorio BioMemChem. Las fases móviles empleadas estaban constituidas por H₂O con 0,1% de ácido fórmico (*Fase A*) y MeOH con 0,1% de ácido fórmico (*Fase B*). Para el análisis de las muestras se empleó una columna analítica Eclipse Plus C8, mientras que para la purificación de las muestras se utilizó una columna semipreparativa Zorbax SB-C18.

Resonancia magnética nuclear (RMN). Los espectros de ¹H-RMN fueron obtenidos en el espectrómetro *Bruker Avance 300 MHz* del CICA. Por otro lado, el espectro de ¹³C-RMN del producto diacilado **11** se adquirió en el espectrómetro *Bruker Avance 500 MHz* de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de A Coruña. Los tioésteres de MESNA (**6-9**) fueron disueltos en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆), mientras que los productos resultantes de la aminólisis (**11**) y de la NCL (**17**) fueron disueltos en metanol deuterado (MeOH-*d*₄).

Espectrometría de masas (MS). El espectro de masas del producto diacilado (**11**) resultante de la aminólisis se obtuvo utilizando la técnica de ionización electrospray (ESI) en un equipo de cromatografía líquido-líquido con detector de masas (*LC-MS*) - *Thermo Scientific - MSQ PLUS* localizado en el CICA. Por otro lado, los diferentes tioésteres de MESNA fueron analizados con la misma técnica de ionización, pero en el espectrómetro de masas *LTQ Orbitran Discovery* situado en el SAI, al igual que el producto diacilado (**17**) resultante de la NCL.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Lombard, J. Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biol. Direct* **2014**, *9*, 32. <https://doi.org/10.1186/s13062-014-0032-7>.
- (2) Xu, C.; Hu, S.; Chen, X. Artificial cells: From basic science to applications. *Mater. Today* **2016**, *19* (9), 516–532. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2016.02.020>.
- (3) Benner, S. A.; Sismour, A. M. Synthetic biology. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6* (7), 533–543. <https://doi.org/10.1038/nrg1637>.
- (4) Rawis, R. L. “Synthetic biology” makes its debut. *Chem. Eng. News* **2000**, *78* (17), 49–53. <https://doi.org/10.1021/cen-v078n017.p049>.
- (5) Elani, Y. Interfacing living and synthetic cells as an emerging frontier in synthetic biology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (11), 5602–5611. <https://doi.org/10.1002/anie.202006941>.
- (6) Chang, T. M. S. Semipermeable microcapsules. *Science* **1964**, *146* (3643), 524–525. <https://doi.org/10.1126/science.146.3643.524>.
- (7) Gaut, N. J.; Adamala, K. P. Reconstituting natural cell elements in synthetic cells. *Adv. Biol.* **2021**, *5* (3), 2000188. <https://doi.org/10.1002/adbi.202000188>.
- (8) Walde, P.; Wick, R.; Fresta, M.; Mangone, A.; Luisi, P. L. Autopoietic self-reproduction of fatty acid vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (26), 11649–11654. <https://doi.org/10.1021/ja00105a004>.
- (9) Kita, H.; Matsuura, T.; Sunami, T.; Hosoda, K.; Ichihashi, N.; Tsukada, K.; Urabe, I.; Yomo, T. Replication of genetic information with self-encoded replicase in liposomes. *ChemBioChem* **2008**, *9* (15), 2403–2410. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800360>.
- (10) Luisi, P. L.; Vonmont-bachmann, P. A.; Fresta, M.; Walde, P.; Wehrli, E. Self-reproduction of micelles and liposomes and the transition to life. *J.*

- Liposome Res.* **1993**, *3* (3), 631–638.
<https://doi.org/10.3109/08982109309150745>.
- (11) Guindani, C.; Silva, L. C.; Cao, S.; Ivanov, T.; Landfester, K. Synthetic cells: From simple bio-inspired modules to sophisticated integrated systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *134* (16), e202110855. <https://doi.org/10.1002/ange.202110855>.
- (12) Stano, P. Is research on “synthetic cells” moving to the next level? *Life* **2018**, *9* (1), 3. <https://doi.org/10.3390/life9010003>.
- (13) Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8*, 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.
- (14) Spoelstra, W. K.; Deshpande, S.; Dekker, C. Tailoring the appearance: What will synthetic cells look like? *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *51*, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.005>.
- (15) Chiarabelli, C.; Stano, P.; Luisi, P. L. Chemical approaches to synthetic biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20* (4), 492–497. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.08.004>.
- (16) Bhattacharya, A.; Devaraj, N. K. Tailoring the shape and size of artificial cells. *ACS Nano* **2019**, *13* (7), 7396–7401. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b05112>.
- (17) Krinsky, N.; Kaduri, M.; Zinger, A.; Shainsky-Roitman, J.; Goldfeder, M.; Benhar, I.; HersHKovitz, D.; Schroeder, A. Synthetic cells synthesize therapeutic proteins inside tumors. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7* (9), 1701163. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701163>.
- (18) Fendler, J. H. Microemulsions, micelles, and vesicles as media for membrane mimetic photochemistry. *J. Phys. Chem.* **1980**, *84* (12), 1485–1491. <https://doi.org/10.1021/j100449a012>.

- (19) Vance, J. A.; Devaraj, N. K. Membrane mimetic chemistry in artificial cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (22), 8223–8231. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c03436>.
- (20) Flores, J.; White, B. M.; Brea, R. J.; Baskin, J. M.; Devaraj, N. K. Lipids: Chemical tools for their synthesis, modification, and analysis. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (14), 4602–4614. <https://doi.org/10.1039/D0CS00154F>.
- (21) Li, Y.; Yongye, A.; Giulianotti, M.; Martinez-Mayorga, K.; Yu, Y.; Houghten, R. A. Synthesis of cyclic peptides through direct aminolysis of peptide thioesters catalyzed by imidazole in aqueous organic solutions. *J. Comb. Chem.* **2009**, *11* (6), 1066–1072. <https://doi.org/10.1021/cc900100z>.
- (22) Brea, R. J.; Bhattacharya, A.; Devaraj, N. K. Spontaneous phospholipid membrane formation by histidine ligation. *Synlett* **2017**, *28* (01), 108–112. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1588634>.
- (23) Brea, R. J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. *In situ* vesicle formation by native chemical ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (51), 14102–14105. <https://doi.org/10.1002/ange.201408538>.
- (24) Bhattacharya, A.; Cho, C. J.; Brea, R. J.; Devaraj, N. K. Expression of fatty acyl-CoA ligase drives one-pot *de novo* synthesis of membrane-bound vesicles in a cell-free transcription-translation system. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (29), 11235–11242. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c05394>.
- (25) Lomba-Riego, L.; Calvino-Sanles, E. Brea, R. J. *In situ* synthesis of artificial lipids. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2022**, *en prensa*.

