

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

Dianas moleculares para la generación de reactivos específicos para el transporte de fármacos



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Francisco José Reche Pérez

Facultad de Farmacia

Programa de Doctorado en Farmacia

2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Francisco José Reche Pérez

ISBN: 978-84-1306-943-2

URI: <http://hdl.handle.net/10481/69653>

Esta Memoria ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada. Los gastos experimentales derivados de la misma han sido sufragados por el Proyecto CTQ2014-55474-C2-2-R (Ministerio de Economía y Competitividad) “Evaluación Biológica en Cultivos Celulares Y Modelos Animales del Transporte Dirigido de Fármacos Mediado por Nuevos Vectores Antitumorales Basados en Ciclodextrinas”, y el Proyecto CTQ2017-86125-P (Ministerio de Economía y Competitividad) “1. Carbon dots funcionales: síntesis, caracterización y aplicaciones biológicas”.



Parte de los resultados que se recogen en esta tesis han sido presentados en el XLI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Y publicados en Biomaterials Science – Royal Society of Chemistry.

Lo que hacemos en vida tiene
su eco en la eternidad
(Gladiator)

A mi abuelo

Agradecimientos

Anexo: Siglas y abreviaciones

APS	Persulfato de amonio	GFP	Green fluorescent protein/Proteína fluorescente verde
AKT	Proteína quinasa B	HEPES	Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
ATP	Adenosín trifosfato	HER2	Receptor para el factor de crecimiento de tipo epidérmico humano 2
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia	I330W	Sustitución de una Isoleucina por un Triptófano en la posición 330
BRCA1/ BRCA2	Gen supresor de tumor	I334W	Sustitución de una Isoleucina por un Triptófano en la posición 334
BSA	Albúmina sérica bovina	ICG	Indocianina verde
CD	Ciclodextrina	IMAC	Cromatografía de afinidad inmovilizada de ion metálico
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	IVIS	Sistema de adquisición de imágenes in vivo (in vivo imaging system)
DMSO	Dimetilsulfóxido	LB	Luria-Bertani
DOX	Doxorubicina	MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
DNA	Ácido desoxirribonucleico	MBP	Maltose binding protein/Proteína de unión a maltosa
pDNA	DNA plasmídico	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
EDTA	Ácido etilen diaminotetraacético		
ER	Receptor de estrógenos		
ERBB	Receptor de factores de crecimiento epidérmico		
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares		
FBS	Suero bovino fetal (Fetal bovine serum)		
FDA	Administración de alimentos y medicamentos (EEUU)		

NIR	Near infrared/Infrarrojo cercano	PEI25kDa	Polietilenimina de 25.000 Da
NIR-Mal	Infrarrojo cercano unido a maltosa	PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
O/N	Over night/Durante la noche	PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
OMS	Organización mundial de la salud	PR	Receptor de progesterona
P53	Gen/proteína supresora de tumores	PVDF	Fluoruro de polivinilideno
PBS	Tampón salino	TEMED	Tetrametiletildiamina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	TEV	Proteasa del virus del grabado del tabaco
PEG	Polietilenglicol	RNA	Ácido ribonucleico
PEI	Polyethylenimine	ScFv	Fragmento variable de cadena sencilla
PEI2kDa	Polietilenimina de 2.000 Da	SDS	Dodecil sulfato sódico

Abreviaturas de la proteína de fusión

NIR-Mal-MBP _{I334W} -ScFV _{HER2}	Una molécula de NIR unida covalentemente a la maltosa que a su vez se une a la proteína de fusión.
FL-MBP _{I334W} -ScFV _{HER2}	Una molécula de fluoresceína unida covalentemente a la maltosa que a su vez se une a la proteína de fusión.
DOX-βCDbPEI2k-Mal	Cuatro moléculas de doxorubicina ocluidas en cuatro ciclodextrinas unidas a un PEI2kDa, unido covalentemente a la maltosa.
[DOX-βCDbPEI2k-Mal]- [MBP _{I334W}]	Cuatro moléculas de doxorubicina ocluidas en cuatro ciclodextrinas unidas a un PEI2kDa, unido covalentemente a la maltosa. La maltosa se une a la proteína de unión a maltosa.
[DOX-βCDbPEI2k-Mal]- [MBP _{I334W} -ScFV _{HER2}]	Cuatro moléculas de doxorubicina ocluidas en cuatro ciclodextrinas unidas a un PEI2kDa, unido covalentemente a la maltosa. La maltosa se une a la proteína de fusión.
[ICG-βCDbPEI2k-Mal]- [MBP _{I334W}]	Cuatro moléculas de indocianina ocluidas en cuatro ciclodextrinas unidas a un PEI2kDa, unido covalentemente a la maltosa. La maltosa se une a la proteína de unión a maltosa.
[ICG-βCDbPEI2k-Mal]- [MBP _{I334W} -ScFV _{HER2}]	Cuatro moléculas de indocianina ocluidas en cuatro ciclodextrinas unidas a un PEI2kDa, unido covalentemente a la maltosa. La maltosa se une a la proteína de fusión.
PEI25k-Mal	PEI25kDa unido covalentemente a la maltosa.
[bPEI25k-Mal]-[MBP _{I334W}]	PEI25kDa unido covalentemente a la maltosa, unida a la proteína de unión a la maltosa.
[bPEI25k-Mal]-[MBP _{I334W} - ScFV _{HER2}]	PEI25kDa unido covalentemente a la maltosa, unida a la proteína de fusión.

Contenido

1. Resumen.....	21
2. Antecedentes.....	22
2.1 Prevalencia del cáncer de mama	22
2.2 El cáncer de mama.....	24
2.2.1 Receptor ERBB2 o HER2	25
2.3 Técnicas de diagnóstico empleadas en el cáncer.....	26
2.3.1 Antecedentes en el diagnóstico por imagen	26
2.3.2 Técnicas de diagnóstico de imagen molecular por fluorescencia.....	27
2.3.3 Moléculas Near infrared (NIR).....	30
2.4 Tratamientos contra el cáncer	32
2.4.1 Tratamientos actuales contra el cáncer de mama	32
Cirugía	32
Radioterapia.....	33
Quimioterapia.....	33
Inmunoterapia: Los anticuerpos monoclonales y el trastuzumab.....	36
Terapia génica en el cáncer	39
2.5 Técnicas de transfección.....	41
2.5.1 Polietilenimina o PEI	42
2.6 Nanotecnología	42
2.6.1 Características de las nanopartículas	43
2.6.2 Técnicas Teragnósticas	45
Ciclodextrinas	46
2.7 Proteínas de fusión.....	47
2.7.1 Proteína de unión a maltosa (MBP) como proteína de fusión	48
3. Objetivos	50
4. Material y Métodos.....	51
4.1 Material.....	51
4.1.1 Instrumentación	51
4.1.2 Líneas celulares.....	53
4.1.2.1 Líneas celulares procariotas.....	53
4.1.2.2 Líneas celulares eucariotas	54
4.1.3 Animales de experimentación	54

