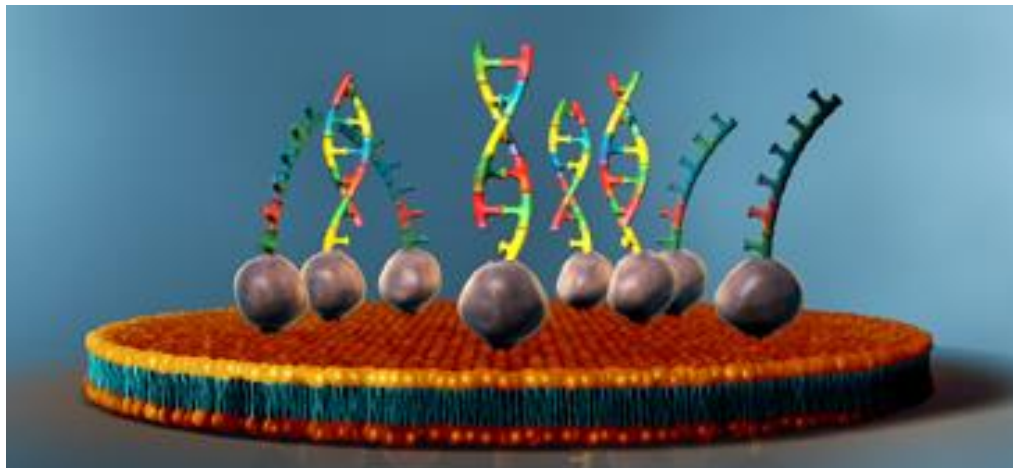




Universidad de Valladolid

MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Búsqueda y caracterización de moléculas de interacción específica frente a marcadores terapéuticos y aplicación en la construcción de vectores farmacológicos basados en recombinámeros tipo elastina



BIOFORGE (Group for Advanced Materials and Nanobiotechnology)

Trabajo de Fin de Máster

Rebeca Llorente Aparicio

Tutor: Francisco Javier Arias Vallejo

Septiembre 2017

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



Universidad de Valladolid

**Búsqueda y caracterización de moléculas
de interacción específica frente a
marcadores terapéuticos y aplicación en la
construcción de vectores farmacológicos
basados en recombinámeros tipo elastina**

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría aprovechar este espacio para mostrar mi agradecimiento a todas las personas que de alguna manera forman parte de este trabajo.

En primer lugar, agradecer a Javier, tutor de este trabajo fin de Máster, su implicación y orientación a lo largo de todo el proyecto. También a todos los seniors, de los que he podido aprender tanto y a la coordinadora y al profesorado de este máster por compartir sus conocimientos con nosotros.

Por último, agradezco enormemente a todos los compañeros que me han ayudado, por su tiempo, consejos y por el clima de trabajo.

RESUMEN

Los recombinámeros de tipo elastina (ELRs) son una familia de biopolímeros proteicos producidos mediante técnicas de ADN recombinante, inspirados en la elastina natural y cuyas propiedades (biocompatibilidad, capacidad de autoensamblado, comportamiento inteligente) han permitido su aplicación en distintos campos biomédicos, entre ellos, liberación dirigida y controlada de fármacos o agentes génicos, que es en el que se centra el proyecto. Los ELRs pueden formar micro- o nanopartículas mediante autoensamblado y de esta manera encapsular fármacos o formar poliplexos (complejos polímero-ADN) con ácidos nucleicos. Su direccionamiento se puede llevar a cabo mediante fusión recombinante de los ELRs a fragmentos de anticuerpo (conservan el sitio de unión al antígeno), como scFv, o mediante conjugación química con aptámeros (ssRNA o ssDNA seleccionados por su unión específica a una diana). Este trabajo se enmarca en el desarrollo de vectores farmacológicos para la enfermedad de Chagas y para el cáncer de mama, a partir de las combinaciones ELR/aptámero y ELR/scFv. Respecto a la primera enfermedad, se sintetizó mediante transcripción *in vitro* el aptámero 68 (ssRNA), identificado como una molécula de interacción específica con tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Su caracterización mediante electroforesis en condiciones nativas y desnaturizantes permitió conocer que el tamaño del aptámero era el adecuado, así como su elevada resistencia a la desnaturalización en relación al control, indicando la formación de múltiples interacciones intra-catenarias. Su aplicación es la conjugación química a ELRs capaces de encapsular fármacos, para dirigirlos al sitio diana y mejorar la eficacia de los principios activos disponibles para la enfermedad de Chagas. En relación al cáncer de mama, el trabajo se encuadra en la investigación de una terapia génica dirigida basada en ELRs. En el laboratorio se ha diseñado y clonado el ELR P12VOKx72, formado por la fusión recombinante del ELR (VPGKG)x72 al fragmento de anticuerpo scFv(P12), que se une específicamente a la tenascina-C, una proteína que se sobreexpresa en procesos tumorales. VOKx72 se ha combinado previamente con otras moléculas para transportar genes suicidas de forma dirigida, con prometedores resultados *in vitro*. En este trabajo se produjo de forma recombinante el ELR P12VOKx72, se purificó mediante cromatografía de afinidad IMAC y su caracterización mediante western-blot y espectrometría de masas MALDI-TOF demostró que una fracción del ELR se degradaba a nivel de scFv(P12). Dentro de la misma línea, el último objetivo consistía en la evaluación mediante QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring) de la interacción entre la tenascina-C y el aptámero TN-9.4, que se había detectado como molécula de unión específica a esta proteína y cuya aplicación es la conjugación química con VOKx72 para la construcción de una alternativa a P12VOKx72. El aptámero se inmovilizó sobre la superficie del sensor junto a una molécula espaciadora (6-mercaptop-1-hexanol, MCH). La masa y el espesor de la película de tenascina-C formada sobre la capa TN-9.4:MCH, en relación a los controles negativos, sugiere que la interacción es específica.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ELRS (ELASTIN-LIKE RECOMBINAMERS)	1
1.2 Liberación dirigida de fármacos y agentes génicos mediante ELRs, fragmentos de anticuerpo y aptámeros	2
1.2.1 Enfermedad de Chagas.....	3
1.2.2 Terapia génica en cáncer de mama	4
1.2.2.1 Tenascina-C como marcador tumoral: scFv(P12) y aptámero TN-9.4.....	5
2. QCM-D (QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE WITH DISSIPATION MONITORING).....	6
3. OBJETIVOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
1. MEDIOS DE CULTIVO	8
2. SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL APTÁMERO 68.....	8
2.1 Amplificación del plásmido pNZY29-Apt68.....	8
2.2 Purificación del constructo pNZY29-Apt68 y digestiones enzimáticas.....	8
2.3 Transcripción in vitro.....	9
2.4 Electroforesis de ácidos nucleicos	10
2.4.1 Electroforesis de ADN	10
2.4.2 Electroforesis de ARN	10
3. BIOSÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ELR P12VOKx72.....	11
3.1 Screening de colonias.....	11
3.2 Expresión recombinante y lisis bacteriana	11
3.3 Purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC)	12
3.4 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl-sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	13
3.5 Caracterización de P12VOKx72.....	13
3.5.1 Western-blotting	13
3.5.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF	14
4. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE TENASCINA-C Y TN-9.4 MEDIANTE QCM-D (QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE WITH DISSIPATION MONITORING)	14

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
1. SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL APTÁMERO 68: APLICACIÓN EN EL DESARROLLO DE UN VECTOR FARMACOLÓGICO DIRIGIDO FRENTE A <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	15
1.1 <i>Análisis de las reacciones de digestión enzimática</i>	15
1.2 <i>Análisis de la transcripción y purificación del aptámero 68</i>	16
2. ELR VOKx72 Y MOLÉCULAS DE INTERACCIÓN ESPECÍFICA CON EL MARCADOR TUMORAL TENASCINA-C: APLICACIÓN EN EL DESARROLLO DE VECTORES NO VIRALES DE TERAPIA GÉNICA DIRIGIDA AL CÁNCER DE MAMA	18
2.1 <i>Biosíntesis, purificación y caracterización del ELR P12VOKx72</i>	19
2.1.1 Expresión de P12VOKx72	19
2.1.2 Purificación de P12VOKx72	20
2.1.3 Caracterización de P12VOKx72	22
2.1.3.1 Western-blotting	22
2.1.3.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF	23
2.2 <i>Análisis de la interacción entre tenascina-C y TN-9.4 mediante QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring)</i>	24
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29

Introducción

1. ELRs (Elastin-like Recombinamers)

Los recombinámeros de tipo elastina son una familia de biopolímeros proteicos inspirados en la elastina natural y producidos mediante técnicas de ADN recombinante. Su naturaleza recombinante permite un control estrecho sobre su composición aminoacídica y propiedades, además de facilitar su producción a gran escala, lo que supone una gran mejora respecto a los polímeros de tipo elastina sintetizados químicamente (Elastin-like Polymers) [1].

Su composición se basa en la repetición de motivos peptídicos presentes en la tropoelastina, siendo el pentapéptido VPGXG uno de los más comunes, donde X designa cualquier aminoácido excepto L-prolina. La mayoría de sus propiedades derivan de la elastina natural, entre ellas, biocompatibilidad, capacidad de deformación reversible, de autoensamblado y comportamiento inteligente, es decir, capacidad de respuesta a estímulos, siendo la temperatura la variable más estudiada. Los ELRs experimentan un fenómeno de transición inversa con la temperatura (ITT), que consiste en que las cadenas poliméricas están hidratadas, desordenadas y relativamente extendidas por debajo de una temperatura (temperatura de transición, T_t), mientras que por encima de ella las cadenas se pliegan mediante interacciones hidrofóbicas formando una estructura secundaria dinámica conocida como espiral- β y se asocian entre sí, produciéndose un cambio de fase (Fig 1). Este proceso es reversible y permite su purificación mediante ciclos de calentamiento y enfriamiento seguidos de centrifugación (Inverse Transition Cycling, ITC). Las propiedades de estos polímeros y la versatilidad en el diseño han permitido su aplicación en distintos campos biomédicos, principalmente ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y liberación de fármacos o agentes génicos, que es en el que se centra el presente trabajo [1].

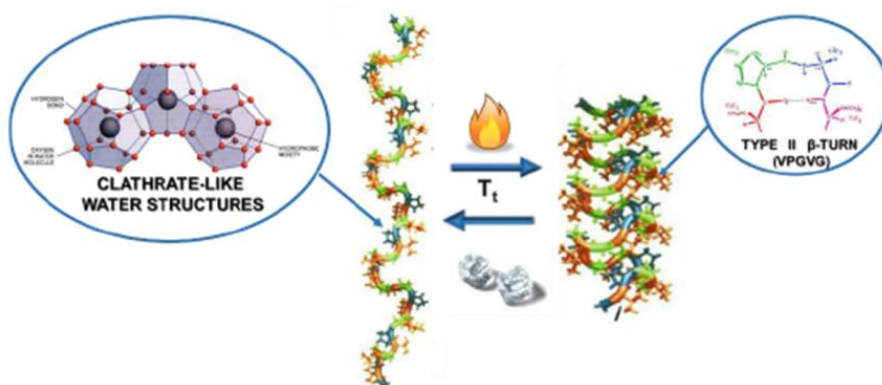


Figura 1. Representación esquemática de la transición térmica de los ELRs (ITT), de la conformación extendida ($T < T_t$, regiones hidrofóbicas rodeadas por estructuras de tipo clatrato formadas por el agua) a la conformación plegada de tipo espiral- β .

1.2 Liberación dirigida de fármacos y agentes génicos mediante ELRs, fragmentos de anticuerpo y aptámeros

Los principales objetivos en el campo de la liberación de fármacos son el direccionamiento a sitios diana y la liberación controlada en respuesta a estímulos, para reducir la toxicidad y mejorar el efecto terapéutico y el perfil de liberación. Los ELRs son biomateriales con alto potencial en este ámbito gracias a su comportamiento inteligente, entre otras propiedades. Aunque existen numerosas estrategias de diseño de sistemas de liberación de fármacos basados en ELRs, se señalan las tres más generales [2].

Una de ellas consiste en la fusión recombinante del ELR a una proteína terapéutica (ELPylation), lo que facilita la expresión y purificación de la misma así como su farmacocinética, por ejemplo, aumentando la vida media en circulación. La segunda clase de construcción se basa en la conjugación química entre el ELR y el fármaco que, por lo tanto, no tiene por qué ser proteico. Los grupos reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos se modifican para la introducción de un sitio de unión al fármaco que pueda romperse en respuesta a estímulos concretos, permitiendo la liberación en el sitio adecuado y mejorando sus propiedades farmacocinéticas [3].

La última estrategia se fundamenta en la encapsulación del fármaco mediante formación de micro- o nanopartículas por autoensamblado de los ELRs. Este puede inducirse por el propio diseño del ELR, la conjugación a un fármaco, la adición de moléculas cargadas o mediante un estímulo externo como la temperatura. Por ejemplo, las interacciones electrostáticas entre ácidos nucleicos y ELRs catiónicos conducen a su autoensamblado y a la formación de complejos polímero-ADN (poliplexos), lo que permite su aplicación como vectores no virales en terapia génica [3]. Este tipo de carriers tienen las ventajas, respecto a los vectores virales, de que no son inmunogénicos, favorecen la producción a gran escala y no presentan limitaciones en el tamaño del ADN transportado ni posibilidad de recombinación con virus, aunque exhiben una eficiencia de transfección más baja. Además, dentro de los vectores no virales los polímeros catiónicos destacan por su habilidad para condensar el ADN, lo que aumenta la estabilidad de los poliplexos así como la interacción con la membrana plasmática, que es uno de los pasos limitantes de la transfección [4]. Estudios *in vitro* con ELRs como vectores no virales han mostrado resultados prometedores y ausencia de toxicidad [4, 5], a diferencia de otros polímeros catiónicos ampliamente utilizados para la construcción de poliplexos, como polietilenimina [5].