ANEXOS

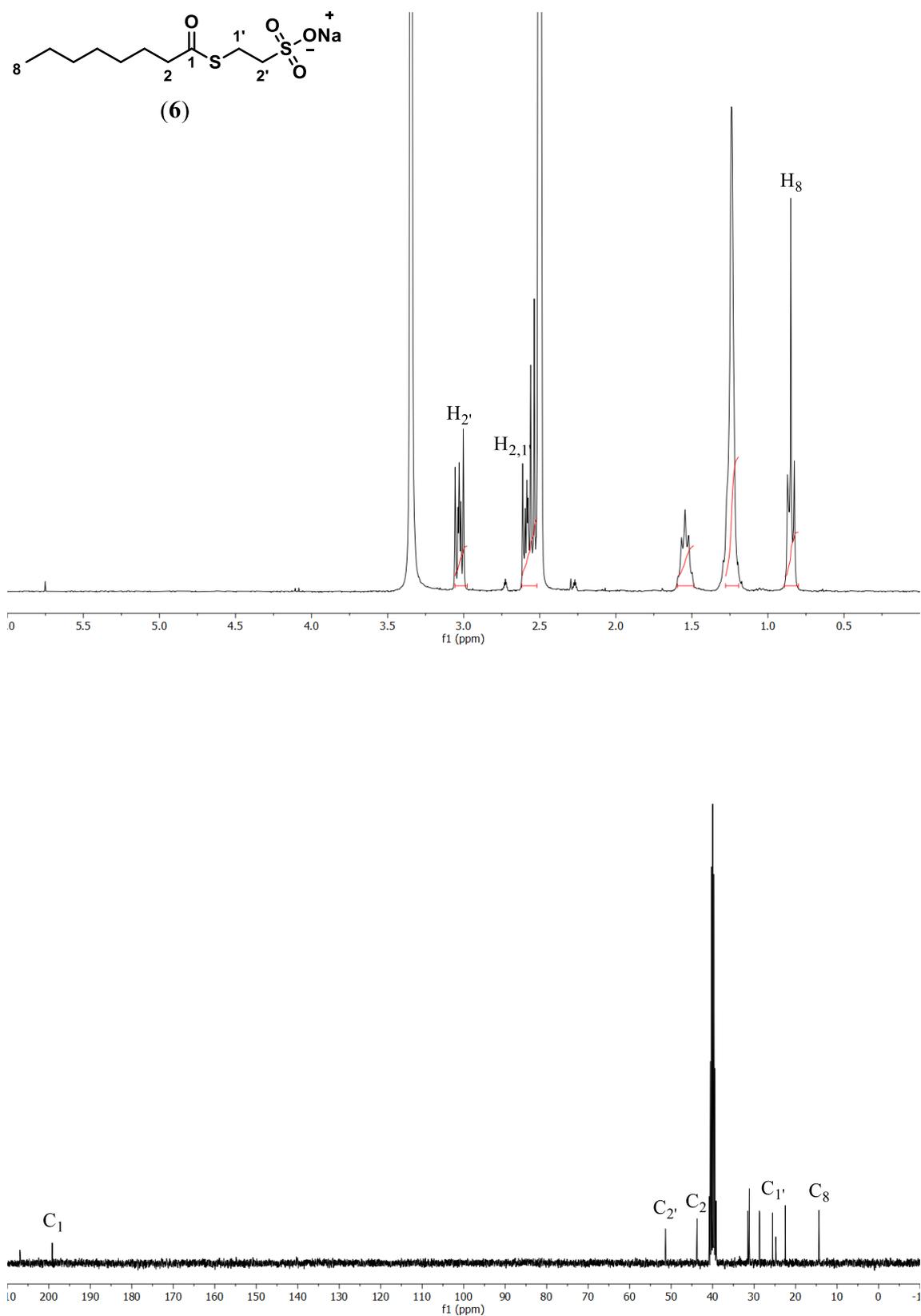


Figura A1. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del tiocapilato de MESNA (6).