4.1.4	Material de cultivo de células	55
4.1.4.1	Medios de cultivo para células procariotas.....	55
4.1.4.2	Medios de cultivo para células eucariotas	55
4.1.5	Material para la manipulación de ácidos nucleicos.....	56
4.1.5.1	Plásmidos y Oligonucleótidos	56
4.1.6	Material para la manipulación de proteínas	59
4.1.7	Material informático y análisis estadístico	60
4.1.8	Material para la experimentación general	60
4.2	Métodos.....	61
4.2.1	Metodología en células procariotas	61
4.2.1.1	Preparación de células competentes	61
4.2.1.2	Transformación bacteriana por choque térmico.....	61
4.2.1.3	Inducción de la síntesis de proteínas	62
4.2.2	Metodología para la manipulación de células eucariotas.....	62
4.2.2.1	Cultivo celular y tripsinización	62
4.2.2.2	Recuento celular	62
4.2.2.3	Criogenización celular	63
4.2.2.4	Transfección celular retroviral.....	64
4.2.2.5	Transfección celular no retroviral	65
4.2.2.6	Cuantificación de la eficiencia de transfección	66
4.2.2.7	Microscopía confocal de fluorescencia.....	66
4.2.2.8	Ensayos de captación de Doxorubicina por fluorescencia	67
4.2.2.9	Ensayos de captación de Doxorubicina empleando citometría de flujo .	67
4.2.2.10	Ensayos de viabilidad celular y proliferación celular basados en MTT.	67
4.2.3	Métodos para la manipulación de proteínas	68
4.2.3.1	Purificación de proteínas	68
4.2.3.2	Preparación de extractos proteicos	69
4.2.3.3	Cuantificación de la concentración de proteínas.....	69
4.2.3.4	Electroforesis vertical en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)	69
4.2.3.5	Western Blot.....	70
4.2.3.6	Ensayo de estabilidad térmica empleando Thermal Shift Assay	71
4.2.4	Métodos para la manipulación de ácidos nucleicos	72
4.2.4.1	Aislamiento y purificación de DNA plasmídico	72

4.2.4.2	Cuantificación DNA	73
4.2.4.3	Digestión con endonucleasas de restricción.....	73
4.2.4.4	Electroforesis horizontal en geles de agarosa.....	73
4.2.4.5	Ligación de DNA	74
4.2.4.6	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	74
4.2.4.7	Mutación dirigida Quick Change.....	75
4.2.4.8	Construcciones realizadas en el laboratorio.....	76
4.2.4.9	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética.....	76
4.2.4.10	Ensayos de protección frente a DNAsas	77
4.2.5	Manipulación <i>in vivo</i>	77
4.2.5.1	Ensayos de captación de Doxorubicina <i>in vivo</i>	77
4.2.5.2	NIR <i>in vivo</i>	78
4.2.5.3	Transfección <i>in vivo</i>	78
5.	Resultados	79
5.1	Estrategia de diseño de vectores teragnósticos.....	79
5.2	Optimización mediante mutagénesis dirigida de la proteína de unión a maltosa	81
5.2.1	Optimización de la Proteína de unión a Maltosa empleando mutagénesis dirigida para aumentar la afinidad.....	83
5.2.1.1	Expresión y análisis de los mutantes de la proteína de unión a maltosa	86
5.2.2	Análisis de la afinidad de la MBP y sus mutantes por la maltosa empleando Thermal Shift Scan Assay	89
5.2.3	Análisis de la proteína de unión a Maltosa empleando <i>Thermal Shift Assay</i> .	93
5.3	Clonación y expresión heteróloga de la proteína de fusión MBP _{I334W} -TEV-ScFv _{HER2} -His.....	96
5.3.1	Análisis de la funcionalidad de la proteína de fusión MBP _{I334W} -ScFv _{HER2} -His	98
5.4	El complejo MBP-ScFv como sistema de diagnóstico de imagen.....	99
5.4.1	Ensayos <i>in vitro</i>	99
5.4.1.1	Uso de la proteína de fusión como anticuerpo anti-HER2	99
5.4.1.2	Uso del complejo MBP _{I334W} -ScFv _{HER2} como agente de diagnóstico	101
5.4.2	Ensayos <i>in vivo</i>	104
5.5	Uso de MBP _{I334W} -ScFv _{HER2} para el transporte de fármacos	106
5.5.1	Uso <i>in vivo</i> de MBP _{I334W} -ScFv _{HER2} para el transporte de fármacos	113
5.6	Ensayos de transfección mediados por MBP _{I334W} -ScFv _{HER2}	115
5.6.1	Ensayos <i>in vitro</i>	115

5.6.1.1 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética	115
5.6.1.2 Ensayos de protección frente a DNAsas	116
5.6.1.3 Ensayos de eficiencia de transfección en cultivos celulares	118
5.6.2 Ensayos <i>in vivo</i>	119
6. Discusión.....	121
7. Conclusiones	134
8. Bibliografía	135

Índice de Figuras

Figura 2.1 Estimación de la incidencia mundial de cáncer	22
Figura 2.2 Estimación de la incidencia y la mortalidad mundial por cáncer de mama.	23
Figura 2.3 La familia ERBB	25
Figura 2.4 Sustitución de la glucosa por 18F FDG	28
Figura 2.5 Representación esquemática de la instrumentación requerida para la detección de fluorescencia en un organismo vivo	29
Figura 2.6 Estructura 3D de la doxorubicina	34
Figura 2.7 Rutas de transducción de señales en las células tumorales que favorecen su supervivencia y crecimiento inhibiendo mecanismos como la apoptosis	37
Figura 2.8 Modelo de anticuerpo y anticuerpo ScFv.....	38
Figura 2.9 Esquema de las etapas del diagnóstico por imagen en el cáncer.....	45
Figura 2.10 Representación esquemática de las ciclodextrinas empleadas en el transporte de fármacos.	46
Figura 2.11 Estructura de la MBP.....	48
Figura 4.1 Mapa de restricción del plásmido pMAL-c2X	56
Figura 4.2 Mapa de restricción del plásmido pACgp67B-HER2	57
Figura 4.3 Mapa de restricción del plásmido pBABEpuro-ERBB2.....	58
Figura 4.4.4 Representación esquemática de la cámara de Neubauer	63
Figura 5.1 Esquema de la proteína recombinante MBP-ScF _{V_{HER2}}	80
Figura 5.2 Representación de la unión de la maltosa a la proteína MBP en PyMol.....	82
Figura 5.3 Configuración abierta de la proteína de unión a Maltosa	83
Figura 5.4 Configuración cerrada de la proteína de unión a Maltosa.....	84
Figura 5.5 Modelo predictivo de las interacciones moleculares antes y después de insertar las mutaciones en la proteína de unión a Maltosa en la configuración abierta	85
Figura 5.6 Modelo predictivo de las interacciones moleculares antes y después de insertar las mutaciones en la proteína de unión a Maltosa en la configuración cerrada	86
Figura 5.7 Fragmento de la secuencia del plásmido pMal-TEV-His correspondiente al final de la región codificante para la MBP, el sitio de procesamiento de la proteasa TEV, el polilinker y la cola de poli-His.....	87
Figura 5.8 Expresión recombinante de la MBP _{wt} y MBPs mutadas en bacterias	88
Figura 5.9 Expresión de las proteínas recombinantes purificadas a partir de los extractos crudos	89
Figura 5.10 Espectro de fluorescencia de emisión de NIR-Mal unido a MBP y sus mutantes	90
Figura 5.11 Determinación de la constante de afinidad de la MBP y sus mutaciones .	90
Figura 5.12 Ensayo de capacidad de unión de la MBP a NIR-Mal en geles no desnaturizantes de poliacrilamida	92
Figura 5.13 Valores de termoestabilidad base de la proteína MBP, y los mutantes seleccionados para su estudio.....	94