El direccionamiento de los sistemas de liberación de fármacos basados en ELRs se puede llevar a cabo mediante conjugación con aptámeros [5] o fusión recombinante a fragmentos de anticuerpo [6]. Estos últimos conservan el sitio de unión al antígeno y parte o nada de la región constante e incluyen, de forma general, los fragmentos Fab (antigen-binding fragment), scFv (single-chain variable fragment) y sus variantes. Los primeros están formados por el dominio variable y un

dominio de la región constante de ambas cadenas, unidas por un puente disulfuro, mientras que los segundos están constituidos por las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, conectadas mediante un péptido. Su selección se realiza mediante phage display, a partir de una librería de fagos cuyas partículas de superficie están fusionadas de forma recombinante a fragmentos de anticuerpo. Esta librería se somete a rondas iterativas de selección (panning) frente al antígeno de interés [7, 8]. Las principales diferencias respecto a los anticuerpos son: mayor penetración en los tejidos diana por su pequeño tamaño y, debido a la ausencia del dominio constante (Fc), menor estabilidad y disminución de la vida media en circulación, que es elevada en el caso de los anticuerpos y puede implicar una mayor toxicidad limitante de la dosis [9, 10].

Los aptámeros son ácidos nucleicos de cadena sencilla (ssDNA, ssRNA) seleccionados para su unión específica a una diana. Son capaces de formar estructuras tridimensionales complejas mediante enlaces no covalentes e interactúan con una diana con afinidad y especificidad comparables o superiores a los anticuerpos. Son más pequeños que los fragmentos scFv (8-15 kDa) y ofrecen las ventajas, respecto a los anticuerpos, de poseer una estructura flexible que permite el reconocimiento de regiones inaccesibles para los anticuerpos, su producción y modificación son más sencillas, poseen elevada estabilidad y no son inmunogénicos. Su selección se realiza mediante un procedimiento conocido como SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) a partir de una librería de secuencias. Estas se someten a rondas iterativas de interacción con moléculas purificadas, células e incluso animales vivos para incrementar la población con alta afinidad por la diana, hasta que se convierte en el pool dominante [11]. A continuación se presentan dos enfermedades para las que se pretenden desarrollar terapias dirigidas basadas en ELRs, aptámeros y fragmentos de anticuerpo.

1.2.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una enfermedad crónica abandonada, la principal causa de muerte en América Latina dentro de las enfermedades causadas por parásitos y la principal causa de cardiomiopatía infecciosa en el mundo [12]. *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad en humanos, que en su forma infectiva de tripomastigote accede al torrente sanguíneo e invade diversos tipos celulares, donde se transforma en amastigotes capaces de proliferar en el citoplasma y eventualmente rediferenciarse en tripomastigotes, que destruyen la célula y vuelven a la circulación para invadir otros tejidos u otros individuos a través del insecto vector (*Triatoma infestans*). El daño en los tejidos resulta tanto de la acción del parásito como del proceso inflamatorio que desencadena. Tras la fase aguda, asintomática en la mayoría de pacientes, se desencadena una fase crónica en la que el sistema inmune limita la proliferación del parásito pero es incapaz de erradicar la enfermedad y en la que tan solo el 30-40% desarrolla los síntomas asociados (cardiomiopatías y patologías del tracto digestivo). Únicamente hay dos

fármacos disponibles (benznidazol y nifurtimox), no aprobados por la FDA y contraindicados en embarazadas, solo eficaces en la fase aguda y especialmente tóxicos en adultos en la fase crónica, sobre todo nifurtimox. En la búsqueda de tratamientos alternativos, se está apostando por el desarrollo de vectores farmacológicos que alteren las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los principios activos existentes y disminuyan la toxicidad, en lugar de centrarse en la estrategia a largo plazo de screening y optimización de principios activos nuevos, aunque los estudios realizados hasta ahora son escasos [13]. Los tripomastigotes en circulación y los amastigotes intracelulares son las dos dianas potenciales [14].

Mediante SELEX se ha identificado un aptámero de ARN (aptámero 68) resistente a nucleasas, que se une específicamente y con elevada afinidad (K_d 7.62 nM) a la forma de tripomastigote del parásito, aunque se desconoce la molécula diana. Aunque el objetivo era fusionar los aptámeros a bolas paramagnéticas para concentrar los parásitos en sangre y mejorar el diagnóstico mediante PCR, esta molécula podría tener aplicación en terapias dirigidas [15]. Se podría conjugar a ELRs capaces de encapsular fármacos, para dirigirlos a los tripomastigotes en sangre y así mejorar la eficacia de los principios activos disponibles para la enfermedad de Chagas (Fig 2).

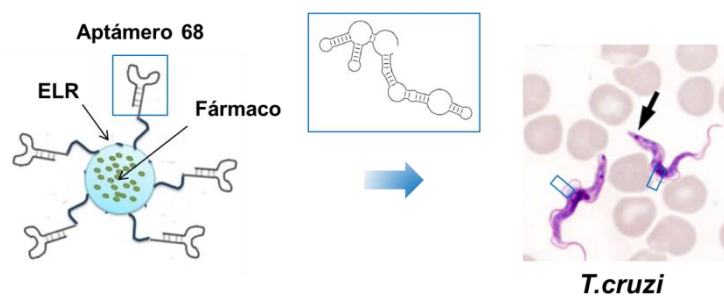


Figura 2. Esquema del mecanismo de acción de las nanopartículas formadas por ELRs conjugados al aptámero 68. El aptámero dirige las nanopartículas a las células en circulación de *Trypanosoma cruzi* (tripomastigotes), mejorando la eficacia del fármaco al liberarse en el sitio diana.

1.2.2 Terapia génica en cáncer de mama

El cáncer de mama es la principal enfermedad diagnosticada en mujeres en la sociedad occidental, siendo 246660 los nuevos casos de cáncer detectados en la población femenina en USA durante 2016 [16]. A pesar de la disponibilidad de tratamientos para cáncer de mama avanzado (cirugía, quimioterapia, radiación, terapia con Trastuzumab), todos ellos mejoran el bienestar pero no el ratio de cura. En la búsqueda de alternativas, la terapia génica mediante siRNA, genes tóxicos o genes pro-apoptóticos, entre otros, ha surgido como una de las estrategias más prometedoras para el tratamiento del cáncer. Además, su combinación con radio o quimioterapia ha mostrado resultados excelentes [5].

En el laboratorio se ha diseñado un ELR catiónico, rico en lisinas, formado por 72 repeticiones del pentapéptido VPGKG y se ha conjugado químicamente con un aptámero dirigido específicamente

a MUC1, una glicoproteína de membrana que se sobreexpresa en tumores epiteliales, como cáncer de mama primario y metastático, y que es un marcador de mal pronóstico. Este ELR (VOKx72) se ha utilizado para formar poliplexos con el gen suicida PAP-S, codificante de una RIP (proteína inactivadora del ribosoma) de tipo I (Fig 3a), y debido a los prometedores resultados obtenidos *in vitro* actualmente continúa su investigación [5]. En concreto, se está estudiando su combinación con moléculas de interacción específica con la tenascina-C, que es una glicoproteína de la matriz extracelular (estroma) que se sobreexpresa en la mayoría de tumores sólidos malignos, entre ellos cáncer de mama, y que se correlaciona con un mal pronóstico [17]. Las moléculas diana que se expresan en la matriz extracelular ofrecen las ventajas, respecto a las de la superficie celular, de que son más abundantes y estables, su perfil de liberación a la circulación (shedding) es bajo y son más accesibles a las moléculas procedentes de la circulación sanguínea, como anticuerpos [18].

1.2.2.1 Tenascina-C como marcador tumoral: scFv(P12) y aptámero TN-9.4

La tenascina-C se expresa durante el desarrollo fetal y de forma restringida en tejidos adultos, salvo en algunas condiciones patológicas en las que se produce su sobreexpresión, no solo en procesos tumorales como se ha mencionado anteriormente, sino también inflamación y cicatrización de heridas [17]. Esta proteína promueve la migración celular y la angiogénesis, inhibe el contacto focal celular y en algunos casos actúa como factor de supervivencia celular, en definitiva, favorece la invasividad y metástasis tumorales [19].

Respecto a su estructura, es una proteína de gran tamaño (≈ 300 kDa) que forma hexámeros [17] mediante interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro entre los dominios de asociación de las subunidades del extremo N-terminal (dominios TA) [20]. Además de este dominio, cada subunidad se compone de 14.5 repeticiones de tipo factor de crecimiento epidérmico, un número variable de repeticiones de tipo fibronectina III (FNIII) y el dominio de tipo fibrinógeno en el extremo C-terminal. Se pueden generar múltiples isoformas mediante splicing alternativo de nueve repeticiones FNIII, entre las repeticiones conservadas 5 y 6 [19]. Se distingue entre isoforma larga y corta en función de si incluye todos los dominios de splicing o no, siendo la primera la que exhibe un patrón de expresión más restringido en tejidos adultos [18]. Numerosos estudios han demostrado que los distintos dominios desempeñan funciones específicas y que la función biológica de la proteína también depende del patrón de splicing [19].

Entre los fragmentos de anticuerpo anti-Tenascina-C desarrollados se encuentra scFv(P12), que se une específicamente al dominio D de la isoforma larga de la proteína y cuya biodistribución se ha evaluado en un modelo murino de glioblastoma [18]. En el laboratorio, se ha fusionado de forma recombinante a VOKx72 en el extremo N-terminal para la construcción de un vector no viral (P12VOKx72) alternativo al mencionado en el apartado anterior. En este caso, contiene una cola

de polihistidina en el extremo C-terminal (Fig 3b) para su purificación mediante cromatografía de afinidad por inmovilización de metales (IMAC), ya que la fusión de la proteína al ELR interfiere con la purificación mediante el método habitual ITC (Inverse Transition Cycling).

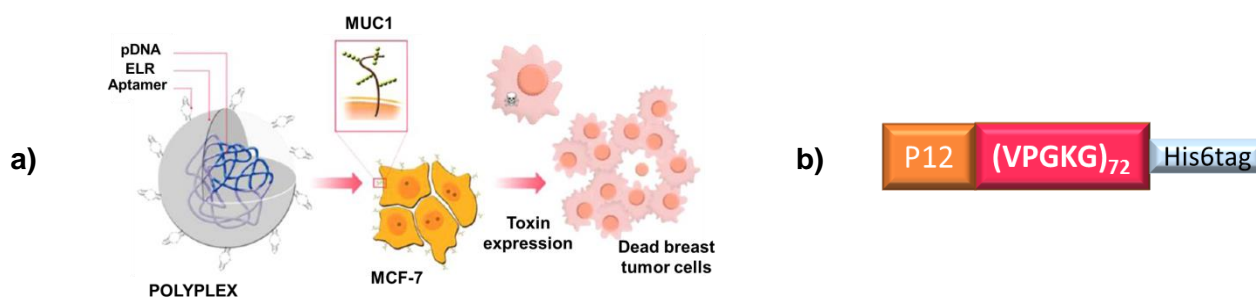


Figura 3. Terapia génica dirigida en cáncer de mama basada en ELRs. **a)** Esquema del mecanismo de acción de los poliplexos formados por ELRs conjugados al aptámero de unión específica a MUC1 y por un gen suicida. El aptámero dirige los poliplexos a las células tumorales que sobreexpresan esta proteína, permitiendo la muerte selectiva de estas células mediante expresión del gen suicida. **b)** Estructura del ELR P12VOKx72. P12 (scFv anti-Tenascina-C en el extremo N-terminal para direccionamiento del poliplexo), (VPGKG)₇₂ (ELR catiónico formado por 72 repeticiones del pentapéptido VPGKG, capaz de formar poliplexos), His6tag (cola de polihistidina en el extremo C-terminal para la purificación del constructo mediante cromatografía de afinidad IMAC).

Respecto a los aptámeros de unión específica a tenascina-C se ha identificado TTA1 (13kDa, 39nt), que presenta una elevada afinidad (K_d 5×10^{-9} M) por el dominio de tipo fibrinógeno y que ha mostrado una penetración rápida y retención duradera en xenotumores humanos. Este aptámero se ha obtenido mediante SELEX a partir de una librería de ssRNAs estabilizados frente a nucleasas y tras modificaciones químicas adicionales para minimizar el tamaño y mejorar más su estabilidad frente a nucleasas. En este trabajo se pretende evaluar la interacción entre la tenascina-C y el aptámero precursor de TTA1 (TN-9.4: 17kDa, 55nt) mediante QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring), con el propósito de conjugarlo con VOKx72. En lugar de TTA1 se eligió su precursor (TN-9.4) porque tenía menos modificaciones químicas, lo que reducía el coste de obtención [9, 21].

2. QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring)

QCM-D es una técnica acústica, nanométrica, que permite el análisis en tiempo real y sin marcaje de fenómenos de superficie, como interacciones moleculares o reacciones. Se basa en la oscilación de un cristal de cuarzo piezoeléctrico a frecuencias específicas (fundamental y armónicos), mediante la aplicación de pulsos eléctricos, y permite la medida en tiempo real no sólo de la Frecuencia de Resonancia (f) sino también de la Disipación (D) de la energía, lo que le diferencia de la técnica convencional (QCM). El acoplamiento de sustancias a la superficie del sensor, que implica un aumento de masa, se traduce en una disminución de la frecuencia de resonancia. Los cambios en la frecuencia se relacionan con los cambios en la masa total mediante

la ecuación de Sauerbrey ($\Delta m = -C\Delta f$), donde $C=17.7\text{ng/Hz cm}^2$ es la constante de sensibilidad de masa. Sin embargo, esta relación sólo es válida si la capa formada sobre la superficie del sensor es rígida, fina y homogénea. El factor de disipación se define como la energía disipada por ciclo de oscilación dividida por la energía total almacenada en el oscilador y proporciona información sobre las propiedades viscoelásticas de la nanocapa formada sobre el sensor. Las sustancias que forman películas de carácter viscoso, por ejemplo aquellas con alto contenido en agua, se deforman durante la oscilación produciendo una disipación elevada, sucediendo lo contrario con las películas rígidas. Por lo tanto, este factor permite determinar cuándo no se puede aplicar la ecuación de Sauerbrey así como realizar un modelado viscoelástico, en su lugar, para conocer las propiedades y la masa depositada, que incluye la masa de solvente [22, 23].

Esta es la principal diferencia respecto a la técnica SPR (Surface Plasmon Resonance), que no incluye la masa de solvente asociada a las biomoléculas depositadas debido a que la estimación se realiza en base a la variación en el índice de refracción entre las biomoléculas adsorbidas y el agua desplazada tras su adsorción. En definitiva, QCM-D es más sensible para películas con alto contenido en agua, mientras que SPR lo es más para películas compactas y densas y hasta un límite de espesor. Además, QCM-D proporciona una información más detallada porque permite identificar diferencias estructurales entre distintas moléculas o cambios estructurales dentro del mismo tipo de molécula [24]. Por ejemplo, se ha descrito un cambio conformacional de un aptámero tras la unión a L-tirosinamida [22] o se ha evaluado la interacción entre un aptámero de unión a PSA (prostate-specific antigen) y esta proteína [25].

3. Objetivos

Debido a la necesidad del desarrollo de terapias dirigidas en enfermedades con alta incidencia, como el cáncer de mama o la enfermedad de Chagas y en base al potencial de las combinaciones ELR/anticuerpo y ELR/aptámero como sistemas de liberación dirigida de fármacos, se plantean los siguientes objetivos:

1 - Síntesis mediante transcripción *in vitro* y caracterización del aptámero 68 (ssRNA), dirigido específicamente frente a *Trypanosoma cruzi*. Su aplicación es la conjugación a ELRs que encapsulen fármacos, para dirigirlos a las células del parásito y así mejorar la eficacia de los principios activos disponibles para la enfermedad de Chagas.

2 - Producción recombinante y caracterización del ELR P12VOKx72, diseñado como posible vector no viral de terapia génica dirigida al cáncer de mama, gracias a la especificidad de unión de scFv(P12) a la tenascina-C.

3 - Dentro de la línea anterior, evaluación de la interacción entre tenascina-C y el aptámero TN-9.4 mediante QCM-D, con aplicación en la conjugación con VOKx72 para la construcción de una alternativa a P12VOKx72.

***Materiales y
métodos***

1. Medios de cultivo

Se elaboraron medios LB (Luria-Bertani) y TB (Terrific Broth) autoinducible (Tabla 1), este último para la expresión recombinante del ELR. Tras esterilizar a 120°C, los medios sólidos se enfriaron a 60°C antes de la adición de ampicilina. Las soluciones de glucosa (Sigma-Aldrich) y de ampicilina se prepararon en agua ultrapura (Millipore) al 20% y al 10% (w/v), respectivamente, se disolvieron a 60°C y se filtraron con filtros de 0.22µm (Merck Millipore).

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo.

	Medio sólido	Medio líquido
TB (Formedium)	-	55.85 g/L
LB (Pronadisa)	25 g/L	
Agar (Fluka)	15 g/L	-
Ampicilina (Apollo Scientific)	0.01% (w/v)	-

2. Síntesis, purificación y caracterización del aptámero 68

La producción del aptámero 68 (Apt68) (ssRNA) se realizó mediante transcripción *in vitro* en lugar de sintetizarlo químicamente debido a su longitud (122nt). Se diseñó un ADN que constaba de la región codificante precedida por el promotor de la RNA polimerasa del fago T7 y de los sitios de restricción para *Bam*HI y *Acc*65I en los extremos 5' y 3', respectivamente. El ADN molde se insertó en el plásmido pNZY29 para su amplificación, siendo el constructo pNZY29-Apt68 proporcionado por Nzytech. El plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina.

2.1 Amplificación del plásmido pNZY29-Apt68

Se transformaron células competentes de subclonaje XL1-Blue (Stratagene) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente, las bacterias se cultivaron en 180µl de medio SOC (Sigma-Aldrich) precalentado a 37°C, en condiciones aerobias, durante 30 minutos, a 37°C y a 250rpm. Se sembraron 20µl en placas de LB con ampicilina y se incubaron a 37°C durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, se picaron dos colonias transformadas y se cultivaron en 5ml de medio LB con 0.01% (w/v) de ampicilina, a 37°C y a 250rpm. A las 8 horas de crecimiento, se inocularon 500µl del cultivo en 250ml de LB con ampicilina al 0.01% y se incubó en las condiciones anteriores durante 16 horas.

2.2 Purificación del constructo pNZY29-Apt68 y digestiones enzimáticas

El aislamiento del plásmido de *E.coli* se llevó a cabo empleando el kit QIAGEN Plasmid Maxi, siguiendo el protocolo del mismo, aplicando un volumen de disolución de 600µl. La concentración

y pureza del ADN se determinaron mediante medida de la absorbancia a 260nm en el Nanodrop 2000C (ThermoFisher Scientific). El constructo se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v).

Se adoptaron dos estrategias de digestión del plásmido para obtener un ADN molde lineal para la transcripción. Una de ellas consistía en linealizarlo con la enzima de restricción *Acc65I* FastDigest y la otra en la liberación del inserto mediante digestión doble con *Acc65I* y *BamHI* FastDigest (ThermoFisher Scientific). Antes de realizar las digestiones preparativas del constructo se hicieron digestiones analíticas (a pequeña escala) para comprobar que el tamaño del plásmido y del inserto eran los adecuados y optimizar las condiciones de reacción. Las reacciones se incubaron a 37°C, durante 15 minutos las analíticas y durante 16 horas las preparativas. Las enzimas se inactivaron según las instrucciones del fabricante. El análisis se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y al 2%, en el caso de la digestión doble. La tabla 2 recoge la composición de las digestiones enzimáticas.

El plásmido linearizado con *Acc65I* se purificó a partir de una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, utilizando el kit de extracción PureLink™ Quick Gel Extraction (ThermoFisher Scientific). El ADN digerido con *Acc65I* y *BamHI* se purificó siguiendo el protocolo correspondiente a PCR del kit PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo (ThermoFisher Scientific).

Tabla 2. Composición de las reacciones de digestión enzimática.

	Digestión analítica	Digestión preparativa
Milli-Q	-	-
10x FastDigest Buffer (ThermoFisher Scientific)	2 µl	10 µl
pNZY29-Apt68	200 ng	20 µg
Enzima	0.5 µl	2 µl
Volumen final	20 µl	100 µl

2.3 Transcripción *in vitro*

El kit empleado para la síntesis del aptámero fue DuraScribe® T7 Transcription Kit (Epicentre), que permite la producción de ARN resistente a RNasa A mediante sustitución de los ribonucleótidos CTP y UTP por sus formas fluoradas. Como control positivo se usó la muestra de ADN incluida en el kit. Se siguió el protocolo descrito en el mismo, con la diferencia de que se incorporó en la reacción 8-azido-ATP (Jena Bioscience) en un ratio 1/10 respecto al ATP no modificado [15], manteniéndose la concentración total de ATP recomendada. El ATP modificado se requería para la posterior conjugación del aptámero a un ELR. El tiempo de incubación fueron 6 horas. Tras la degradación del ADN molde con DNase I, los transcritos se diluyeron en agua ultrapura libre de

nucleasas hasta un volumen final de 50µl, para su purificación mediante cromatografía de filtración en gel. Se utilizaron columnas Sephadex G-50 (Roche) y se hicieron varias eluciones adicionales en 20µl de agua ultrapura. La concentración y pureza del ARN se determinaron mediante medida de la absorbancia a 260nm. Cada etapa del proceso se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y en gel de poliacrilamida, normalizando el volumen de carga.

2.4 Electroforesis de ácidos nucleicos

2.4.1 Electroforesis de ADN

La agarosa (Seakem, Cambrex) se disolvió en TAE1x (Tris (Sigma-Aldrich) 40mM, ácido acético (Merck) 0.11% (v/v), EDTA (Sigma-Aldrich) 1mM, pH 8) calentando en el microondas. Se utilizó el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific). La composición del buffer de carga era la siguiente: glicerol 30% (v/v), SDS (Sigma-Aldrich) 0.1% (w/v), azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) 0.05% (w/v), Tris 50mM pH 8, EDTA 0.05mM. La electroforesis se efectuó bajo un campo eléctrico de 90V y durante 1 hora, en el caso de geles analíticos y de 60V, durante 2 horas, en el caso de geles preparativos. Los perfiles de bandas se visualizaron y fotografiaron empleando el equipo Gel DocTM EZ Imager (Bio-Rad).

2.4.2 Electroforesis de ARN

La metodología para el análisis del aptámero mediante electroforesis se tuvo que poner a punto, ya que no se había trabajado previamente con ARN en el laboratorio. La separación electroforética se efectuó tanto en gel de agarosa como en gel de poliacrilamida y en condiciones desnaturizantes, ya que la formación de estructuras secundarias impide una estimación precisa del tamaño de los fragmentos de ARN [26]. En ambos casos se utilizó el marcador RiboRuler Low Range RNA Ladder (ThermoFisher Scientific).

Los geles de agarosa se prepararon al 2% (w/v) con lejía al 0.03% (w/v), añadiéndola en el gel justo antes de verterlo sobre el formador. La lejía favorece la integridad del ARN mediante desnaturización de las RNAsas [27]. Se empleó el buffer TAE1x y las muestras se desnaturizaron previamente en presencia de formamida [26], mezclándolas con el buffer de carga 2x RNA loading dye (ThermoFisher Scientific). Las condiciones de electroforesis y la tinción y visualización de las bandas fueron las mismas que las del apartado anterior. Los geles de poliacrilamida se prepararon al 5% con urea 7M y las muestras también se desnaturizaron previamente mezclándolas con el buffer de carga 2x RNA loading dye. Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante (Tabla 3). Se empleó el sistema vertical miniVE (Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech) y se fijó un voltaje de 90V y un tiempo de 90 minutos. La tinción y

visualización de las bandas se realizó de la misma forma que en el apartado anterior, con la diferencia de que el gel se bañó previamente en TBE1x durante 15 minutos para eliminar la urea.

Tabla 3. Composición del gel de poliacrilamida en presencia de urea.

Milli-Q
TBE1x (Tris 90mM, ácido bórico (Sigma-Aldrich) 90mM, EDTA 2mM)
Acrilamida 38% / Bis-acrilamida 2% (Amresco) 5% (w/v)
Urea (Fisher Scientific) 7M
Persulfato de amonio (Sigma-Aldrich) 0.1% (w/v)
TEMED (Sigma-Aldrich) 0.05% (w/v)

3. Biosíntesis, purificación y caracterización del ELR P12VOKx72

El diseño y la clonación del ELR habían sido realizados previamente en el laboratorio. A continuación se presenta el proceso llevado a cabo tras la transformación de la cepa BLR (DE3) (Novagen) con el plásmido de expresión p7 (derivado del pET25b de Novagen) ligado al inserto codificante del polímero. Este vector contiene un gen de resistencia a ampicilina.

3.1 Screening de colonias

La colonia productora se seleccionó mediante análisis de la expresión del polímero en SDS-PAGE. Se picaron 8 colonias y se cultivaron en 5ml de medio TB con ampicilina al 0.01% y glucosa al 1% (w/v), durante 16 horas, a 37°C y a 250rpm. Las muestras de electroforesis se prepararon de la siguiente forma: centrifugación de 1ml del cultivo durante 30 segundos y a 11000 rpm, resuspensión del pellet en 1ml de milli-Q, centrifugación en las condiciones anteriores y resuspensión en 100µl de milli-Q.