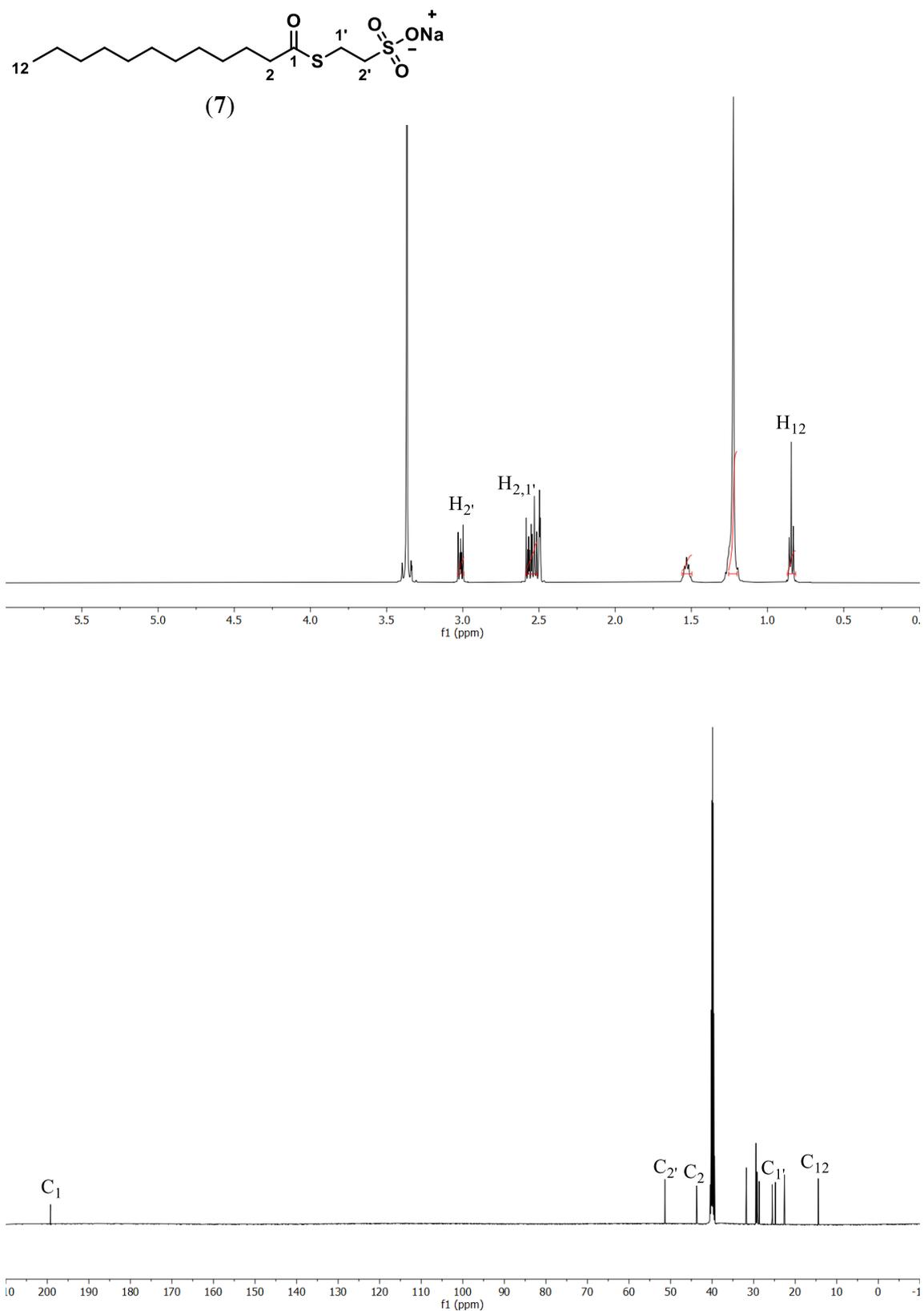


Figura A2. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del tiolaurato de MESNA (7).

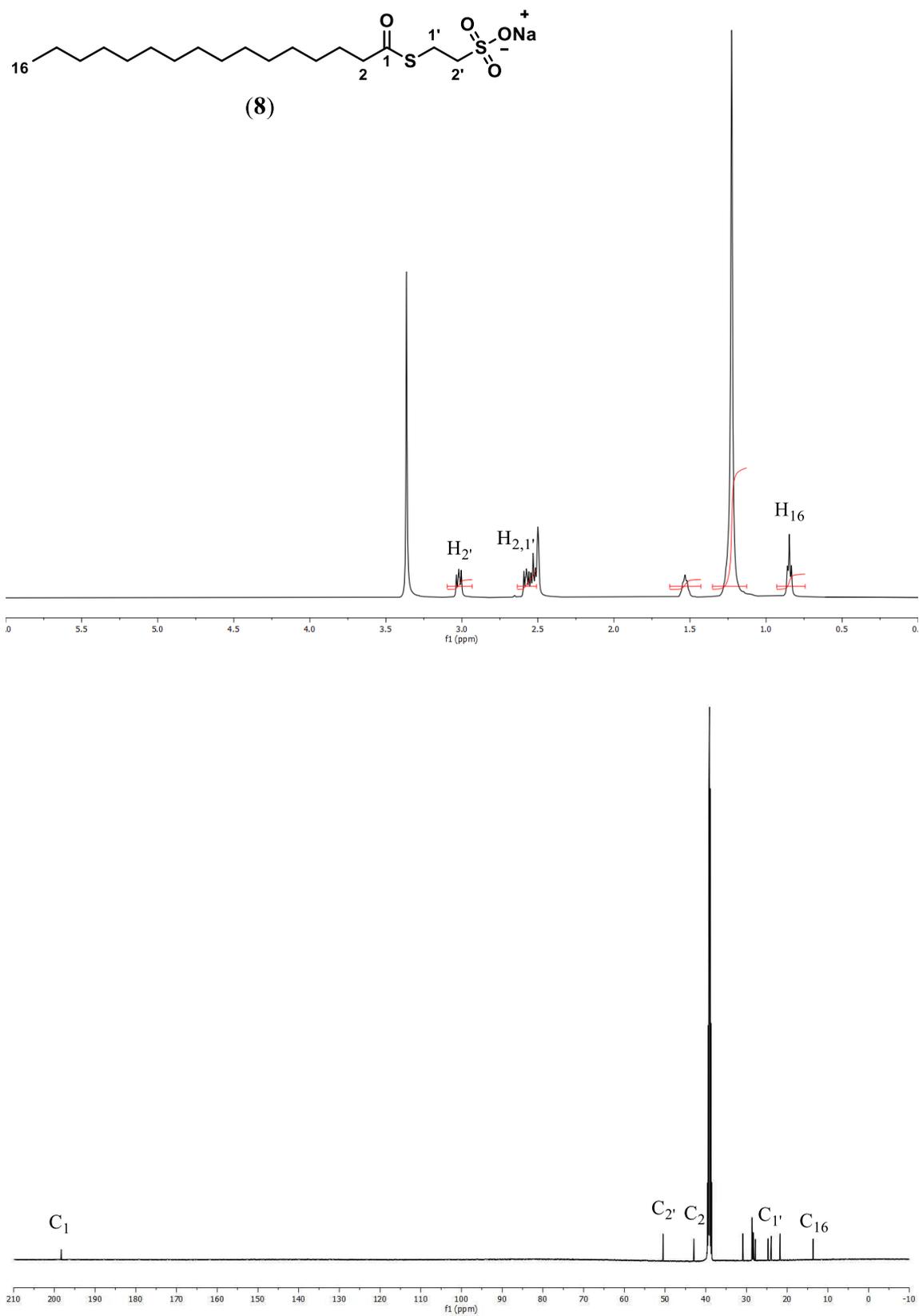


Figura A3. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del tiopalmítato de MESNA (8).