Figura 5.14 Incremento de termoestabilidad entre la MBP y los mutantes de estudio a concentraciones crecientes de Maltosa.....	95
Figura 5.15 Expresión de las proteínas recombinantes MBP _{I334W} y MBP _{I334W} -ScFv _{HER2} -His antes y después de la inducción de la expresión.....	96
Figura 5.16 Composición extracto proteico de MBP-ScFv durante las etapas de purificación	97
Figura 5.17 Incubación de la proteína MBP _{I334W} -ScFv _{HER2} con la proteasa TEV	98
Figura 5.18 Desapilamiento del fluoróforo basado en cianuro (NIR) inducido por la unión de la Maltosa a la proteína de fusión.....	99
Figura 5.19 Electroforesis de la proteína MBP _{I334W} -ScFv _{HER2} marcada con Fluoresceína-Biotina.....	100
Figura 5.20 Expresión de HER2 en diferentes líneas celulares	101
Figura 5.21 Imágenes de células que expresan el receptor HER2 o no utilizando la proteína MBP _{I334W} -ScFv _{HER2} unida a fluoresceína o a NIR-Mal	104
Figura 5.22 Imágenes in vivo de ratones NSG con xenografts de células que expresan HER2.....	105
Figura 5.23 Transporte dirigido de DOX mediado por el complejo MBP _{I334W} -ScFv _{HER2}	107
Figura 5.24 Análisis de citometría de flujo del transporte de DOX mediado por el complejo MBP _{I334W} -ScFv _{HER2}	108
Figura 5.25 Imágenes de microscopia confocal de células que expresan o no HER2 incubadas con DOX vehiculada en MBP _{I334W} -ScFv _{HER2}	110
Figura 5.26 Citotoxicidad de la DOX vehiculada en MBP _{I334W} -ScFv _{HER2}	111
Figura 5.27 Activación de las rutas de señalización dependientes de AKT y ERK1/2 mediada por MBP _{I334W} -ScFv _{HER2}	112
Figura 5.28 Distribución in vitro e in vivo de [ICG-βCdbPEI2k-Mal]-[MBP _{I334W} -ScFv _{HER2}]	114
Figura 5.29 Cambio en la movilidad electroforética de los complejos entre los diferentes compuestos y el DNA.....	116
Figura 5.31 Ensayo de protección del DNA frente a DNAsaI	117
Figura 5.32 Transfección in vitro con el plásmido pEGFP-N3 incubado con bPEI25k, bPEI25k-Mal, [bPEI25k-Mal]-[MBP _{I334W}] y [bPEI25k-Mal]-[MBP _{I334W} -ScFv _{HER2}] en células que expresan HER2 (SKBR3 y MDA-HER2+) y en células que carecen del receptor (MDA-MB-231).....	118
Figura 5.33 Transfección dirigida hacia células HER2+ in vivo	120

1. Resumen

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial, aumentando cada año el número de personas que se ven afectadas por esta enfermedad. Un diagnóstico temprano es el método más eficaz para tratar el cáncer y disminuir el impacto negativo derivado de esta enfermedad. Además, los tratamientos actuales conllevan una serie de efectos secundarios que reducen la calidad de vida del paciente durante el tratamiento, pudiendo llegar a repercutir tanto en el pronóstico como en el bienestar del paciente.

En la actualidad, los agentes de diagnóstico por imagen intravenosos asumen un nuevo rol significativo en la prevención del cáncer. En la pasada década han evolucionado en cuanto a la cantidad de información que obtenemos, pasando de obtener información anatómica a adquirir conjuntamente una imagen anatómica y bioquímica. Estos datos permiten la monitorización de la enfermedad durante el tratamiento.

La idea de combinar en una única nanopartícula la capacidad de diagnóstico, transporte de fármaco y ácidos nucleicos, es una estrategia que se puede llevar a cabo en el campo de la nanotecnología. Si se consigue desempeñar estas funciones de manera selectiva podremos solucionar parte de los problemas descritos previamente.

El uso de fragmentos de anticuerpos monoclonales, como los fragmentos variables de cadena sencilla (ScFv) para la administración selectiva de agentes terapéuticos antitumorales a células cancerosas, es una idea atractiva debido a que junto a la especificidad que confieren presentan un tamaño más pequeño, una menor inmunogenicidad comparados con los anticuerpos monoclonales, y además, su producción tiene coste más bajo. No obstante, la preparación de conjugados terapéuticos basados en ScFv requiere generalmente una activación química previa, además de modificación tanto del ScFv como de la molécula terapéutica. En esta tesis doctoral proponemos una alternativa que no requiere modificaciones covalentes y que se basa en la obtención de una proteína de fusión entre la proteína de unión a Maltosa (MBP) y un ScFv frente al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2).

Una versión mutada de la MBP con mayor afinidad por sus ligandos se ha utilizado para la unión no covalente de diferentes compuestos maltosilados: Maltosa unida a un fluoróforo en el infrarrojo cercano (diagnóstico), maltosa unida a cuatro ciclodextrinas para transportar moléculas de doxorubicina (tratamiento dirigido), y maltosa unida a polímeros catiónicos para generar vectores de transfección no virales (terapia génica). Los ensayos *in vitro* e *in vivo* han demostrado la validez de la proteína de fusión MBP_{1534W}-ScFv_{HER2}-His para diagnóstico (obtención de imágenes), y transporte de DNA o fármacos de manera dirigida al tumor. La modularidad de la plataforma MBP_{1534W}-ScFv_{HER2}-His permite el intercambio flexible de la secuencia codificada por el ScFv, lo que permite que la plataforma se dirija a otra diana terapéutica, sin ninguna optimización adicional, ya que MBP_{1534W} actúa como eje fundamental de esta nanopartícula.

2. Antecedentes

2.1 Prevalencia del cáncer de mama

El cáncer constituye un problema importante en la salud pública a nivel mundial. Según los datos recogidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de mama es la neoplasia maligna más común en las mujeres y uno de los tres cánceres con mayor incidencia a nivel mundial (**Figura 2.1**). Afecta a 2,1 millones de mujeres cada año. Este dato no distingue entre país desarrollado o en desarrollo por lo que podemos hablar de enfermedad endémica a nivel mundial. En la última década, la incidencia ha incrementado conjuntamente a la esperanza de vida. Según estimaciones de la OMS en 2004 murieron 519.000 mujeres por cáncer de mama, y en 2020 esta cifra aumentó hasta 627.000, es decir, aproximadamente el 15% de todas las muertes por cáncer (**Figura 2.2**).

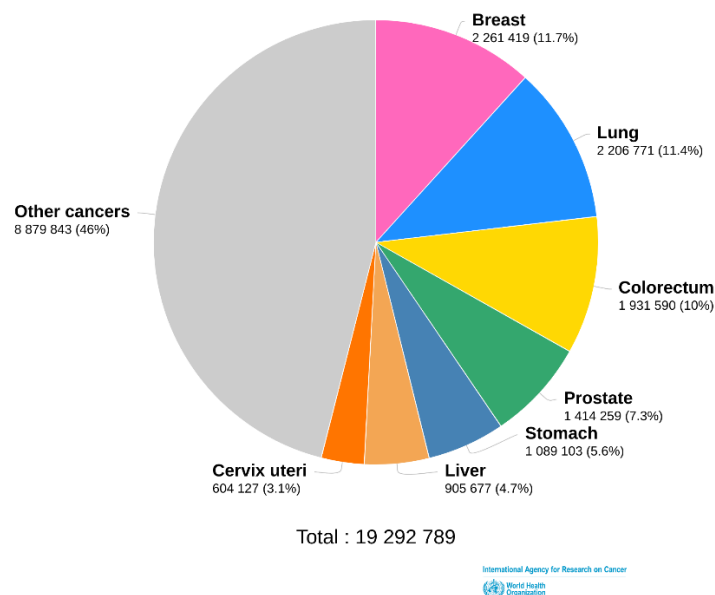


Figura 2.1 Estimación de la incidencia mundial de cáncer. Diagrama generado por los datos recopilados por la agencia internacional de investigación sobre el cáncer en 2020 [1].