3.2 Expresión recombinante y lisis bacteriana

La expresión de P12VOKx72 se realizó en un biorreactor (Applikon Biotechnology) con 14L de medio de autoinducción TB con 0.8% (v/v) de glicerol y 0.005% de ampicilina. El inóculo se preparó en LB con ampicilina al 0.01% y glucosa al 1%. En primer lugar, se cultivó la colonia seleccionada en 5ml de LB, durante 16 horas, a 37°C y a 250rpm. A continuación, se puso a crecer 1ml del pre-inóculo en 30ml de LB, durante 3 horas y en las mismas condiciones y finalmente, se añadió en el fermentador en 1L de LB. El crecimiento se produjo durante 19 horas, a 37°C, 499rpm, 21% de oxígeno y pH 7. El control del nivel de oxígeno y del pH se llevaba a cabo mediante un electrodo y para mantenerlo se añadieron HCl y NH₄OH (Merck) al 37% y 28%, respectivamente. Como control de la producción se cultivó 1ml del inóculo en 5ml de TB con ampicilina al 0.01%, en las mismas condiciones. Transcurridas 18 horas, se midió la absorbancia

del cultivo a 600nm (UV-Visible Varian Cary 50, Agilent Technologies) hasta su estabilización, para detener la producción en la fase estacionaria. Posteriormente, se hicieron tres lavados con TBS (Tris 20mM pH 8, NaCl 140mM) mediante centrifugación a 3500rpm, durante 10 minutos y a 4°C, temperatura a la que se detienen el crecimiento y metabolismo bacterianos. El pellet se resuspendió en buffer de sonicación TE (Tris 20mM pH 8, EDTA 1mM, PMSF 1mM), en un volumen (V_{TE}) determinado por la siguiente fórmula: $V_{TE} \text{ (ml)} = 5 \cdot V_{\text{cultivo}} \text{ (L)} \cdot DO_{600}$. La suspensión celular se mantuvo a 4°C y se añadió el inhibidor de proteasas PMSF (Apollo Scientific) a una concentración final de 10µg/ml.

La lisis bacteriana se llevó a cabo mediante rotura por presión en el equipo Constant Cell Disruption System (Model TS 0.75KW, Constant System), debido a que el polímero forma cuerpos de inclusión. La preparación de las muestras para análisis en SDS-PAGE se realizó centrifugando durante 45 segundos y a 13400rpm, resuspendiendo el pellet en 1ml de milli-Q, centrifugando de nuevo en las mismas condiciones y resuspendiendo en milli-Q. El volumen de carga se normalizó en función de la absorbancia a 600nm.

3.3 Purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC)

La purificación comenzó con la centrifugación del lisado bacteriano a 12000rpm, durante 1.5h y a 4°C, para la separación de las fracciones soluble e insoluble. El pellet y el sobrenadante se analizaron mediante SDS-PAGE. El sobrenadante de ultrasonidos se preparó según se indica en el apartado 3.4, mientras que el pellet se lavó previamente resuspendiendo en 1ml de milli-Q y centrifugando 45 segundos y a 13400rpm y se resuspendió en 100µl de milli-Q.

El proceso continuó con la purificación mediante cromatografía de afinidad IMAC, un método ampliamente utilizado para la purificación de proteínas recombinantes con cola de polihistidina. Este se basa en la formación de enlaces de coordinación entre un metal de transición y el anillo de imidazol de la histidina, que es el aminoácido con el que establece la interacción más fuerte [28]. En este caso se inmovilizó níquel mediante una resina de ácido nitrilotriacético (NTA, ThermoFisher Scientific). Se aplicó un flujo aproximado de 50µl/s, proporcionado por la bomba Pharmacia LKB Pump P-1, y la purificación se produjo en condiciones desnaturizantes, en presencia de sales de guanidina. El extracto crudo se preparó mezclando 100ml de sobrenadante de ultrasonidos con 100ml de buffer de equilibrado (PBS 1x (Gibco), 10mM imidazol (Fisher Scientific), 3M guanidina-HCl (Sigma-Aldrich), pH 7.4) y centrifugando durante 10 minutos y a 15000xg. El resto del protocolo, incluida la regeneración de la matriz, fue el indicado por el fabricante. Se recogieron fracciones de 10ml que se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían polímero se dializaron en 25L de milli-Q para eliminar las sales de guanidina. Se hicieron 5 cambios cada 9 y 16 horas alternativamente, de manera que la

concentración final de sales fuera del orden de picomoles. El ELR dializado se congeló a -80°C , se liofilizó y se conservó a -20°C . Para su análisis, el polímero liofilizado se disolvió en milli-Q a una concentración de 1mg/ml.

3.4 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl-sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Las muestras se prepararon en buffer de carga 5x (Tris-HCl 312.5mM pH 6.5, SDS 10% (w/v), glicerol 50% (v/v), β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) 25% (v/v), azul de bromofenol 0.00625% (v/v)) hirviendo durante 5 minutos y centrifugando a 13400rpm. El porcentaje de acrilamida (%T) de los geles era del 12.5% (Tabla 4). Se usó el marcador Pierce™ Unstained Protein MW Marker (ThermoFisher Scientific). La electroforesis se efectuó en el sistema vertical miniVE, fijando el amperaje a 25mA/gel. El gel se tiñó sumergiéndolo en la siguiente solución: Coomassie Brilliant-blue R-250 (Sigma-Aldrich) 0.125% (w/v), metanol (Merck) 40% y ácido acético 10% (v/v). Tras 2 horas de incubación, las bandas se visualizaron destiñendo con agua destilada.

Tabla 4. Composición de los geles resolving y stacking y del buffer de electroforesis.

	Resolving	Stacking	Buffer
Acrilamida 37.5% / Bis-acrilamida 1% (Amresco)	12.5% (w/v)	4% (w/v)	-
Tris-HCl pH 8.8	375 mM	-	-
Tris-HCl pH 6.8	-	125 mM	-
Tris-base pH 8.3	-	-	25 mM
SDS 10%	0.1% (w/v)	0.1% (w/v)	0.1% (w/v)
PSA 10%	0.05% (w/v)	0.05% (w/v)	-
TEMED	0.05% (w/v)	0.08% (w/v)	-
Glicina (Sigma-Aldrich)	-	-	192 mM

3.5 Caracterización de P12VOKx72

3.5.1 Western-blotting

Las condiciones de SDS-PAGE son las descritas en el apartado anterior, con la diferencia de que se empleó el marcador PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific). Se utilizó una membrana de PVDF (Amersham Hybond 0.45 μm) y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante (Amersham Biosciences), realizando el bloqueo a temperatura ambiente y la incubación con el anticuerpo primario a 4°C . La solución de bloqueo fue BSA (Acros Organics) al 5% (w/v) en PBS1x. Se utilizaron el anticuerpo primario anti-6x His-tag (Abcam), que se diluyó en BSA al 5% en PBST 0.1%, y el anticuerpo secundario Goat Anti-Mouse HRP (Abcam), que se diluyó en PBST 0.1%, en ambos casos siguiendo las indicaciones del proveedor. La detección del anticuerpo secundario se produjo mediante una reacción redox colorimétrica catalizada por la peroxidasa de rábano (HRP), que consiste en la transferencia de electrones del

DAB (3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico) al peróxido de hidrógeno, lo que da lugar a un producto insoluble de color marrón. Se utilizó el kit de ThermoFisher Scientific.

3.5.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF

El peso molecular del ELR se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Autoflex) en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid.

4. Análisis de la interacción entre tenascina-C y TN-9.4 mediante QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring)

En este caso también se tuvo que poner a punto la metodología debido a la reciente incorporación de la técnica en el laboratorio. El aptámero TN-9.4 (Metabion) [21] estaba modificado en el extremo 5' con un grupo tiol-C3 para su inmovilización en el sensor mediante formación de un enlace covalente con el oro. Las medidas se realizaron en el aparato Q-sense E1 (Biolin Scientific) y se utilizaron sensores de cuarzo recubiertos de oro ($d_{Au} = 100\text{nm}$) (QSX301, Biolin Scientific), con una frecuencia fundamental de 4.95 MHz. La superficie se limpió sumergiendo el sensor en solución piraña (70% (v/v) H_2SO_4 , 30% (v/v) H_2O_2) durante 1 hora y aclarando alternativamente con agua y acetona [23]. Todos los procesos se monitorizaron, siendo la temperatura y el flujo de operación 23°C y $20\mu\text{l}/\text{min}$, respectivamente. El buffer empleado durante todo el procedimiento fue PBS1x. El sensor se funcionalizó con una mezcla 1:100 (moles) aptámero:6-mercaptop-1-hexanol (MCH, Sigma-Aldrich) en PBS1x y de concentración $100\mu\text{M}$, según han descrito previamente Formisano et al. [25]. Esta molécula espaciadora (MCH) se incluyó para aumentar la homogeneidad de la capa generada y para minimizar la interacción inespecífica de los nucleótidos con el oro, es decir, favorecer la orientación vertical de los aptámeros [25].

Tras la formación de una película estable, se midieron los cambios en la frecuencia y en la disipación producidos por la interacción con tenascina-C (34nM, 280-300kDa) (Human Tenascin-C Purified Protein, Merck Millipore). Como controles negativos se evaluó el efecto del BSA (Bovine Serum Albumin) (150nM, $\approx 66\text{kDa}$) sobre el sensor funcionalizado con el aptámero y el de la tenascina-C (34nM) sobre la superficie desnuda. Las concentraciones proteicas se fundamentan en la bibliografía [29] y las concentraciones de BSA y de tenascina-C siguen una relación inversa con el peso molecular para que la masa añadida de cada proteína sea la misma y así poder comparar las medidas de la masa depositada [23]. Todos los experimentos se hicieron por triplicado, a excepción de los controles negativos. El análisis de los resultados se realizó con el software Dfind, considerando los armónicos tercero, quinto y séptimo ($n = 3, 5, 7$). Se descartó la frecuencia fundamental debido a que es más inestable y se ignoraron armónicos superiores porque su área de sensibilidad es inferior [23].

Resultados y discusión

1. Síntesis, purificación y caracterización del aptámero 68: aplicación en el desarrollo de un vector farmacológico dirigido frente a *Trypanosoma cruzi*

El aptámero 68 (ssRNA) se ha identificado mediante SELEX como una molécula de interacción específica frente a la forma de tripomastigote de *Trypanosoma cruzi* [15]. Uno de los objetivos era sintetizarlo mediante transcripción *in vitro* para conjugarlo con ELRs capaces de encapsular fármacos, de manera que los dirijan a los tripomastigotes en sangre y así se mejore la eficacia de los principios activos disponibles para la enfermedad de Chagas. La secuencia codificante del aptámero se había insertado en el plásmido pNZY29 para su amplificación.

1.1 Análisis de las reacciones de digestión enzimática

Las digestiones enzimáticas se llevaron a cabo tras la amplificación del constructo pNZY29-Apt68 (Fig 4) en *E.coli* y su purificación (apartados 2.1, 2.2), con el objetivo de obtener un ADN molde lineal para la reacción de transcripción. Se adoptaron dos estrategias de digestión del plásmido: una de ellas consistía en linealizarlo con la enzima de restricción *Acc65I* y la otra en la liberación del inserto mediante digestión doble con *Acc65I* y *BamHI*.

En relación al constructo se distinguen dos bandas, una mayoritaria con una movilidad ligeramente superior a la del fragmento de 1650pb y una banda menos intensa a mayor altura en el gel (Fig 5a). Las principales conformaciones de los plásmidos son: circular superenrollada, circular relajada y lineal, esta última resultante de digestión enzimática en un único sitio de restricción, aunque también pueden encontrarse formas multiméricas. Las formas superenrolladas, que son las más abundantes, avanzan más rápido que las relajadas y estas, a su vez, más rápido que las lineales [30]. Teniendo en cuenta esto y que la movilidad del constructo linearizado (2220pb) es inferior a la de 2000pb del marcador (Fig 5b), es probable que la banda más intensa se corresponda con la forma superenrollada. Respecto a la banda superior, podría corresponder a formas multiméricas o a un fragmento de ADN cromosómico que se haya arrastrado durante la purificación del plásmido, siendo esto último lo más probable, ya que no se distinguen dímeros u otras formas intermedias.

La digestión con *Acc65I* linearizó el constructo (2220pb), ya que dio lugar a una banda intensa de tamaño superior a 2000pb. La digestión doble con *BamHI* y *Acc65I* produjo la liberación del inserto, de 149pb, correspondiente a la banda situada entre 100 y 200pb. Además, se observa la forma lineal del plásmido pNZY29 (2071pb) a una altura ligeramente inferior a la del constructo linearizado. La digestión con *BamHI* se realizó como control positivo de la digestión doble y debido a que su sitio de restricción en el constructo era único también lo linearizó (Fig 5b).

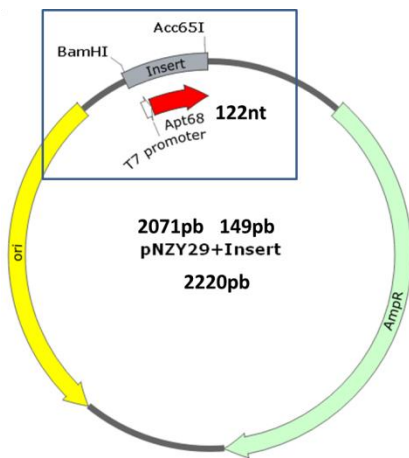


Figura 4. Esquema del constructo pNZY29-Apt68.

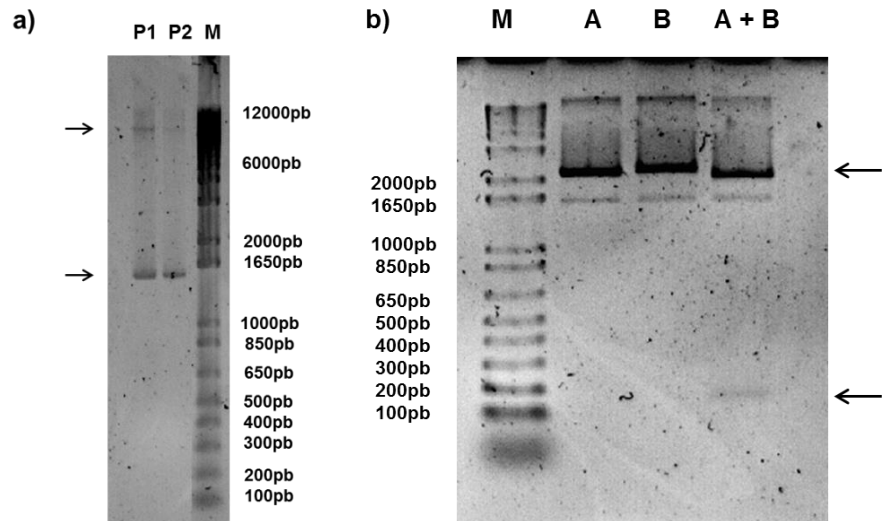


Figura 5. Análisis electroforético en gel de agarosa del constructo pNZY29-Apt68 **a)** y de las digestiones enzimáticas **b)**. P1, P2 (constructo sin digerir de dos colonias distintas), M (marcador de ADN), A (digestión con *Acc65I*), B (digestión con *BamHI*), A + B (digestión doble con *Acc65I* y *BamHI*).