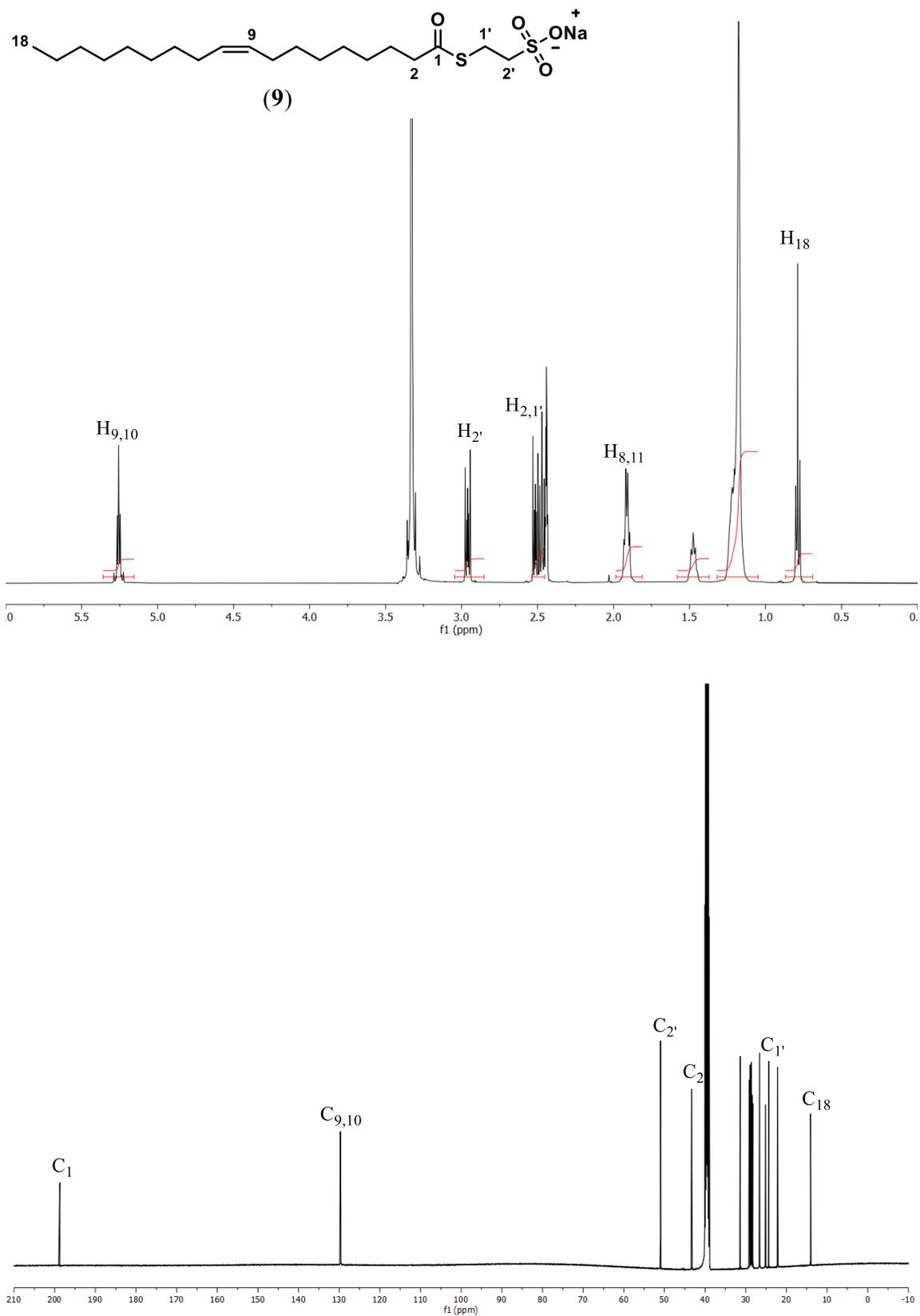


Figura A4. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del tioleato de MESNA (9).

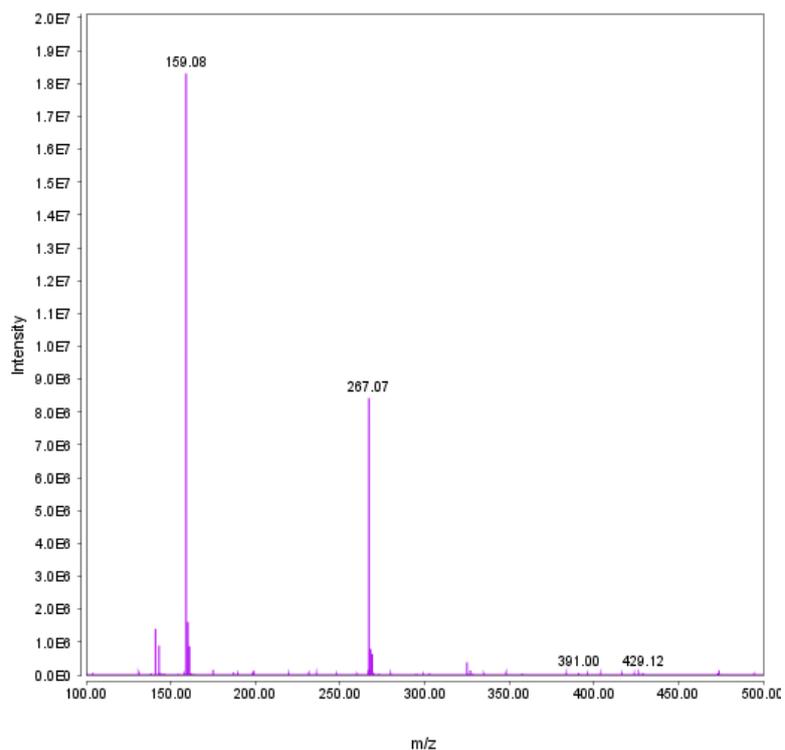


Figura A5. Espectro de masas del tiocapilato de MESNA (6). Relación m/z 267,07.

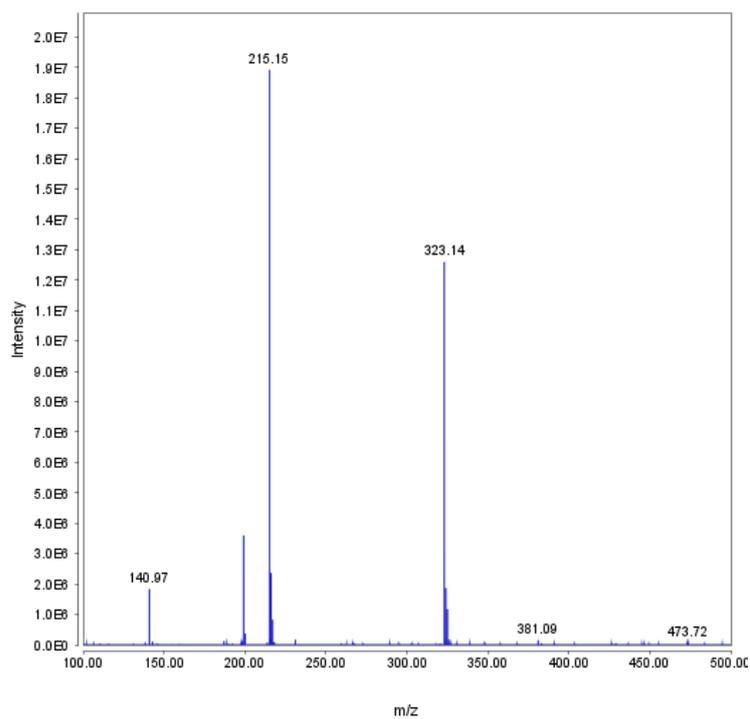


Figura A6. Espectro de masas del tiolaurato de MESNA (7). Relación m/z 323,14.