Constituye la primera causa de muerte antes de cumplir los 70 años en 91 de 172 países [2, 3]. Aproximadamente, el 12,9% de las mujeres serán diagnosticadas con cáncer de mama en algún momento de su vida. Se estima que desde 2017, 3.577.264 mujeres presentan cáncer de mama en los Estados Unidos (prevalencia a 5 años) [4].

Aproximadamente un 70% de las muertes relacionadas con esta enfermedad tienen lugar en países en vías de desarrollo. Este dato nos indica que el cáncer genera un impacto económico insostenible en estos países. Solo en EEUU el costo total atribuible a la enfermedad en 2015 ascendió a 80,2 billones US\$ [5]. Aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría (69%) de las defunciones por esta causa se registran en los países en vías de desarrollo.

El diagnóstico correcto del cáncer es esencial para poder prescribir un tratamiento adecuado y eficaz. Cada tipo de cáncer requiere un protocolo específico que puede abarcar una o más modalidades, tales como cirugía, radioterapia o quimioterapia. En 2017, más del 90% de los países desarrollados ofrecen tratamiento a los enfermos oncológicos, mientras que en los países en vías de desarrollo este porcentaje es inferior al 30% [1, 6].

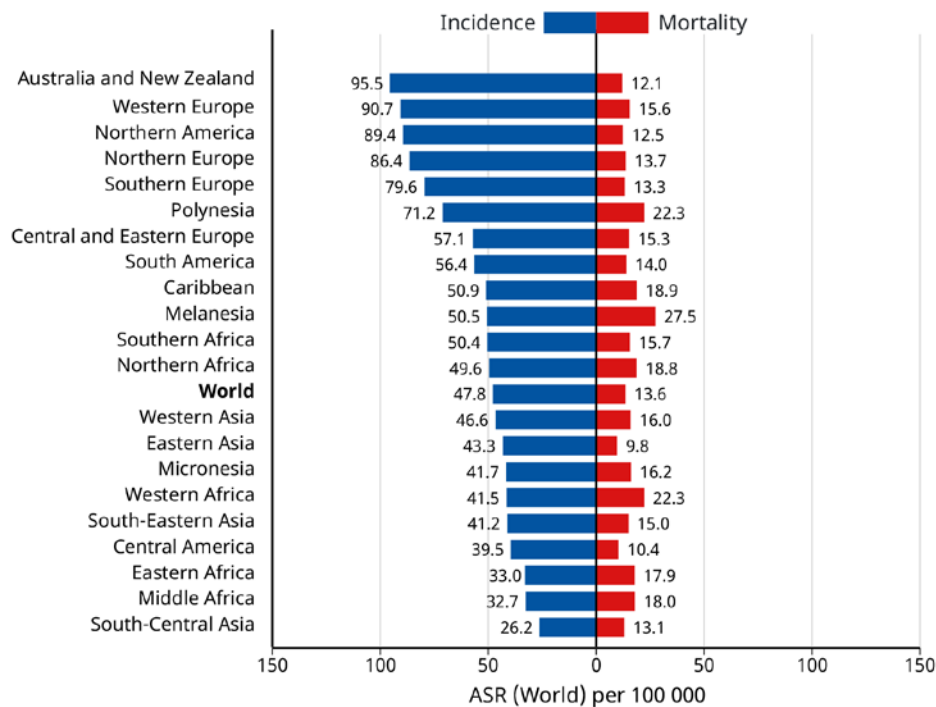


Figura 2.2 Estimación de la incidencia y la mortalidad mundial por cáncer de mama. Diagrama generado por los datos recopilados por la agencia internacional de investigación sobre el cáncer en 2020 [1].

La tasa de supervivencia varía dependiendo de la población: desde un 80% en países como América del Norte o Japón, un 60% en países en fase de desarrollo, hasta bajar a un 40% en países sub-desarrollados [7]. Estos porcentajes son un reflejo de que un diagnóstico temprano, una monitorización de la evolución de la enfermedad y un tratamiento adecuado, influyen positivamente en la supervivencia.

2.2 El cáncer de mama

La mama es un órgano túbulo-alveolar complejo rodeado de tejido adiposo. Los senos femeninos contienen de 12 a 20 lóbulos, que a su vez se dividen en lóbulos más pequeños conectados a través de conductos lácteos [8]. El cáncer de mama es una enfermedad maligna que inicia cuando las células cancerosas inhiben la expresión de los genes supresores del crecimiento, adquiriendo una proliferación acelerada e incontrolable [9].

Al igual que otros tumores malignos, existen numerosas causas que pueden aumentar la posibilidad de desarrollar cáncer de mama. El cáncer de mama ocurre debido a una asociación entre factores genéticos y ambientales. Algunos pacientes heredan defectos en genes como P53, BRCA1 y BRCA2. Generalmente, pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama o de ovario tienen mayor posibilidad de desarrollar cáncer de mama [10].

Es una enfermedad compleja que muestra un alto grado de heterogeneidad. Es necesario un enfoque y tratamiento personalizado para obtener y mejorar la respuesta de los pacientes [11]. Los tumores mamarios se puede clasificar en tres tipos dependiendo de si expresan o no receptores específicos:

- Tumores con receptores de hormonas (ER+ o PR+). Se tratan con una serie de terapias dirigidas a receptores hormonales como tamoxifeno, inhibidores de la aromatasas o fulvestrant, con o sin quimioterapia.
- Tumores con el receptor ERBB2 (HER2+), que se tratan con terapias dirigidas como trastuzumab con o sin quimioterapia.
- Tumores de mama triple negativos, que son resistentes a las terapias dirigidas debido a la inexistencia de receptores diana. La quimioterapia parece ser la única modalidad de tratamiento disponible.

Las vías RAS/MEK/ERK y PI3K/AKT regulan la supervivencia en células sanas. Cuando se produce una mutación en los genes que participan en la codificación de proteínas protectoras y reguladoras de estas vías, las células se vuelven incapaces de activar el proceso apoptótico, lo que conduce al desarrollo de cáncer. Además, en las células cancerosas el enzima telomerasa se encuentra sobre-expresado, eliminando el acortamiento cromosómico y permitiendo la supervivencia y replicación prácticamente ilimitada de estas células. Las células tumorales obtienen sus nutrientes y oxígeno por angiogénesis, generando vasos sanguíneos a partir de células endoteliales. Finalmente, las células tumorales rompen sus límites ingresando en la sangre, los tejidos linfáticos y otros tejidos del cuerpo para producir metástasis [12, 13].

2.2.1 Receptor ERBB2 o HER2

La subclase I de la familia de los receptores tirosina quinasa (RTK) son un conjunto de receptores denominados ERBB o factores de crecimiento epidérmico [14]. Como característica común a toda la familia tienen una región de unión extracelular con un dominio tirosina quinasa. Esta familia se divide a su vez en cuatro subclases denominadas ERBB1, ERBB2, ERBB3 y ERBB4. Los receptores ERBB se expresan en una amplia variedad de tejidos de origen mesenquimático, epitelial y neuronal. Su activación induce la heterodimerización u homodimerización del receptor. La dimerización provoca la fosforilación de tirosinas quinasa, que desencadenan una cascada de fosforilación hasta llegar a una vía de señalización intracelular relacionada con proliferación, supervivencia, migración y diferenciación. Estos receptores se activan de manera fisiológica por factores de crecimiento, y se encuentran relacionados con procesos de desarrollo en el adulto [15-17] (**Figura 2.3**).