Sin embargo, en todas ellas también se visualiza una pequeña banda que coincide con la del plásmido cuando no se digiere, lo que indicaría una digestión incompleta. Entre las causas más frecuentes se incluyen una elevada concentración de sales o la presencia de impurezas como alcoholes, fenoles... [31]. No obstante, los valores de las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280 se encontraban dentro del rango de pureza (1.5-2.2; 1.8-2.0). Con el propósito de conocer si la presencia de esta banda interferiría en la reacción de transcripción, la purificación se realizó de dos formas distintas. El constructo linearizado se purificó a partir de una electroforesis en gel preparativo de agarosa, mientras que el ADN de la digestión doble se purificó directamente mediante cromatografía de adsorción (membranas de sílica gel), es decir, no se separó el inserto codificante del aptámero del resto de productos de la digestión (apartado 2.2).

1.2 Análisis de la transcripción y purificación del aptámero 68

El tamaño de los transcritos y las etapas de purificación (apartado 2.3) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (apartado 2.4.2), ya que la formación de estructuras secundarias impide una estimación precisa del tamaño del ARN [26]. En la reacción se habían incorporado ATP modificado con grupos azida, así como 2'-F-dCTP y 2'-F-dUTP para poder conjugar el aptámero al ELR mediante click-chemistry y para aumentar la estabilidad frente a nucleasas, respectivamente. El rendimiento de la purificación no se podía calcular a partir de la absorbancia a 260nm debido a que los nucleótidos

no incorporados en la reacción también absorben a esa longitud de onda e impiden conocer la concentración de ARN antes de la purificación. Por ello, el volumen de carga se normalizó en cada etapa para poder conocer el rendimiento de forma cualitativa mediante electroforesis.

En la figura 6 se observa que la incubación con DNaseI al finalizar la reacción de transcripción digirió todo el ADN molde. Tras el tratamiento con DNaseI, los nucleótidos no incorporados en la reacción se consiguieron separar de los transcritos mediante cromatografía de filtración en gel, ya que desaparece la señal por debajo de 100pb. Sin embargo, la diferencia de intensidad de las bandas antes y después de la purificación indica que la cantidad de ARN resultante de las 6 eluciones era muy pequeña en relación a la cantidad inicial de transcrito. El bajo rendimiento del proceso de elución pudo deberse a una compactación insuficiente de la matriz que condujera a la formación de cavidades de mayor tamaño en las que quedasen retenidos, ya que también sucedió con el transcrito control, que debería eluirse con mayor facilidad debido a su tamaño (1400nt).

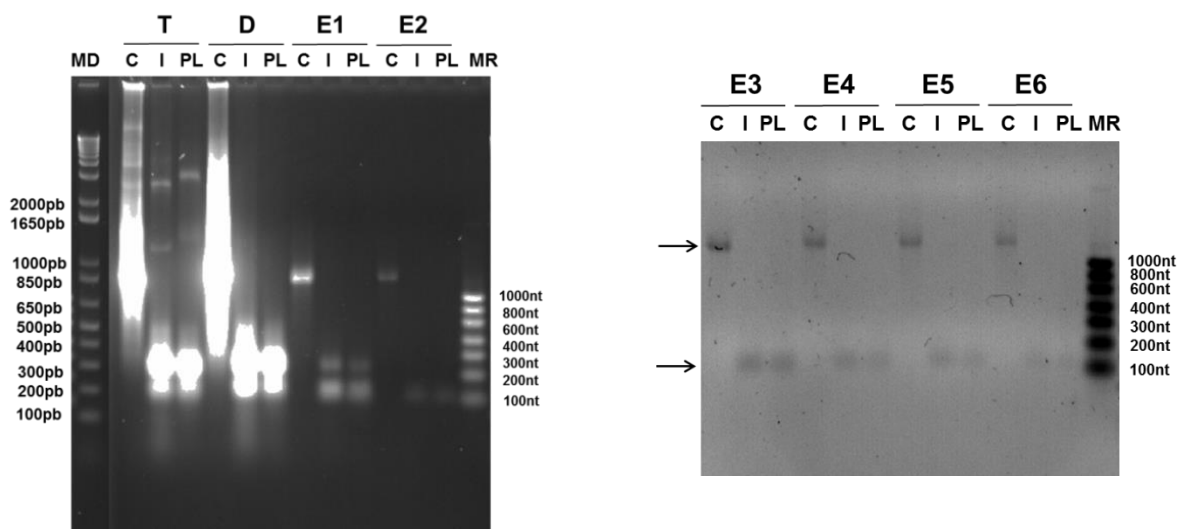


Figura 6. Análisis electroforético en gel de agarosa, en condiciones desnaturizantes, del proceso de transcripción y purificación del aptámero 68. T (tras la reacción de transcripción), D (tras la digestión con DNaseI), E1-E6 (eluciones de la purificación mediante cromatografía de filtración en gel). MD (marcador de ADN), C (transcrito control), I (aptámero transcrito a partir del inserto), PL (aptámero transcrito a partir del constructo linearizado), MR (marcador de ARN).

El transcrito control sintetizado dio lugar a una única banda de tamaño superior a 1000nt, en correlación con su longitud teórica (1400nt). Respecto a la transcripción del aptámero 68, el resultado fue el mismo a partir del producto de la digestión doble o del constructo pNZY29-Apt68 linearizado. Esto indicaba que no era necesario separar el ADN molde del no digerido o del resto de productos de la digestión mediante un gel preparativo, lo que permite ahorrar tiempo y aumenta el rendimiento de la purificación.

Sin embargo, no solo se observa la banda correspondiente al aptámero (122nt), sino una segunda banda a una altura comprendida entre 200nt y 300nt que desaparece a partir de la segunda elución (Fig 6). Debido a esto y a que *Acc65I* produce extremos 5' protuberantes que no dan lugar a una iniciación inespecífica [32], es improbable que se hubiera sintetizado un transcrito inespecífico. La principal diferencia entre las últimas eluciones y las etapas anteriores era la cantidad de aptámero, lo que conducía a pensar que se trataba de una desnaturalización incompleta. Para demostrarlo se realizó una electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, utilizando buffer de carga de ADN en lugar del de ARN y se distinguió una única banda que coincidía con la banda anterior (Fig 7a). Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de urea, con el propósito de conseguir una desnaturalización completa al añadir un agente desnaturalizante en el gel además de en el buffer de carga (Fig 7b). No obstante, se obtuvieron los mismos resultados. La dificultad de desnaturalizar el aptámero 68 refleja la formación de múltiples interacciones intra-catenarias (enlaces por puentes de hidrógeno).

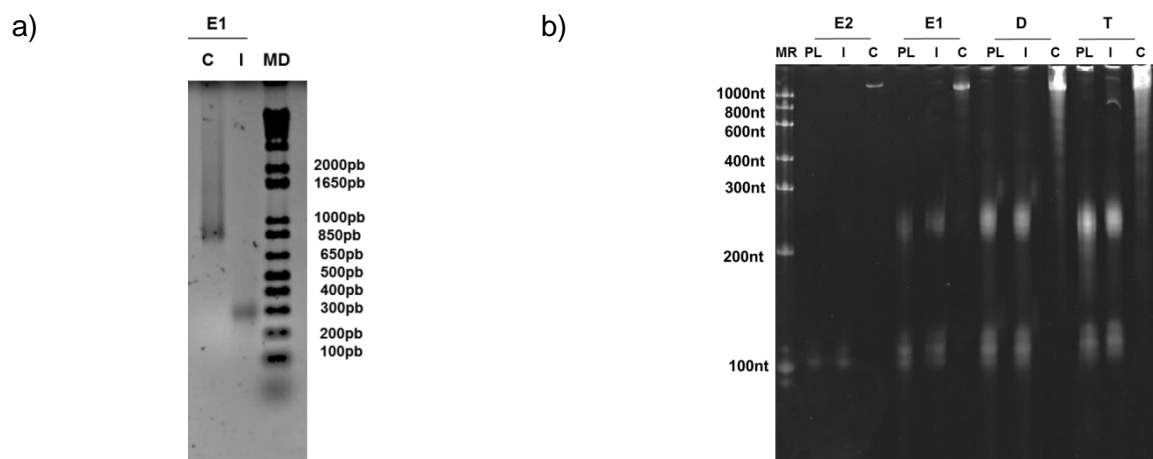


Figura 7. Análisis electroforético del aptámero 68 en gel de agarosa en condiciones nativas **a)** y en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes **b)**. T (tras la reacción de transcripción), D (tras la digestión con DNasaI), E1, E2 (eluciones de la purificación mediante cromatografía de filtración en gel). MD (marcador de ADN), C (transcrito control), I (aptámero transcrito a partir del inserto), PL (aptámero transcrito a partir del constructo linealizado), MR (marcador de ARN).

2. ELR VOKx72 y moléculas de interacción específica con el marcador tumoral tenascina-C: aplicación en el desarrollo de vectores no virales de terapia génica dirigida al cáncer de mama

En este apartado se exponen y discuten los resultados de los experimentos relacionados con la combinación del ELR VOKx72, capaz de formar poliplexos con ácidos nucleicos, con moléculas de interacción específica con la tenascina-C para su direccionamiento al tumor.

2.1 Biosíntesis, purificación y caracterización del ELR P12VOKx72

El diseño y la clonación del ELR habían sido realizados previamente en el laboratorio. La secuencia codificante del ELR (VPGKG)_{x72} se había fusionado a la codificante del fragmento de anticuerpo scFv(P12), que se une específicamente a la tenascina-C [18]. En este trabajo se llevó a cabo su producción recombinante, purificación y caracterización, tras la transformación de la cepa BLR (DE3) con el plásmido de expresión p7 ligado al inserto codificante del polímero.

2.1.1 Expresión de P12VOKx72

La selección de la colonia productora se realizó mediante análisis en SDS-PAGE de las fracciones proteicas de las colonias transformadas, tras cultivarlas en medio de autoinducción TB (apartado 3.1). Como control negativo se utilizó la misma cepa, transformada con el plásmido p7 codificante de un polímero distinto. En la figura 8a se observa una banda intensa a una altura próxima a la de 66.2 kDa del marcador, que está ausente en el control negativo, y el peso molecular teórico de P12VOKx72 es 59.03 kDa, lo que indica que las 8 colonias expresaban el ELR. La movilidad del ELR es inferior a la esperada según su peso molecular debido al alto contenido en lisinas y consecuentemente en cargas positivas. Para seleccionar la colonia productora se comparó de forma cualitativa la intensidad de la banda de interés respecto a la del resto de la fracción proteica. Entre las colonias con intensidades semejantes 1, 2, 4, 7 y 8, se eligió la colonia 7 de forma arbitraria.

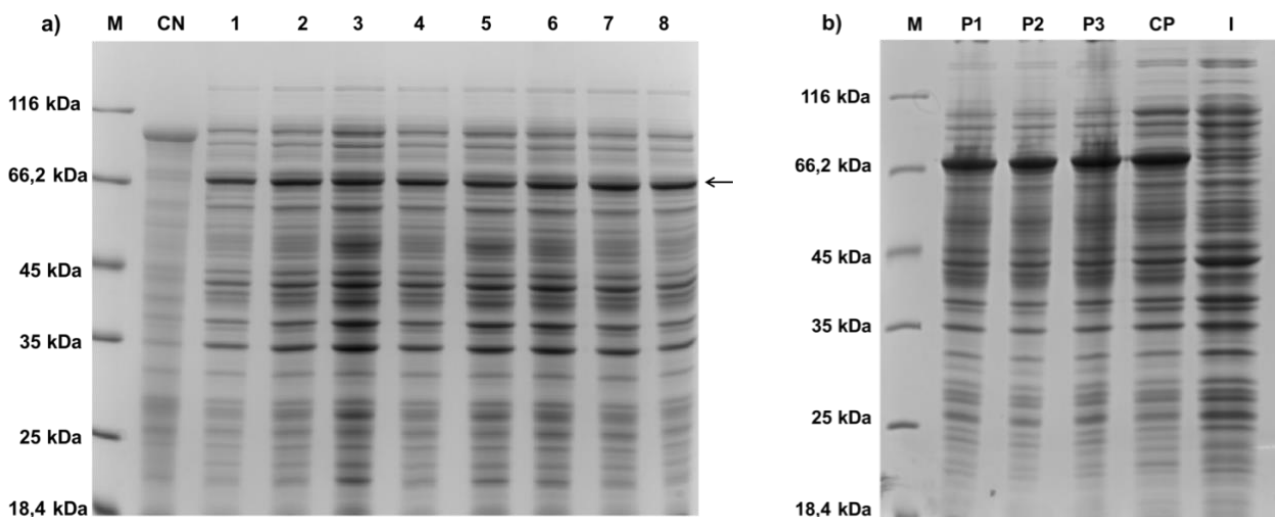


Figura 8. Análisis de la expresión de P12VOKx72 mediante SDS-PAGE. **a)** Fracciones proteicas de las colonias transformadas seleccionadas para el screening: M (marcador), CN (control negativo). La flecha señala la banda correspondiente a P12VOKx72. **b)** Fracciones proteicas de la colonia productora (7): P1, P2, P3 (a las 18, 18.5 y 19 horas de la inoculación del biorreactor), CP (control de la producción), I (inóculo).