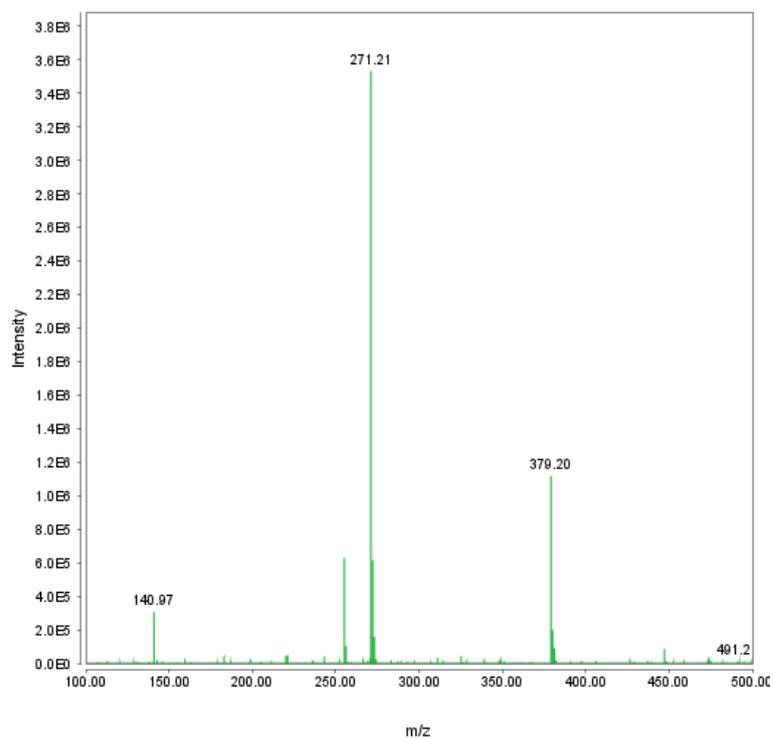


Figura A7. Espectro de masas del tiolaurato de MESNA (8). Relación m/z 379,20.

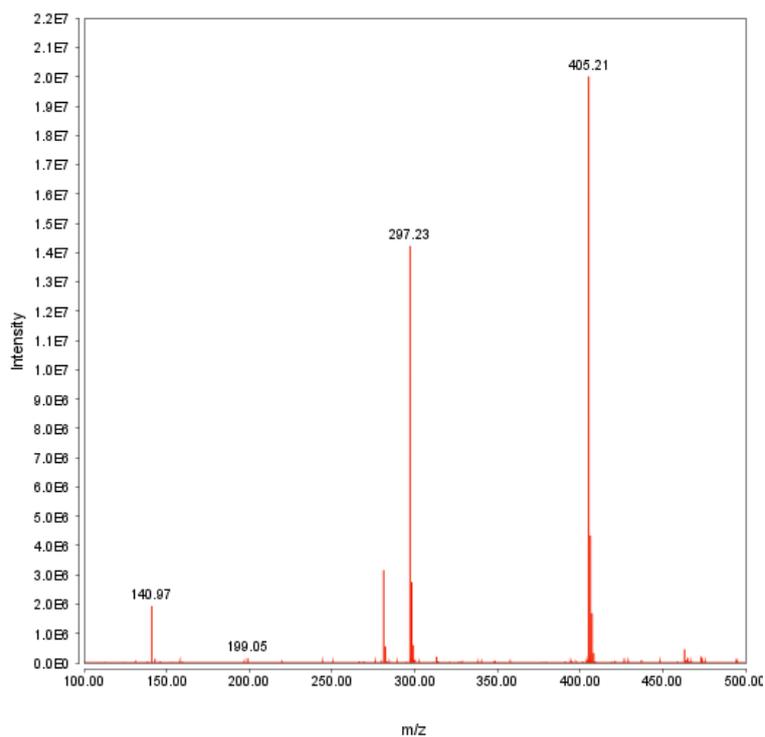


Figura A8. Espectro de masas del tioleato de MESNA (9). Relación m/z 405,21.