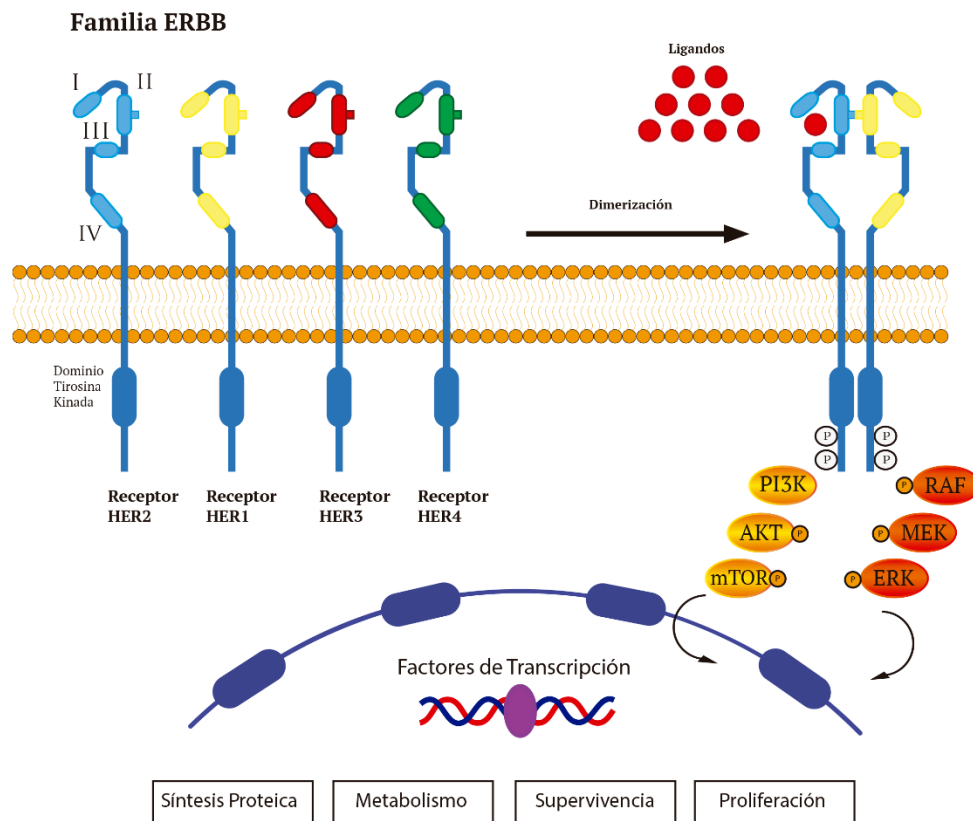


Figura 2.3 La familia ERBB: la activación por parte de los ligandos conduce a la homodimerización y a la heterodimerización. Esta activación provoca una cascada de fosforilación de las MAPKs y AKT, dando como resultado un aumento de la proliferación, invasión y resistencia a la apoptosis. Su activación constante le confiere un poder de supervivencia y malignidad relacionado con un mal pronóstico [18].

La participación de esta familia de receptores en el cáncer deriva de una serie de estudios que han demostrado un aumento de expresión en neoplasias [19]. El receptor ERBB2 o HER2 (*Human Epidermal Growth Factor*) se encuentra ubicado en el cromosoma 17q12-21.32, y codifica para una glicoproteína de 185 kDa; con dominio extracelular, transmembrana, y dominios intracelulares. El receptor HER2 está involucrado en numerosos tipos de cáncer, y es susceptible de convertirse en diana terapéutica [20-22].

Este receptor se encuentra sobre-expresado en el cáncer de mama y está relacionado con un mal pronóstico. Su activación desencadena la fosforilación de la vía de las MAPK que a su vez activan AKT, siendo esta última reguladora de la supervivencia y responsable de respuestas antiapoptóticas [17, 23]. La vía PI3K/AKT está implicada en la sensibilidad y resistencia de las células tumorales con receptores HER2 mutantes a inhibidores específicos [22, 24].

La sobre-expresión de HER2 presenta una particularidad que la diferencia de otros cánceres: la homodimerización. Gracias a la homodimerización, el receptor es capaz de mantener una activación constante sin necesidad de la presencia de un ligando. La estructura del receptor permite que la dimerización esté siempre disponible para otros receptores de la familia ERBB [15, 17, 25]. Este tipo de sobre-expresión es característica del cáncer de mama, pero también en cáncer de ovario, de pulmón y de próstata [20, 26].

2.3 Técnicas de diagnóstico empleadas en el cáncer

Siguiendo los datos proporcionados por la OMS, se puede llegar a la conclusión de que un diagnóstico temprano es la base sobre la cual se debe trabajar a la hora de aumentar la eficacia de los tratamientos. Las técnicas de diagnóstico constituyen un conjunto de técnicas tanto invasivas como no invasivas, que se utilizan con el propósito de extraer una imagen total o parcial del organismo para obtener información relacionada con la diagnosis del cáncer.

2.3.1 Antecedentes en el diagnóstico por imagen

Aunque el primer documento escrito sobre el cáncer se remonta al antiguo Egipto (alrededor del 300 a. C.), el cáncer debe haber existido desde el origen de los seres humanos [27].

Cuándo Hipócrates acuñó el término cáncer, lo hizo en referencia a los vasos sanguíneos presentes en tumores que se asemejan a las garras de un cangrejo; postulaba que era mejor no actuar frente a la enfermedad. Más adelante, los estudios de Galeno alertaron sobre la necesidad de detectar y tratar el cáncer. Esta premisa establece la necesidad de investigación con el fin de encontrar un método de diagnóstico adecuado y un tratamiento. Sin embargo, no ha sido hasta los últimos 100 años cuando fueron apareciendo técnicas de diagnóstico.

En 1895, Ilhelm Conrad Roentgen descubre los **rayos X**, constituyéndose la primera técnica de diagnóstico por imagen. En el año siguiente, 1896, Franz König utiliza los rayos X para obtener la imagen de una pierna amputada, en la que se observa un sarcoma en la tibia.

Gracias a esta imagen, los rayos X comienzan a emplearse en el diagnóstico del cáncer, hasta que en 1972 esta técnica fue sustituida por el invento de Godfrey Hounsfield: la **Tomografía Computarizada** [28]. Ambas técnicas se basan en la distinta absorción de la radiación emitida por los rayos X en función de su densidad. La ventaja que ofrece la tomografía es el procesamiento de las señales producidas por un haz estrecho de rayos X, componiendo imágenes transversales del organismo. Estas imágenes que denominamos cortes dan una información más detallada que una imagen de rayos X por sí sola. El apilamiento de estos cortes ofrece una estructura en 3D, sobre la cual podremos estudiar e identificar estructuras básicas del tumor [29].

En 1942, Karl y Friederich Dussik descubrieron los **ultrasonidos** como aplicación para el diagnóstico médico [30]. La técnica se basa en la aplicación de ondas de sonido de gran frecuencia generadas por un transductor que se encuentra en contacto con el organismo. Las ondas se reflejan al interactuar con los distintos órganos y tejidos, para luego recogerse y procesarse, y así obtener una imagen [31].

En 1973, Paul Lauterbur and Peter Mansfield desarrollan la técnica de **resonancia magnética**. Se basa en la obtención de una imagen a partir de las distintas señales de excitación que producen los protones al ser irradiados por radiofrecuencias en presencia de un campo magnético intenso [32].

Las técnicas de diagnóstico por imagen hasta la fecha proporcionaban únicamente información anatómica. Se hicieron intentos para perfeccionar alguna de las técnicas, como fue el caso de incluir agentes de contraste en las resonancias magnéticas, obteniéndose imágenes de mayor resolución. La aplicación de la Biología molecular en el campo del diagnóstico abrió un nuevo camino: obtener una imagen molecular.