Tras el screening, se preparó el inóculo en medio LB con ampicilina y glucosa para la producción recombinante en el biorreactor en medio TB (apartado 3.2). La figura 8b muestra el análisis de las fracciones proteicas a distintos tiempos, hasta que se alcanzó la fase estacionaria, y se puede ver que el ELR se expresó. El inóculo se cultivó de forma paralela a pequeña escala como control de la producción (CP), es decir, para poder determinar si un posible fallo en la expresión en el fermentador tiene su origen en el inóculo o se debe a las condiciones en el biorreactor. La ausencia de la banda de P12VOKx72 en la fracción proteica correspondiente al inóculo (I) confirma que la expresión del polímero es inducible en presencia del medio específico TB.

2.1.2 Purificación de P12VOKx72

Una vez expresado el polímero, se procedió a la lisis bacteriana y a la centrifugación del lisado para la separación de las fracciones soluble e insoluble (apartado 3.3). El análisis mediante SDS-PAGE reveló que el ELR se encontraba en ambas fracciones, aunque el grado de pureza era superior en el pellet (Fig 9a). Sin embargo, se esperaba que su solubilidad fuera mayor debido al elevado contenido en lisinas del polímero, que están cargadas en condiciones fisiológicas, ya que la solubilidad aumenta si la repulsión electrostática es superior a las interacciones hidrofóbicas.

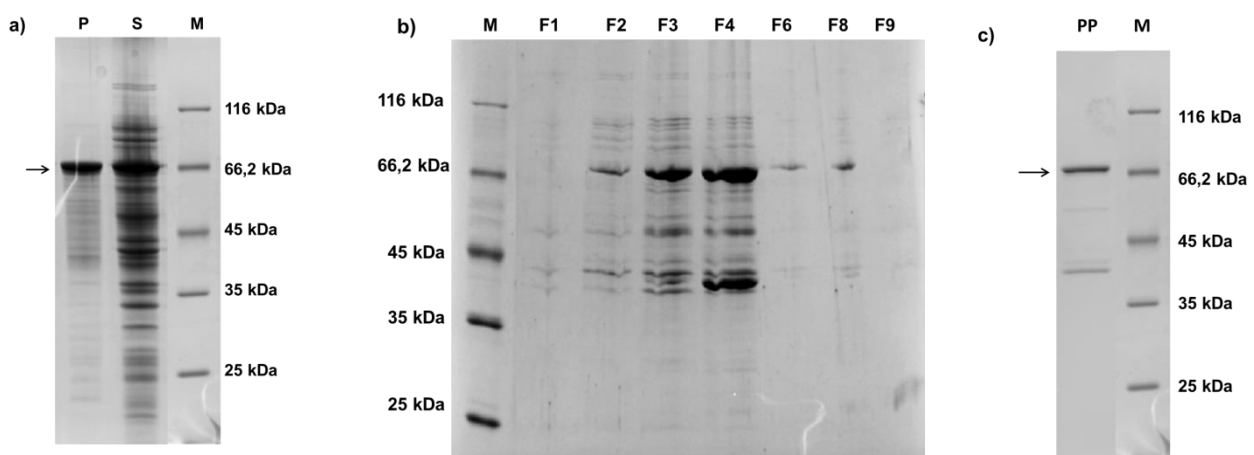


Figura 9. Análisis del proceso de purificación de P12VOKx72 mediante SDS-PAGE. **a)** Fracción proteica en el pellet (P) y en el sobrenadante (S) de la centrifugación realizada tras la lisis bacteriana. La flecha señala la banda correspondiente al ELR. **b)** Fracciones eluidas (F) durante la purificación mediante cromatografía de afinidad (IMAC). **c)** Polímero purificado.

La retención del ELR en los cuerpos de inclusión se produce, probablemente, debido a la interacción de los grupos ϵ -amino de la lisina con los componentes con carga negativa de la membrana y con los ácidos nucleicos de *E.coli*. A pesar de que la formación de cuerpos de inclusión implica mayor nivel de expresión y protección frente a enzimas proteolíticas [33], la retención de una parte del polímero disminuía el rendimiento de la purificación, puesto que sólo la fracción soluble se purificaba mediante cromatografía de afinidad (IMAC) (apartado 3.3). Se utilizó

esta técnica en lugar del método habitual de purificación de ELRs, basado en ciclos de calentamiento y enfriamiento seguidos de centrifugación, debido a que la fusión del fragmento de anticuerpo al ELR interfiere con el proceso.

La purificación cromatográfica se desarrolló en presencia de sales de guanidina porque se ve dificultada en condiciones nativas en el caso de proteínas que forman cuerpos de inclusión. Tras la eliminación de los agentes desnaturizantes las proteínas recuperan su conformación nativa. Además, ofrece las ventajas de que aumenta la accesibilidad de la cola de polihistidina e inhibe la actividad de fosfatasas y enzimas proteolíticas [28]. La tabla 5 recoge la cantidad total de proteína del extracto crudo y de las fracciones eluidas, que se calculó a partir de la medida de la absorbancia a 280nm. En la figura 9b se muestra el análisis de las fracciones eluidas mediante SDS-PAGE. Las bandas aparecen más difusas en relación a otras electroforesis porque las sales de guanidina precipitan en presencia de SDS e interfieren con el análisis [28]. El ELR se eluyó desde la segunda hasta la octava fracción incluidas, encontrándose la mayor parte en las fracciones tercera y cuarta. Tras la diálisis y liofilización de las fracciones que contenían polímero, se obtuvo una cantidad final de 24.7 mg (Fig 9c).

Tabla 5. Concentración (C), masa total de proteína (M) y volumen (V) del extracto crudo (EC), del flow-through (FT) y de las fracciones eluidas (F) durante la purificación mediante cromatografía de afinidad (IMAC).

	C (mg/ml)	V (ml)	M (mg)		C (mg/ml)	V (ml)	M (mg)
EC	22.683	200	4536.6	F5	0.436	10	4.36
FT	17.375		3475	F6	0.16		1.6
F1	0.124	10	1.24	F7	0.11		1.1
F2	0.57		5.7	F8	0.092		0.92
F3	1.046		10.46	F9	0.095		0.95
F4	1.12		11.2	F10	0.074		0.74

El análisis en SDS-PAGE de las fracciones eluidas y del polímero puro muestra bandas minoritarias además de la correspondiente al ELR. Estas bandas pueden indicar degradación del polímero o unión inespecífica de proteínas de la bacteria, ya que a pesar de que la frecuencia de histidinas en las proteínas es relativamente pequeña (2%) y a pesar de que no poseen cola de polihistidina como el ELR, algunas contienen dos o más residuos adyacentes. La unión inespecífica es la principal desventaja de este tipo de cromatografía. Sin embargo, debido a la presencia de imidazol en los buffers, que compite con las histidinas por la unión al níquel y debido a que esta limitación es más frecuente en sistemas de expresión distintos a *E.coli*, se espera que las uniones inespecíficas sean mínimas [28]. Este aspecto se resuelve mediante el estudio de degradación del siguiente apartado.

2.1.3 Caracterización de P12VOKx72

2.1.3.1 Western-blotting

Esta técnica permitió estudiar la degradación del ELR desde su expresión inicial en el screening hasta la obtención del polímero puro (apartado 3.5.1). El anticuerpo primario utilizado (anti-6x His-tag) reconoce específicamente la cola de polihistidina del extremo C-terminal. El control positivo empleado fue HRGD6, un polímero producido en el laboratorio que contiene cola de polihistidina, mientras que el control negativo fue VOKx72, es decir, el ELR de estudio sin el fragmento variable scFv(P12) y sin His-tag. En la figura 10a se observa que las señales de los controles son las esperadas, lo que indica que la unión de los anticuerpos primario y secundario (Goat Anti-Mouse HRP) se produjo de forma específica.

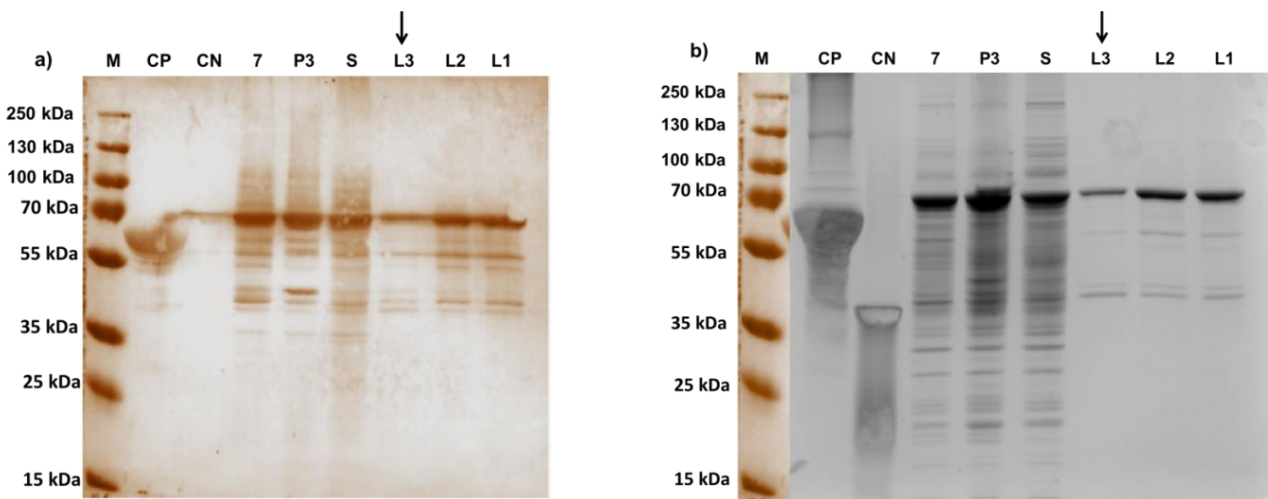


Figura 10. Estudio de degradación mediante western-blot. **a)** Western-blot. **b)** SDS-PAGE después de la transferencia a la membrana. M (marcador de peso molecular, fusionado a la imagen de SDS-PAGE porque se transfirió por completo a la membrana), CP (control positivo, HRGD6), CN (control negativo, VOKx72), 7 (fracción proteica de la colonia productora tras el crecimiento en TB), P3 (fracción proteica de la colonia productora a las 19 horas de inoculación del biorreactor), S (fracción proteica en el sobrenadante de ultrasonidos), L3-L1 (polímero puro de distintos lotes). Las flechas señalan el lote actual.

En relación a P12VOKx72, además de la banda principal (entre 70 y 55 kDa) correspondiente al polímero completo, aparecen bandas minoritarias de tamaño comprendido entre 35 y 55 kDa, desde la expresión inicial en el screening hasta la obtención de la forma pura. El peso molecular teórico del ELR sin el fragmento variable scFv(12) es 33.23 kDa y este se encuentra en el extremo opuesto al de la cola de polihistidina, es decir, en el extremo amino terminal, de manera que la ausencia de bandas de peso molecular inferior a 35 kDa implica que la degradación se produce a nivel del anticuerpo, principalmente. Respecto a la purificación mediante cromatografía de afinidad, este resultado indica que las bandas secundarias detectadas en las fracciones eluidas y en el polímero puro no se deben a proteínas de la bacteria unidas de forma inespecífica, sino a regiones degradadas del ELR.

2.1.3.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF

El análisis mediante espectrometría de masas (apartado 3.5.2) permitió conocer el peso molecular experimental de P12VOKx72. En el espectro (Fig 11) se identifican los picos correspondientes a las distintas especies cargadas del polímero y de una forma degradada. La tabla 6 recoge los pesos moleculares teórico y experimental de todas ellas, que se correlacionan dentro del error experimental.

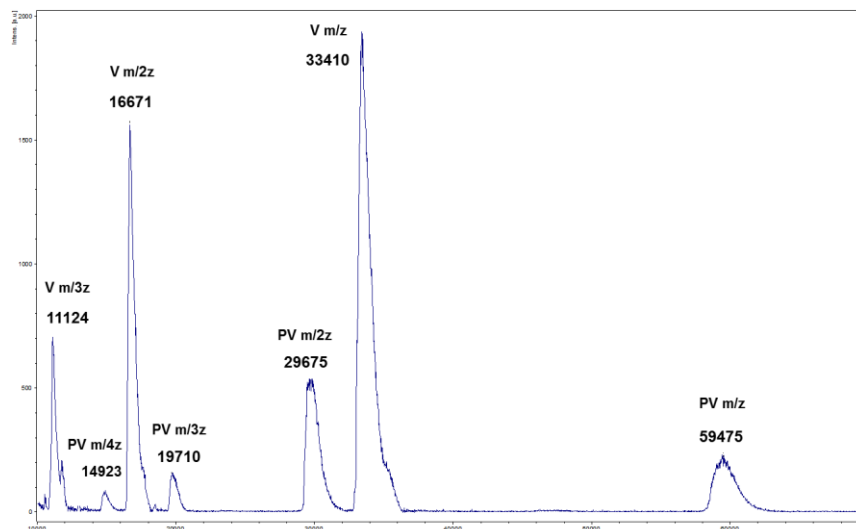


Figura 11. Espectro de masas de P12VOKx72. V (VOKx72), PV (P12VOKx72).