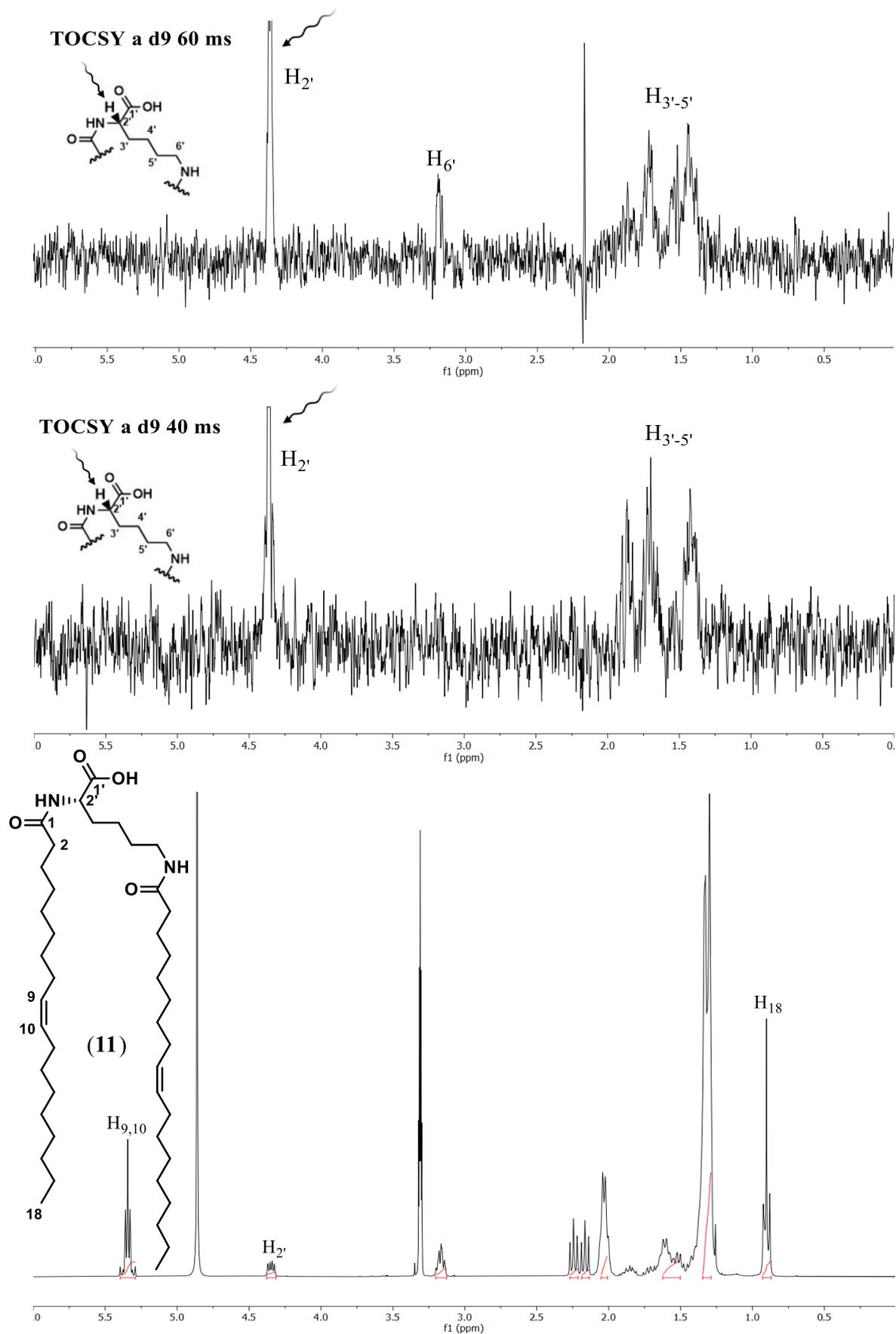


Figura A9. Espectros de ^1H -RMN y 1D-TOCSY (irradiación selectiva al protón en δ_{H} 4,41 ppm) de $N\alpha, N\epsilon$ -dioleil- L -lisina (**11**).

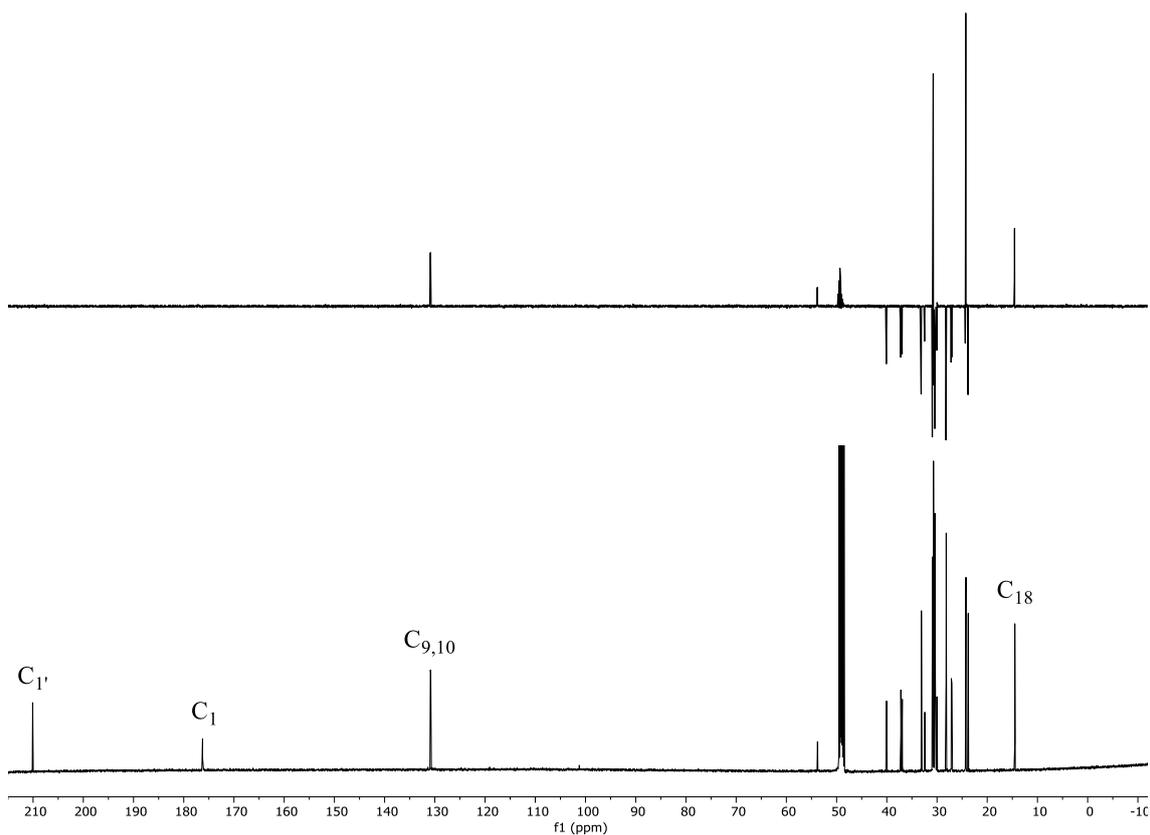


Figura A10. Espectros de DEPT-135 y ^{13}C -RMN de $N\alpha,N\epsilon$ -dioleoil-*L*-lisina (**11**).

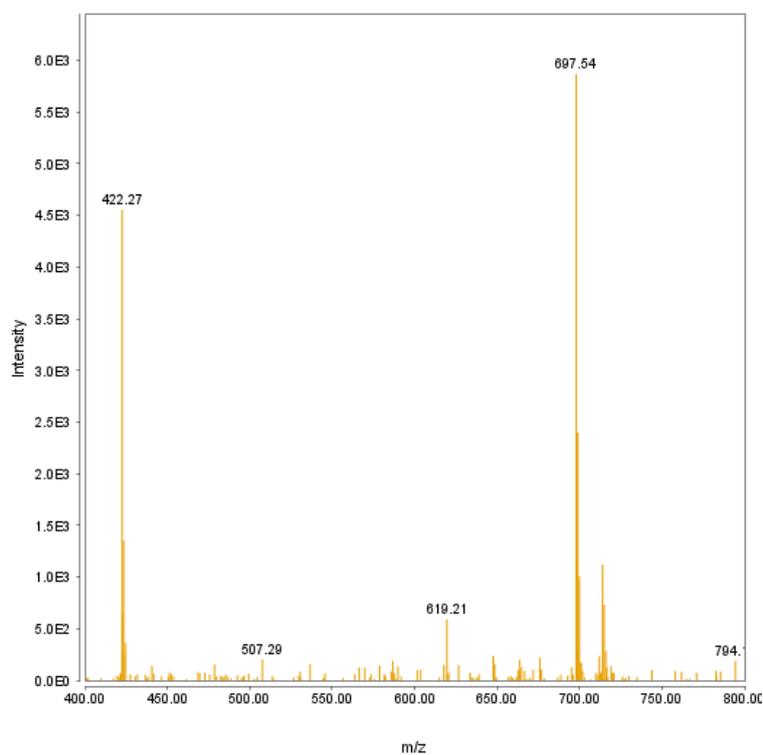


Figura A11. Espectro de masas de $N\alpha,N\epsilon$ -dioleoil-*L*-lisina (**11**). Relación m/z 697,54.