2.3.2 Técnicas de diagnóstico de imagen molecular por fluorescencia

El diagnóstico de imagen molecular es una disciplina que está comenzando a utilizarse cada vez más en biomedicina. Consiste en un grupo de técnicas que representan de manera visual datos de caracterización y cuantificación de procesos biológicos, los cuales ocurren en un organismo vivo a nivel celular y sub-celular [33]. La obtención de estas imágenes es esencial durante el diagnóstico del cáncer, tanto como en la predicción del tumor como durante la etapa de tratamiento [34].

La **tomografía computarizada de emisión monofotónica** se basa en la obtención de una imagen por radioisótopos que emiten radiación gamma. Estos radioisótopos, una vez en el organismo, participan en procesos biológicos como cualquier elemento. Cuando se analicen los datos de radiación, adquiriremos una imagen tridimensional con información de procesos biológicos en los que han participado los radioisótopos [35].

La **tomografía por emisión de positrones** proporciona una imagen cuantitativa *in vivo* de las formas radiactivas de átomos que se encuentran de forma natural en los organismos vivos (Carbono-11, Nitrógeno-13, Oxígeno-15, Flúor-18, Galio-68 o Rubidio-81). Dado que estos positrones se comportan de la misma manera que los átomos del organismo, nos permite obtener una imagen cuantitativa de la bio-distribución de las moléculas y los cambios en el tiempo mediante la obtención de imágenes secuenciales [34, 36].

Gracias a estas técnicas se pudieron estudiar procesos biológicos. Un ejemplo es el uso de la 2-18F-fluorodesoxiglucosa (18F FDG) como sustituto en el metabolismo de la glucosa para el diagnóstico del cáncer de pulmón (**Figura 2.4**).

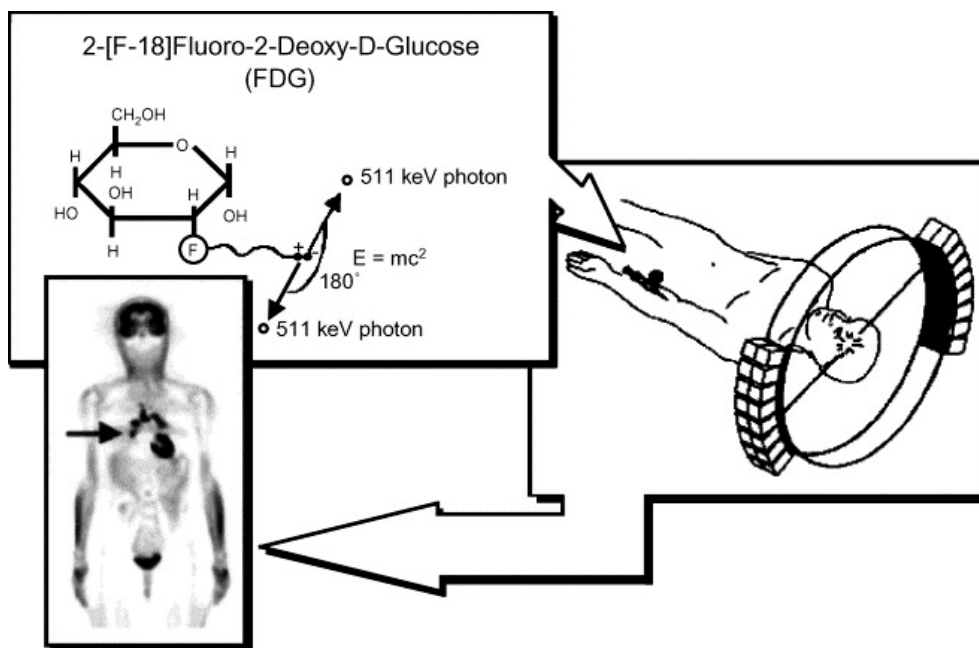


Figura 2.4 Sustitución de la glucosa por 18F FDG. Una hora más tarde el paciente presenta una acumulación en el mediastino y en las regiones hiliares, indicando la presencia del cáncer [37].

La fluorescencia como método de diagnóstico

La idea de utilizar moléculas fluorescentes para evaluar procesos biológicos supone una disminución de los costes y una mayor facilidad de diagnóstico. La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones [38].

El ejemplo más común y utilizado de uso de moléculas fluorescentes es la proteína verde fluorescente (GFP). Es una proteína de 27 kDa procedente de la medusa *Aequorea victoria*, que al excitarse con luz ultravioleta emite fluorescencia verde a 510 nm, en la región del visible. Su importancia radica en que la GFP puede ser expresada fácilmente por cualquier tipo celular, llegando incluso a líneas celulares que la expresan continuamente [39]. La posibilidad de fusionar la GFP a otras proteínas le da la utilidad para monitorizar procesos dinámicos en las células, abriendo así un nuevo método de seguimiento de procesos biológicos por fluorescencia [40].

Para la determinación de la fluorescencia en un organismo vivo (**Figura 2.5**) necesitamos una fuente de energía capaz de excitar el fluoróforo a la longitud de onda de adecuada, filtros de emisión y excitación, y una cámara con receptores fotosensibles que nos dé una imagen tanto del espectro visible como fluorescente del organismo a estudiar [41].

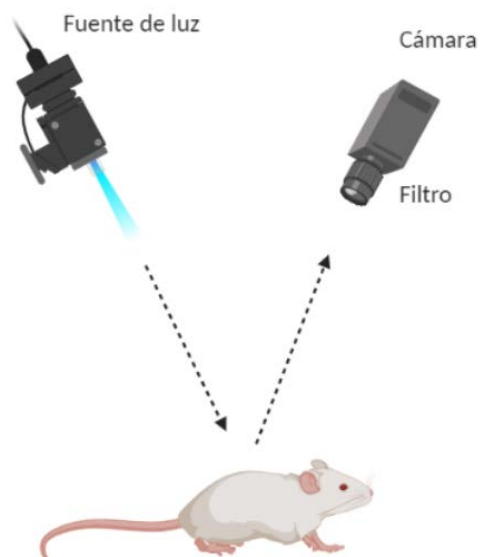


Figura 2.5 Representación esquemática de la instrumentación requerida para la detección de fluorescencia en un organismo vivo. Observamos cómo la fuente de luz incide sobre el animal, excitando el fluoróforo. La fluorescencia y una imagen del espectro visible se recogen a través de la cámara [41], adaptación realizada en Biorender.

Técnicas de fluorescencia

Las técnicas más utilizadas en la actualidad son la tomografía molecular de fluorescencia y la imagen multimodal.

La **tomografía molecular de fluorescencia** es un método de diagnóstico que emplea proteínas marcadas con fluoróforos. Si introducimos proteínas marcadas en un organismo se distribuirán desempeñando su función biológica. Al exponerlas a una luz pulsada, esta luz es capturada por las proteínas marcadas produciendo una emisión a una longitud de onda conocida que se recoge mediante un detector. El resultado de la combinación de modelos matemáticos con los datos de emisión obtenidos a partir de múltiples proyecciones detectadas por los distintos receptores, proporciona una imagen. Esta técnica se puede utilizar para identificar fases tempranas de una gran variedad de cánceres [41-43].

La **imagen multimodal** consiste en la producción simultánea de imágenes al utilizar distintas técnicas de diagnóstico de imagen. Se pueden combinar técnicas de detección de fluorescencia con tomografía por emisión de positrones o tomografía computarizada. El fin de esta técnica es obtener más información en menos tiempo. Su aplicación en el cáncer radica en la capacidad de examinar simultáneamente más de una molécula en tiempo real [44, 45].

El empleo de la **GFP** en cáncer supondría una alternativa atractiva en el diagnóstico por imagen. Sin embargo, debido a que emite en el visible y su espectro se solapa *in vivo* [33] con el espectro de la hemoglobina, presente en la sangre, que absorbe desde el visible hasta la región del infrarrojo cercano.