Tabla 6. Pesos moleculares teóricos y experimentales de las especies cargadas de P12VOKx72 y de su forma degradada (VOKx72).

		Peso molecular (kDa)		
		Teórico	Experimental (Media \pm SD)	Error (%)
P12VOKx72	m/z	59.03	$59.48 \pm 1.4 \times 10^{-2}$	0.76
	m/2z	29.52	$29.72 \pm 5.7 \times 10^{-2}$	0.68
	m/3z	19.68	$19.72 \pm 1.8 \times 10^{-2}$	0.20
	m/4z	14.76	$14.9 \pm 2.4 \times 10^{-2}$	0.94
VOKx72	m/z	33.23	$33.40 \pm 7 \times 10^{-3}$	0.51
	m/2z	16.61	$16.68 \pm 1.5 \times 10^{-2}$	0.42
	m/3z	11.08	$11.13 \pm 6 \times 10^{-3}$	0.45

Es probable que la forma degradada sea el polímero sin el fragmento scFv(P12) (VOKx72), ya que su peso molecular teórico es 33.23 kDa y según el estudio anterior la degradación ocurre principalmente a nivel del anticuerpo. Además, en el espectro se observa que esta forma predomina sobre el ELR completo, siendo su abundancia relativa del 80% aproximadamente. No obstante, en el estudio de degradación anterior la banda mayoritaria era la de P12VOKx72, así que probablemente la muestra utilizada para el análisis espectrométrico no sea representativa de

todo el lote producido, en relación a la abundancia relativa anterior. Independientemente, estos dos estudios indican que el fragmento scFv(P12) no es completamente estable.

2.2 Análisis de la interacción entre tenascina-C y TN-9.4 mediante QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring)

Dentro de la misma línea de investigación, el último objetivo consistía en la evaluación de la interacción entre el aptámero TN-9.4 [21] y la tenascina-C, con aplicación en la construcción de una alternativa a P12VOKx72 mediante su conjugación con VOKx72.

Inicialmente se monitorizó la inmovilización a la superficie del sensor de la mezcla del aptámero TN-9.4 con la molécula espaciadora 6-mercaptop-1-hexanol (MCH). La mezcla TN-9.4:MCH produjo una disminución de la frecuencia y un aumento de la disipación hasta alcanzar valores de -23 ± 2 Hz y $2.2 \pm 0.5 \cdot 10^{-6}$ (tercer armónico), respectivamente. Estos cambios indican un aumento de la masa asociada a la superficie y del carácter viscoelástico de la película formada. La estabilización de los parámetros al poco tiempo de que la mezcla entrase en contacto con el sensor se debe, probablemente, a la formación de una nanocapa gracias a los enlaces covalentes entre el oro y los grupos tiol de la molécula del aptámero y de la molécula espaciadora (Fig 12).

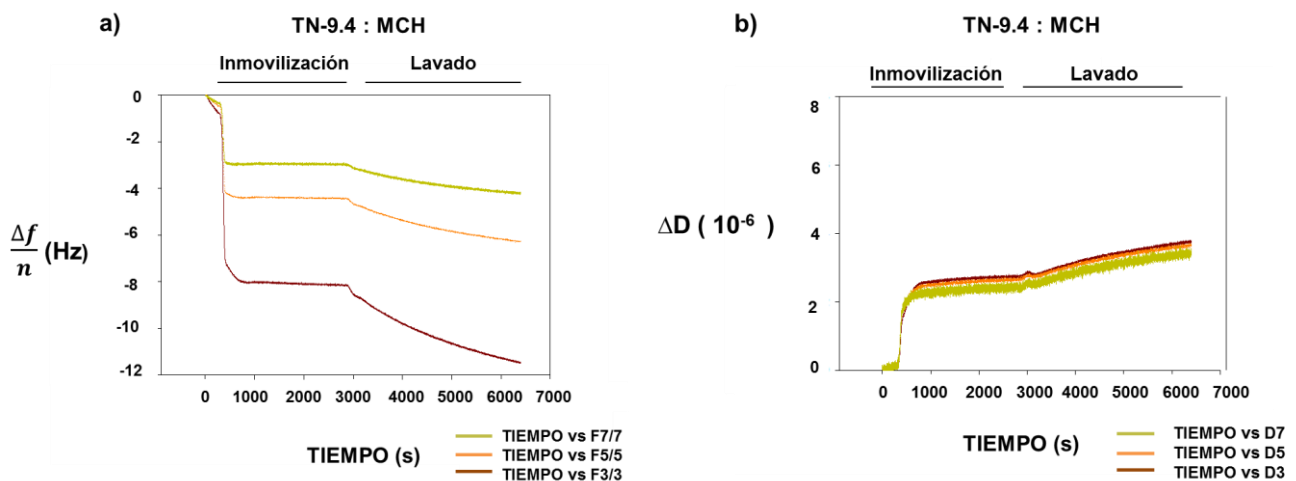


Figura 12. Funcionalización del sensor con la mezcla 1:100 (moles) aptámero:MCH (6-mercaptop-1-hexanol), 100 μM. Variación normalizada de la frecuencia ($\frac{\Delta f}{n}$) **a)** y variación de la disipación (ΔD) **b)** en función del tiempo, correspondientes a los armónicos (n) 3, 5 y 7.

A continuación se llevó a cabo el lavado con PBS1x, durante el cual la frecuencia disminuyó y la disipación aumentó, de forma progresiva, hasta alcanzar valores finales de -29 ± 5 Hz y $2.8 \pm 0.8 \cdot 10^{-6}$ (tercer armónico), respectivamente. Estos cambios eran llamativos, pues se espera que en el lavado la frecuencia se estabilice o aumente debido a la disminución de la masa adsorbida a la superficie tras el arrastre de las moléculas no unidas a la superficie. Sin embargo,

hay que tener en cuenta que la sensibilidad de la técnica permite detectar variaciones en la masa producidas por las moléculas de solvente asociadas a las moléculas depositadas. Es probable que durante el lavado esté aumentando el nivel de hidratación del film, ya que suele ser alto en el caso de oligonucleótidos unidos a la superficie por un extremo y, además, una mayor hidratación implica tanto un aumento en la masa del film como una mayor disipación de la energía [22]. Se ha descrito que el nivel medio de hidratación correspondiente a una mezcla 1:100 aptámero:MCH es de 0.8 [25] (Fig 12).

Tabla 7. Valores medios y desviación estándar de los parámetros calculados mediante el modelo viscoelástico Broad fit, correspondientes a la inmovilización del aptámero (TN-9.4:MCH) y a la adición de tenascina-C sobre el sensor funcionalizado (TN-9.4:MCH) y sobre el sensor desnudo (Au). m (masa depositada), η (viscosidad), μ (módulo elástico). Los valores de chi-cuadrado (χ^2) describen la calidad del ajuste.

	TN-9.4 : MCH	Tenascina-C (TN-9.4 : MCH)	Tenascina-C (Au)
Espesor (nm)	22.33 \pm 2.31	31.67 \pm 2.89	18
m (ng/cm²)	2300 \pm 173.21	3533.33 \pm 57.74	2200
η (μPa·s)	1525 \pm 35.36	1600 \pm 30.21	1150
μ (kPa)	26 \pm 5.66	28 \pm 2.12	12
χ^2	0.5	0.1	0.4

En concordancia con estudios previos [22], tanto el valor de la disipación ($\Delta D > 2 \cdot 10^{-6}$) como la separación de las frecuencias entre los distintos armónicos ($n = 3, 5$ y 7) indican que la película formada no es rígida, sino de carácter viscoelástico. Por lo tanto, no se puede utilizar la ecuación de Sauerbrey para el cálculo de la masa depositada. La tabla 7 recoge los parámetros calculados aplicando el modelo viscoelástico Broad fit, que se seleccionó porque era el modelo con el que se obtenían valores más bajos de χ^2 , es decir, era el que mejor se ajustaba a los datos experimentales. A partir de la masa depositada (2300 ± 173.21 ng/cm²) y asumiendo el nivel de hidratación mencionado anteriormente, se estima que la densidad aproximada de moléculas de aptámero y MCH unidas a la superficie de oro del sensor es de $9.019 \cdot 10^{12}$ moléculas/cm² y $9.026 \cdot 10^{14}$ moléculas/cm², respectivamente. El valor del espesor proporcionado por el modelo (22.33 ± 2.31 nm) sugiere que el aptámero no está formando una estructura secundaria, ya que se correlaciona con el valor teórico obtenido si se considera una elongación por base de 0.4 nm (22 nm). La conformación estirada implica mayor flexibilidad e hidratación, lo que puede explicar el carácter viscoelástico estimado. Es posible que la estructura secundaria se adquiriera por un cambio conformacional inducido por la proteína.

La adición de tenascina-C tras la inmovilización del aptámero produjo cambios progresivos en la frecuencia y en la disipación, a diferencia de lo sucedido durante la reacción de los grupos tiol con el oro, ya que en este caso las posibles interacciones son no covalentes. Los valores al final del

lavado fueron -46 ± 4 Hz y $8.98 \pm 0.5 \cdot 10^{-6}$ (tercer armónico), respectivamente. La elevada disipación indica que el carácter viscoelástico de la película formada es superior al de la mezcla aptámero:MCH, como era de esperar al tratarse de una proteína de gran tamaño (290 kDa) (Fig 13a, c).

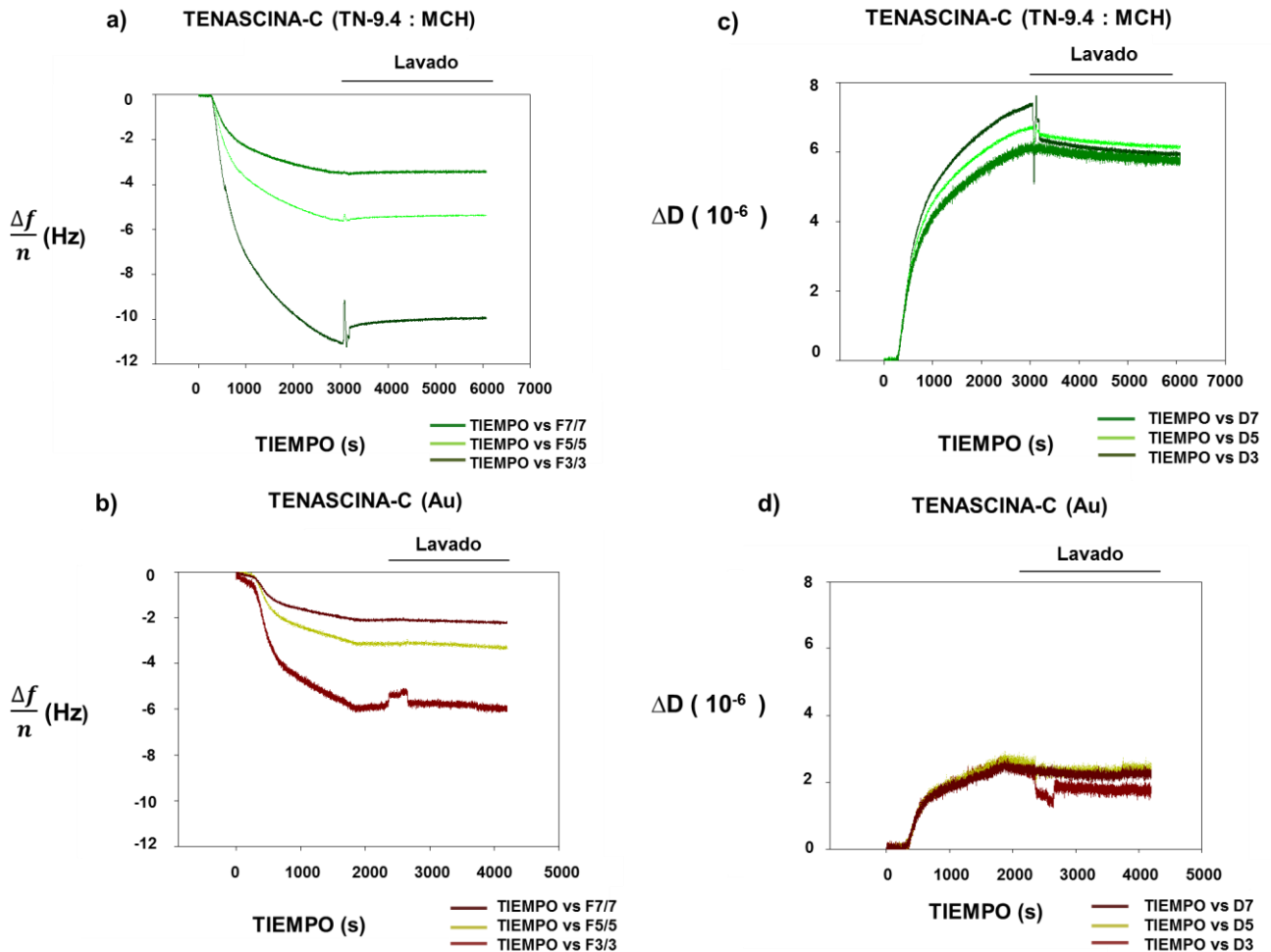


Figura 13. Análisis de los cambios de frecuencia y disipación producidos tras la adición de tenascina-C. Variación normalizada de la frecuencia ($\frac{\Delta f}{n}$) en función del tiempo, correspondiente al paso de tenascina-C sobre el sensor funcionalizado **a)** y sobre la superficie desnuda **b)**. Variación de la disipación (ΔD) en función del tiempo, correspondiente a la adición de tenascina-C sobre el sensor funcionalizado **c)** y sobre la superficie desnuda **d)**. Se representan los armónicos (n) 3, 5 y 7.