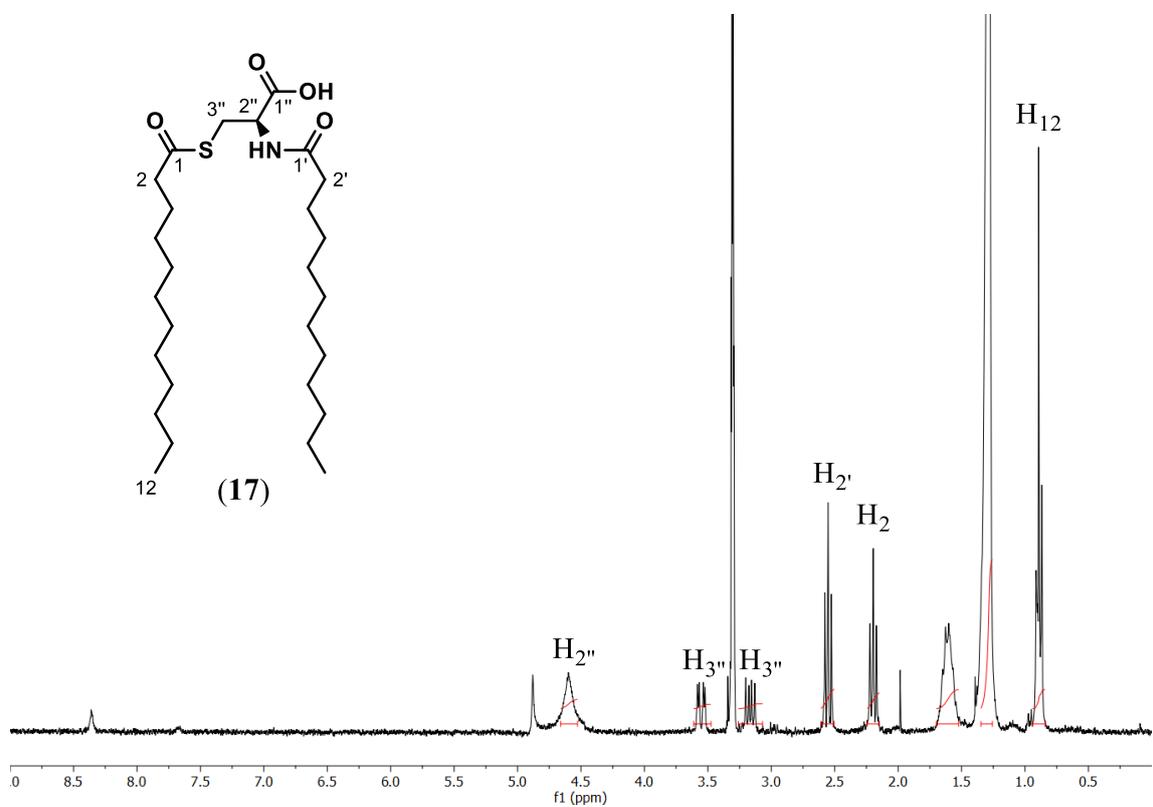
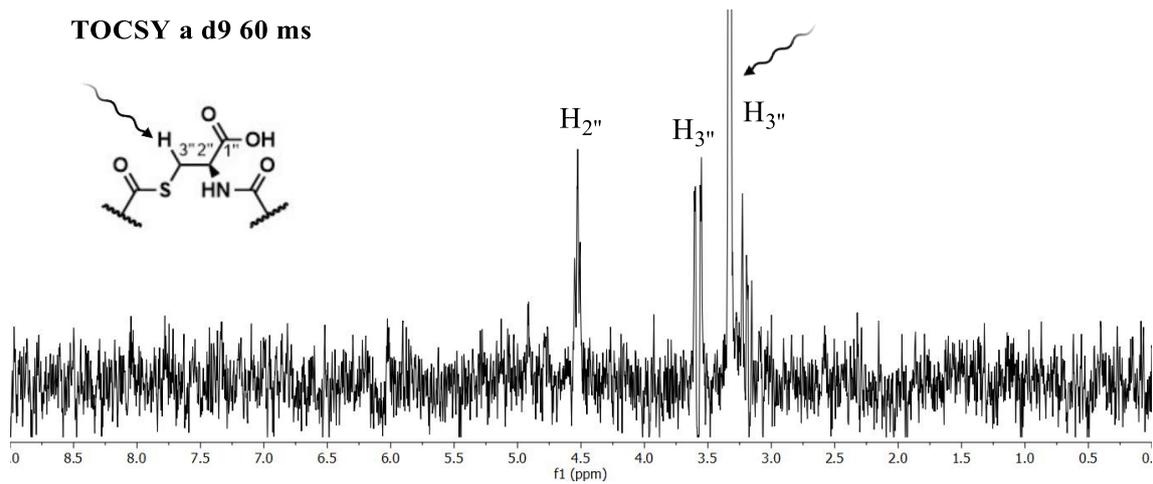


Figura A12. Espectros de ^1H -RMN y 1D-TOCSY (irradiación selectiva al protón en δ_{H} 3,19 ppm) de *N,S*-dilauroil-*L*-cisteína (17).