2.3.3 Moléculas Near infrared (NIR)

Son un tipo de moléculas que se caracterizan por emitir fluorescencia en el infrarrojo cercano. Este espectro abarca longitudes de onda de excitación y emisión que se encuentran comprendidas entre 600 nm y 1000 nm [46-49]. Este tipo de radiación de baja frecuencia no presenta el daño ionizante que suele ser característico de otras técnicas de diagnóstico de imagen, como es el caso de las técnicas que emplean rayos X o radiación gamma[50].

Al encontrarse circulando en el torrente sanguíneo es capaz de detectar hasta un pequeño cambio en la vascularización. Los cromóforos tisulares principales (hemoglobina, mioglobina y melanina) tienen su absorción en el rango visible y UV pero no en el infrarrojo cercano, lo que nos permite detectar esas pequeñas variaciones [51]. Varios estudios han demostrado que los compuestos NIR tienen una alta sensibilidad en tejido mamario [52, 53].

Cabe destacar que aunque la autofluorescencia es baja en la región del espectro de NIR, es posible visualizar determinadas estructuras sin el uso de un agente de contraste. Es el caso en el cáncer de colon, donde la autofluorescencia de NIR es menor que en el tejido normal [54].

Sondas NIR

El desarrollo de sondas NIR es una modalidad de diagnóstico reciente. Las imágenes de diagnóstico deben ofrecer una resolución óptima, por lo que sería necesario modificar las sondas NIR para obtener propiedades químicas y fotofísicas que nos permitan realizar el diagnóstico. Para conseguir una buena imagen, las sondas deben tener grandes desplazamientos entre el espectro de absorción y el de emisión para evitar solapamientos, alto coeficiente de absorción molar, un rendimiento cuántico suficiente y buena solubilidad para evitar agregados en soluciones acuosas. Se dividen atendiendo a su composición básica en sondas basadas en moléculas orgánicas, o en sondas basadas en moléculas inorgánicas o nanopartículas [47, 55].

- **Sondas orgánicas:** Se basan en fluoróforos de moléculas pequeñas, que incluyen polimetina cianinas, ftalocianinas y squaraines. Se conocen métodos para la síntesis de estos colorantes y sus propiedades espectrales son ajustables. También se puede modificar las estructuras y propiedades de estas sondas para adecuarse a diversas necesidades biológicas, incluida la selección específica de biomoléculas de interés y el desarrollo de procesos moleculares a través de la activación de fluorescencia. Los más utilizados para realizar sondas son la familia de moléculas derivadas de cianina. Las modificaciones de estas sondas ha consistido en mejorar sus propiedades fotofísicas para aumentar el rendimiento cuántico y la vida media, además de aumentar la especificidad para dirigirlos hacia determinadas dianas. Un ejemplo es la *indocianina verde* (ICG), que está formada por dos grupos de anillos aromáticos que contienen nitrógeno unidos por una cadena. Se utilizan para obtener imágenes tanto de tejidos superficiales como de órganos más profundos [47, 56]. Actualmente, este tipo de sondas es de las pocas aprobadas por la FDA para uso clínico, la mayoría tienen aplicación únicamente en el campo de investigación. Se utiliza la indocianina para estudiar la función cardíaca, hepática y para angiografías retinianas.
- **Sondas inorgánicas o nanopartículas:** Las más usadas son los *quantum dots* [57, 58]. Comenzaron a utilizarse para obtener imágenes *in vitro* e *in vivo*; no obstante su aplicación para procesos biológicos se ha ralentizado, debido a problemas de citotoxicidad [59], difícil escalado y preparación costosa [60], o por no ser fácilmente reproducibles [61].

2.4 Tratamientos contra el cáncer

La investigación en el cáncer ha permitido proponer tratamientos para cánceres con determinadas características. Anualmente se destina una gran cantidad de fondos para la búsqueda de nuevos tratamientos, y para la mejora de las estrategias actuales, que se traduzcan en una mejora de la calidad del paciente y un abaratamiento de los costes.

2.4.1 Tratamientos actuales contra el cáncer de mama

El cáncer de mama se desarrolla a partir de tejido mamario. El seno está formado por lóbulos y conductos, cada lóbulo se compone de secciones más pequeñas capaces de generar leche, que se encuentran conectadas por los conductos a través de los cuales circula la leche. El tipo más común de cáncer de mama es el carcinoma ductal, que comienza en las células de los conductos. El cáncer que se inicia en los lóbulos se llama carcinoma lobular, y afecta con más frecuencia ambos senos que otros tipos de cáncer de seno. Por último, el cáncer de mama inflamatorio es un tipo de cáncer de mama poco común [62].

Entre las mujeres, solo el cáncer de mama representa el 11% de todos los casos y el 15% de todas las muertes por cáncer, con una estimación de 2,2 millones de casos y 685.000 muertes, respectivamente, en 2020 [1, 62, 63]. Entre un 5-10% de los cánceres de mama tienen un carácter hereditario. Así, la mutación en los genes BRCA1 o BRCA2, es un factor de riesgo importante de padecerlo [64, 65].

Podemos distinguir entre tres tipos de cáncer de mama, y dependiendo de sus características tratarlo de una manera personalizada [66]. Los clasificamos a través de su perfil molecular en receptor hormonal positivo (ER+, PR+), receptor HER2/neu positivo (HER2+), y triple negativo (ER-, PR- y HER2-).

Atendiendo a la malignidad y el riesgo que supone un cáncer de mama, los tratamientos [67] para combatir esta enfermedad que más se usan serían:

Cirugía

El tratamiento más utilizado consiste en extirpar el tumor. Cuando se elimina el tumor del seno se procede a la extirpación del ganglio linfático centinela. Denominamos ganglio centinela al ganglio linfático más cercano al sitio del tumor. La biopsia de ganglio centinela es una técnica que ayuda a determinar si el cáncer se ha diseminado (metástasis) o está limitado localmente.

Una vez extraído, es necesario realizar una citología del ganglio centinela, y en caso de no ser positiva finalizaría la cirugía. Si por el contrario aparecen células cancerosas se deberá proceder a extirpar el siguiente ganglio y realizar una nueva citología. A este proceso se le conoce como disección de ganglios linfáticos [62, 68]. Dependiendo del tipo de cirugía distinguimos:

- **Cirugía de conservación** o lumpectomía: Consiste en extirpar el cáncer junto a los tejidos colindantes, pero no la mama al completo.
- **Mastectomía total**: Extirpación total del seno más los ganglios colindantes.
- **Mastectomía radical modificada**: Extirpación total del seno, de los ganglios linfáticos colindantes, el revestimiento de los músculos torácicos, incluso parte del tejido muscular.

Radioterapia

La radioterapia consiste en utilizar rayos X de alta energía u otro tipo de radiación con el fin de matar las células cancerosas. Dependiendo de la fuente se distingue entre radiación externa e interna; siendo la radiación externa producida por una máquina externa al paciente, mientras que la interna proviene de moléculas radiactivas selladas en agujas o catéteres que se colocan cerca del tumor. Su aplicación depende del síntoma a tratar: se utiliza radiación externa para matar células cancerosas, pero usaremos la radiación interna para tratar dolores óseos provocados por la diseminación de un cáncer [62, 69].

La radioterapia puede utilizarse conjuntamente con la cirugía. Se usa a veces previamente para disminuir el tamaño del tumor e intervenir al paciente con un riesgo menor. También puede ser utilizada después para disminuir las probabilidades de recidivas.