La exposición de la superficie desnuda (Au) a tenascina-C condujo a una variación en la frecuencia de -18 Hz y a un aumento en la disipación de $1.75 \cdot 10^{-6}$, siendo estos cambios un 60% y un 80% inferiores a los anteriores, respectivamente. Sin embargo, no se consiguió su disociación de la superficie con el lavado. Esto puede deberse a la formación de algún enlace covalente entre el oro y alguna cisteína del dominio de asociación de las subunidades de la tenascina-C (dominio TA), ya que contiene 6 residuos de cisteína y el enlace entre el grupo tiol y el oro es más fuerte que los puentes disulfuro entre las subunidades [20] (Fig 13b, d). En las figuras 13b y 13d se observa que la frecuencia y la disipación siguen una cinética intermedia entre la de la inmovilización de la mezcla TN-9.4:MCH y la de la interacción de la tenascina-C con la

película TN-9.4:MCH, lo que podría indicar la formación de interacciones hidrofóbicas entre la proteína y el oro, además de los enlaces covalentes mencionados. De la misma forma que durante la funcionalización del sensor, las frecuencias entre los armónicos se separaban y los valores de disipación no eran pequeños, así que el análisis de los datos se realizó aplicando el modelo viscoelástico Broad fit (Tabla 7).

Respecto al tratamiento con BSA del sensor funcionalizado (adición de BSA sobre la mezcla TN-9.4:MCH), la frecuencia tan sólo disminuyó 2 Hz, recuperó el nivel basal tras el lavado y, al poco tiempo, los parámetros empezaron a comportarse de la misma forma que durante el lavado tras la inmovilización del aptámero, lo que confirmaba que el BSA no se había retenido y la capa de aptámeros continuaba hidratándose (Fig 14). Por esta razón no se realizó un modelado de los datos.

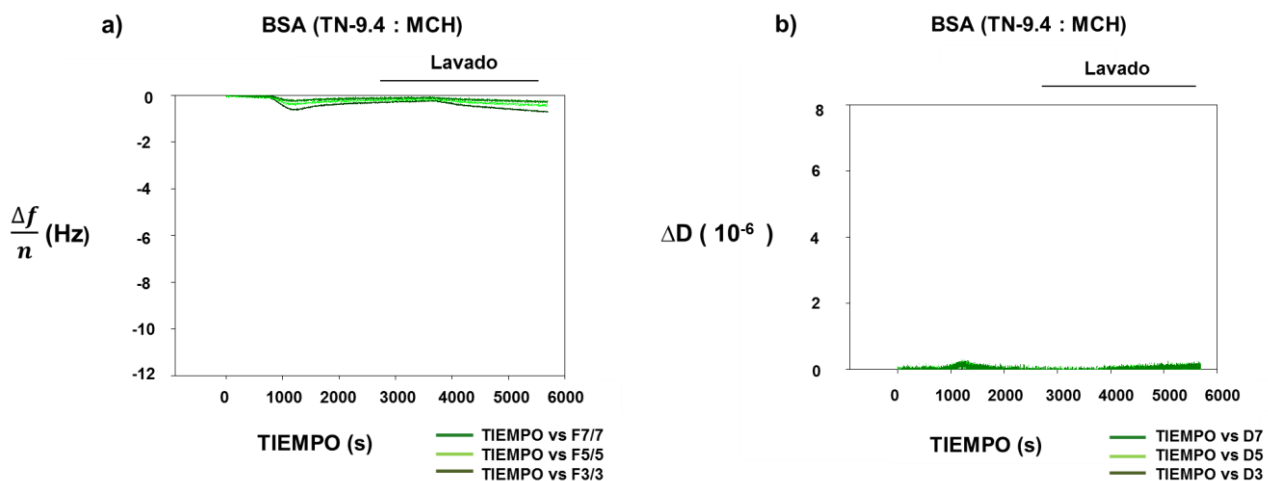


Figura 14. Análisis de los cambios de frecuencia y disipación producidos tras la adición de BSA sobre el sensor funcionalizado con la mezcla aptámero:MCH. Variación normalizada de la frecuencia ($\frac{\Delta f}{n}$) **a)** y variación de la disipación (ΔD) **b)** en función del tiempo, correspondientes a los armónicos (n) 3, 5 y 7.

La diferencia entre la masa de tenascina-C depositada sobre la película aptámero:MCH ($3533.33 \pm 57.74 \text{ ng/cm}^2$) y la masa de proteína depositada durante los controles negativos (2200 ng/cm^2 : tenascina-C (Au) y 0 ng/cm^2 : BSA (TN-9.4:MCH)) sugiere que la interacción entre el aptámero TN-9.4 y la tenascina-C es específica. Además, el espesor de la capa formada por la tenascina-C sobre la película TN-9.4:MCH ($31.67 \pm 2.89 \text{ nm}$) es superior al espesor de la capa formada por la proteína sobre la superficie del sensor (18 nm), lo que indica que la tenascina-C adopta una conformación más estirada sobre la película TN-9.4:MCH. Esto implica que la interacción de la tenascina-C con el film formado por la mezcla TN-9.4:MCH se produce por una región más restringida que con la superficie de oro del sensor, lo que apoya la especificidad de la interacción. No obstante, debido a que el aptámero se ha inmovilizado junto al MCH, sería necesario analizar el efecto de la tenascina-C sobre esta molécula espaciadora para demostrarlo.

Conclusiones

En vista a los resultados obtenidos se llegó a las siguientes conclusiones:

- En relación a la síntesis del aptámero 68 (ssRNA) mediante transcripción *in vitro*, el análisis electroforético en condiciones nativas y desnaturalizantes no solo permitió conocer que el tamaño del transcrito era el adecuado, sino también su resistencia a la desnaturalización en comparación con el control, lo que refleja la formación de múltiples interacciones intra-catenarias (puentes de hidrógeno), indicativas de un elevado potencial para adoptar estructuras tridimensionales complejas.

- Respecto a la producción y caracterización del ELR P12VOKx72, se ha demostrado que el fragmento de anticuerpo scFv(P12) se degrada en una fracción del ELR desde su expresión inicial en *E.coli*, lo que podría disminuir la eficacia del poliplexo *in vivo*.

- En relación al análisis mediante QCM-D, la medida de la disipación de la energía en paralelo con la frecuencia de resonancia permitió conocer que las películas formadas por la mezcla TN-9.4:MCH y por la tenascina-C eran de carácter viscoelástico, probablemente debido a la estructura flexible e hidratada del aptámero y al tamaño de la proteína, respectivamente. Además, la combinación de estos dos parámetros permitió analizarlas sin producir una subestimación de la masa depositada, lo que habría sucedido con la técnica convencional, que únicamente mide la frecuencia y solo se puede aplicar a películas rígidas.

- El espesor de la película aptámero:MCH sugiere que la estructura tridimensional del aptámero TN-9.4 es inducida por la tenascina-C.

- Finalmente, la masa y el espesor de la nanocapa de tenascina-C formada sobre la película TN-9.4:MCH sugieren que la interacción entre la proteína y el aptámero TN-9.4 es específica, en relación a los controles negativos. Sin embargo, sería necesario analizar el efecto de la tenascina-C sobre el 6-mercaptop-1-hexanol (MCH) para demostrarlo, así como complementar la información obtenida en el análisis mediante otras técnicas, como SPR.

Bibliografía

- 1 **Arias FJ, Santos M, Ibáñez-Fonseca A, Piña MJ, Serrano S.** Elastin-like recombinamers as smart drug delivery systems. *Current Drug Targets*. 2016;17:1-20.
- 2 **Rodríguez-Cabello JC, Arias FJ, Alonso M, Girotti A.** Elastin-like polypeptides in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;97:85-100.
- 3 **Rodríguez-Cabello JC, Piña MJ, Ibáñez-Fonseca A, Fernández-Colino A, Arias FJ.** Nanotechnological approaches to the therapeutic delivery using elastin-like recombinamers. *Bioconjug Chem*. 2015;26(7):1252–65.
- 4 **Piña MJ, Alex SM, Arias FJ, Santos M, Rodríguez-Cabello JC, Ramesan RM, et al.** Elastin-like recombinamers with acquired functionalities for gene-delivery applications. *J Biomed Mater Res Part A*. 2015;103(10):3166–78.
- 5 **Piña MJ, Girotti A, Santos M, Rodríguez-Cabello JC, Arias FJ.** Biocompatible ELR-based polyplexes coated with MUC1 specific aptamers and targeted for breast cancer gene therapy. *Mol Pharm*. 2016;13(3):795–808.
- 6 **Conrad U, Plagmann I, Malchow S, Sack M, Floss DM, Kruglov AA, et al.** ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. *Plant Biotechnol J*. 2011;9:22–31.
- 7 **Groff K, Brown J, Clippinger AJ.** Modern affinity reagents: recombinant antibodies and aptamers. *Biotechnol Adv*. 2015;33(8):1787–98.
- 8 **Crivianu-Gaita V, Thompson M.** Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: an overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosens Bioelectron*. 2016;85:32–45.
- 9 **Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, Chang YF, Lynott CK, Heil J, et al.** Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med*. 2006;47(4):668–78.
- 10 **Nelson AL.** Antibody fragments. *MAbs*. 2010;2(1):77–83.
- 11 **Zhou J, Rossi J.** Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(3):181–202.
- 12 **Chatelain E.** Chagas disease research and development: is there light at the end of the tunnel? *Comput Struct Biotechnol J*. 2017;15:98–103.
- 13 **Romero EL, Morilla MJ.** Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. 2015;10(3):465–81.
- 14 **Romero EL, Morilla MJ.** Nanotechnological approaches against Chagas disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;62(4-5):576–88.
- 15 **Nagarkatti R, Bist V, Sun S, Fortes de Araujo F, Nakhasi HL, Debrabant A.** Development of an aptamer-based concentration method for the detection of *Trypanosoma cruzi* in blood. *PLoS One*. 2012;7(8):e43533.
- 16 **American Cancer Society.** Cancer Facts and Figures 2016, 1-66.
- 17 **Orend G, Chiquet-ehrisman R.** Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett*. 2006;244(2):143–63.
- 18 **Brack SS, Silacci M, Birchler M, Neri D.** Tumor-targeting properties of novel antibodies specific to the large isoform of tenascin-C. *Clin Cancer Res*. 2006;12(10):3200–8.

- 19 Hancox RA, Allen MD, Holliday DL, Edwards DR, Pennington CJ, Guttery DS, et al.** Tumor-associated tenascin-C isoforms promote breast cancer cell invasion and growth by matrix metalloproteinase-dependent and independent mechanisms. *Breast Cancer Res.* 2009;11(2):R24.
- 20 Luczak JA, Redick SD, Schwarzbauer JE.** A single cysteine, Cys-64, is essential for assembly of tenascin-C hexabrachions. *J Biol Chem.* 1998;273(4):2073–7.
- 21 Hicke BJ, Marion C, Chang YF, Gould T, Lynott CK, Parma D, et al.** Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein. *J Biol Chem.* 2001;276(52):48644–54.
- 22 Osypova A, Thakar D, Dejeu J, Bonnet H, Van der Heyden A, Dubacheva G V, Richter RP, et al.** Sensor based on aptamer folding to detect low-molecular weight analytes. *Anal Chem.* 2015;87(15):7566–74.
- 23 Lee H, Contarino M, Umashankara M, Schön A, Freire E, Smith III AB, et al.** Use of the quartz crystal microbalance to monitor ligand-induced conformational rearrangements in HIV-1 envelop protein gp120. *Anal Bioanal Chem.* 2010;396(3):1143–52.
- 24 Reimhult E, Larsson C, Kasemo B, Höök F.** Simultaneous Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring measurements of biomolecular adsorption events involving structural transformations and variations in coupled water. 2004;76(24):7211–20.
- 25 Formisano N, Jolly P, Bhalla N, Cromhout M, Flanagan SP, Fogel R.** Optimisation of an electrochemical impedance spectroscopy aptasensor by exploiting quartz crystal microbalance with dissipation signals. *Sensors Actuators B Chem.* 2015;220:369–75.
- 26 Masek T, Vopalensky V, Suchomelova P, Pospisek M.** Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal Biochem.* 2005;336(1):46–50.
- 27 Aranda PS, LaJoie DM, Jorczyk CL.** Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality electrophoresis. 2012;33(2):366–9.
- 28 Bornhorst JA, Falke JJ.** Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol.* 2000;326:245–54.
- 29 Bini A, Minunni M, Tombelli S, Centi S, Mascini M.** Analytical performances of aptamer-based sensing for thrombin detection. *Anal Chem.* 2007;79(7):3016–9.
- 30 Schmidt T, Friehs K, Schleef M, Voss C, Flaschel E.** Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 1999;274(2):235–40.
- 31 Das S, Dash HR.** Cloning and transformation. In: *Microbial Biotechnology- A Laboratory Manual for Bacterial Systems.* 2014. p. 35–72.
- 32 Beckert B, Masquida B.** Synthesis of RNA by *in vitro* transcription. *Methods Mol Biol.* 2011;703:29–41.
- 33 Makrides SC.** Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews.* 1996;60(3):512–38.