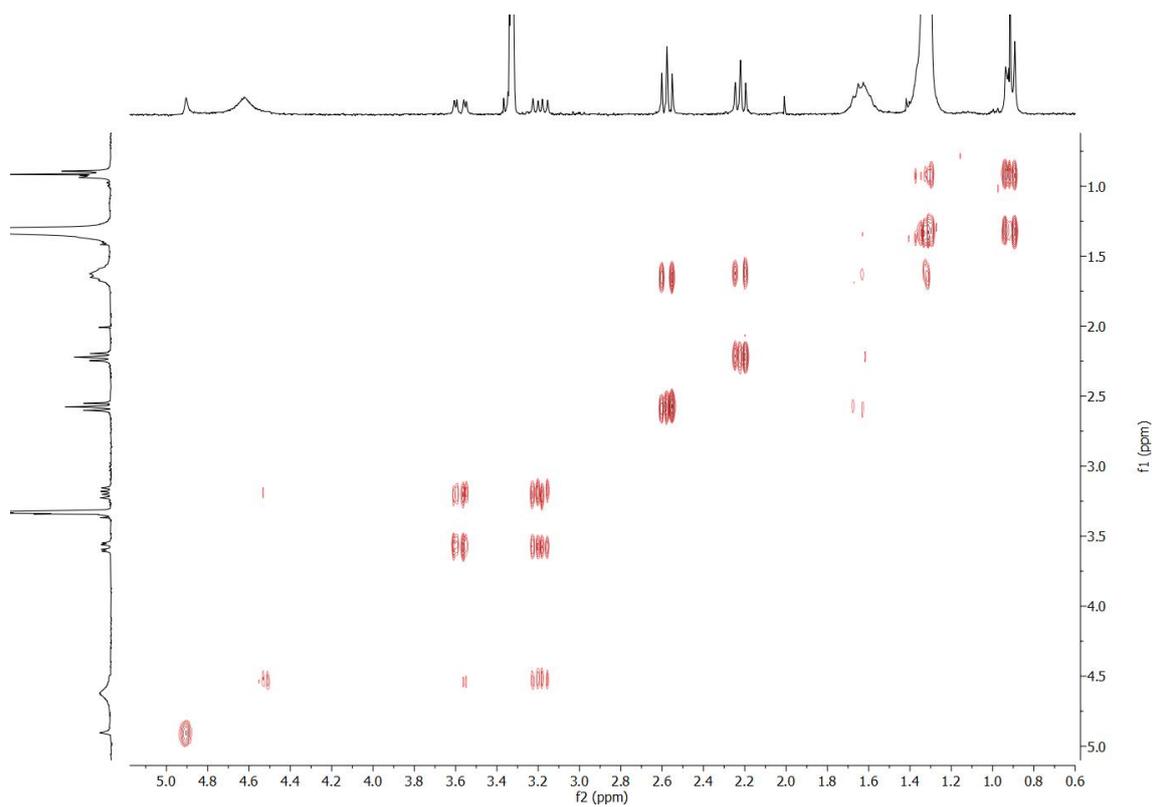


Figura A13. ^1H - ^1H COSY (300 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) de *N,S*-dilauroil-*L*-cisteína (**17**).

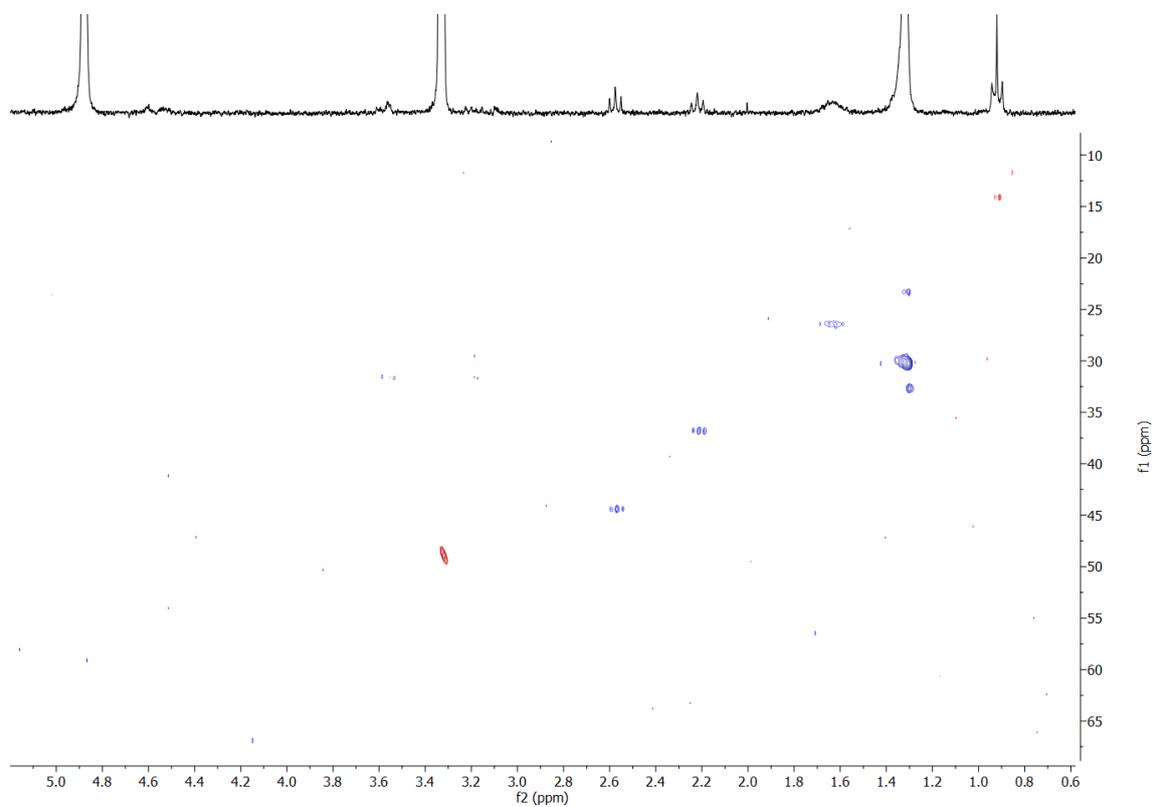


Figura A14. HSQC-Editado mediante DEPT-135 (300 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) de *N,S*-dilauroil-*L*-cisteína (**17**).

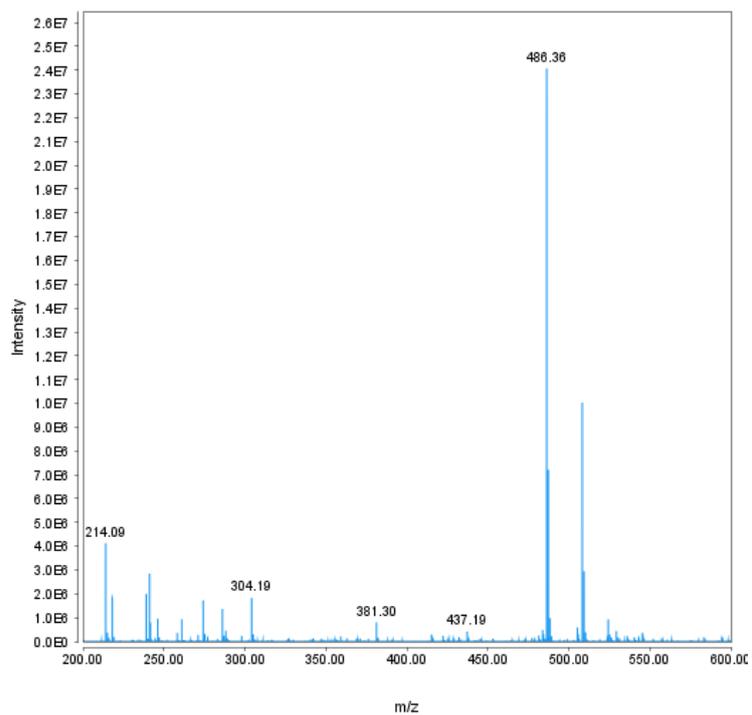


Figura A15. Espectro de masas de *N,S*-dilauroil-*L*-cisteína (**17**). Relación m/z 486,36.