Quimioterapia

La quimioterapia consiste en el tratamiento del cáncer mediante el uso de moléculas que sean capaces de disminuir o evitar el crecimiento de las células cancerosas; este tipo de fármacos se denominan antineoplásicos o quimioterápicos. Actúan sobre las células en crecimiento rápido por lo que sus efectos secundarios son un reflejo de su inespecificidad. La estrategia de su uso abarca tanto una respuesta curativa en la que se busca la eliminación del tumor; como paliativa, cuyo interés consiste en mejorar la calidad de vida del enfermo y prolongar su supervivencia [62, 70].

Los medicamentos más utilizados en quimioterapia son:

Taxanos: Docetaxel y Paclitaxel

Los taxanos son un grupo de fármacos muy utilizados en la quimioterapia contra el cáncer de mama [71, 72]. A principios de la década de los 90, el paclitaxel se identificó como un agente con actividad significativa contra el cáncer de mama metastático, con tasas de respuesta objetivas superiores al 50%. Los taxanos son alcaloides vegetales que provienen de la corteza de tejo del Pacífico (*Taxus*) y se conocen como agentes antimicrotubulares. Su función es la desestabilización de estructuras microtubulares dentro de la célula, impidiendo así la replicación celular y provocando la muerte de la misma. Docetaxel y paclitaxel producen una alteración de la red tubular al inhibir la polimerización de la tubulina [73, 74].

Antraciclinas: Doxorubicina

Las antraciclinas son antibióticos que tienen actividad antitumoral. Son agentes citostáticos obtenidos a partir de cultivos de cepas de *Streptomyces*. La estructura plana de la molécula le permite actuar como agente intercalante en el DNA, lo que altera su síntesis. Además actúan como inhibidores de la topoisomerasa II, produciendo roturas en la cadena de DNA durante la replicación. Se cree que parte de la toxicidad de las antraciclinas se debe a que son responsables de la formación de radicales libres. Incluimos en este grupo a la daunorubicina, doxorubicina, idarubicina y epirubicina. El principal inconveniente en el uso de antraciclinas es el desarrollo de miocardiopatías. Las antraciclinas producen una toxicidad mitocondrial en las células cardiacas, limitando la dosis de uso [75, 76].

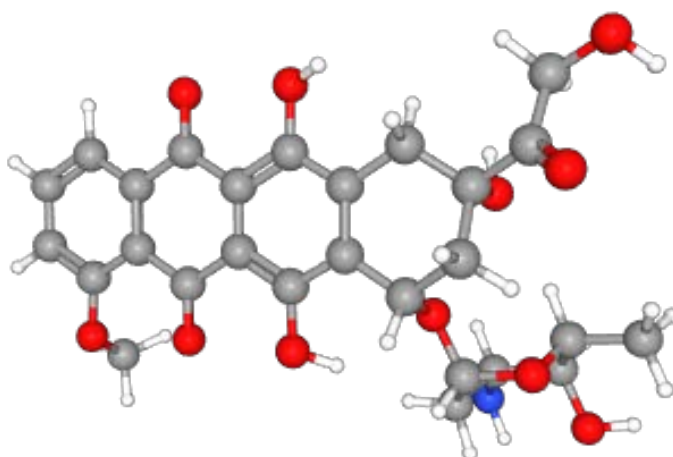


Figura 2.6 Estructura 3D de la doxorubicina [77]

La doxorubicina (**Figura 2.6**) se diferencia de la daunorubicina en un grupo hidroxilo. Se elimina rápidamente de la circulación y se concentra en los tejidos. Las formas encapsuladas liposomales de doxorubicina y daunorubicina permiten un mayor tiempo de circulación sanguínea y la posibilidad de una mayor actividad antitumoral y una disminución de la miocardiopatía [73, 78].

Pirimidinas fluoradas: 5-fluorouracilo

La pirimidina fluorada, 5-fluorouracilo, se metaboliza en el interior de la célula a 5-fluoro-2'-desoxiuridina monofosfato o **FDMUMP**. Este metabolito tiene la capacidad de inhibir la timidilato sintetasa, implicada en la metilación del ácido desoxiuridílico lo que se traduce en una inhibición de la síntesis de DNA, desencadenando la muerte celular. Otro metabolito es la 5-fluoroxiuridina monofosfato o **5-FUMP** que se incorpora al RNA evitando que realice sus funciones de manera fisiológica.

El 5-fluorouracilo se administra por vía intravenosa durante semanas, debido a que posee una vida media corta. Actúa en la fase S del ciclo celular mediante los mecanismos descritos en el párrafo anterior. [73, 78].

Terapia Hormonal: tamoxifeno

La utilización de hormonas para detener el crecimiento de las células cancerosas se considera una técnica coadyuvante en el tratamiento. Fisiológicamente, las hormonas son producidas en diversas glándulas del organismo con el fin de interactuar con algún tipo de receptor específico y obtener una respuesta. La administración de hormonas combinada con fármacos o alguna de las dos técnicas citadas previamente aumenta la probabilidad de éxito [62].

El **tamoxifeno** se considera un medicamento revolucionario que ha salvado vidas en oncología [79]. Su función consiste en bloquear los receptores de estrógenos, actuando como coadyuvante disminuyendo la supervivencia de las células positivas para el receptor de estrógenos (**ER+**). Actualmente, se utiliza en el tratamiento del cáncer de mama ER+, desde su diagnóstico hasta una prevención prolongada en el tiempo. Se ha demostrado su utilidad como coadyuvante en tratamientos como la radioterapia [80] o quimioterapia [81].

Aun así este fármaco se ha asociado con un aumento del riesgo de padecer cáncer, además de efectos secundarios notables debido a que no tiene especificidad por células cancerosas. Es necesario por tanto mejorar la especificidad del tratamiento.

La terapia con hormona luteinizante (**LHRH**) está indicada en pacientes de cáncer de mama con receptores ER+. El LHRH disminuye la cantidad de estrógenos y progesterona del organismo limitando el crecimiento de las células.

Los **inhibidores de la aromatasa** se emplean en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama ER+. Estos actúan a nivel de la enzima aromatasa evitando que cumpla su función de transformar los andrógenos en estrógenos.

Estos dos últimos tratamientos, a pesar de tener menos efectos secundarios, no tienen la tasa de éxito del tamoxifeno, pero se pueden utilizar como coadyuvantes tras terapias prolongadas con tamoxifeno como sustitutivos [62].

Inmunoterapia: Los anticuerpos monoclonales y el trastuzumab

Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas modificadas, diseñadas específicamente para unirse a dianas concretas, con el objetivo de interrumpir un proceso patológico definido, estimular una acción celular o desviar un mecanismo celular hacia una vía de interés. Los anticuerpos monoclonales reconocen específicamente determinados antígenos de superficie celular bloqueando la unión entre un ligando y su receptor correspondiente e inhibiendo de manera vías de transducción de señales. Los anticuerpos monoclonales al ser específicos, presentan una toxicidad limitada. Una baja toxicidad conlleva una mayor aceptación por parte del paciente, y una mejora de la calidad de vida.

Los tratamientos de inmunoterapia con anticuerpos monoclonales normalmente se combinan con otros agentes terapéuticos. En el cáncer se produce una desregulación de varias vías de señalización y los anticuerpos al ser tan específicos no suelen tener efecto sobre varias vías. La inhibición en la señalización es por un tiempo limitado, ya que la mayoría de las células son capaces de compensar este bloqueo cambiando a una ruta de señalización distinta y conseguir el mismo efecto. La combinación de varios agentes terapéuticos produce un efecto sinérgico frente a la supervivencia de las células tumorales.

Para un uso efectivo de los anticuerpos monoclonales es fundamental la administración conjunta con otro anticuerpo u otro tipo de terapia sin que se produzca un aumento en los efectos secundarios [73, 78, 82].

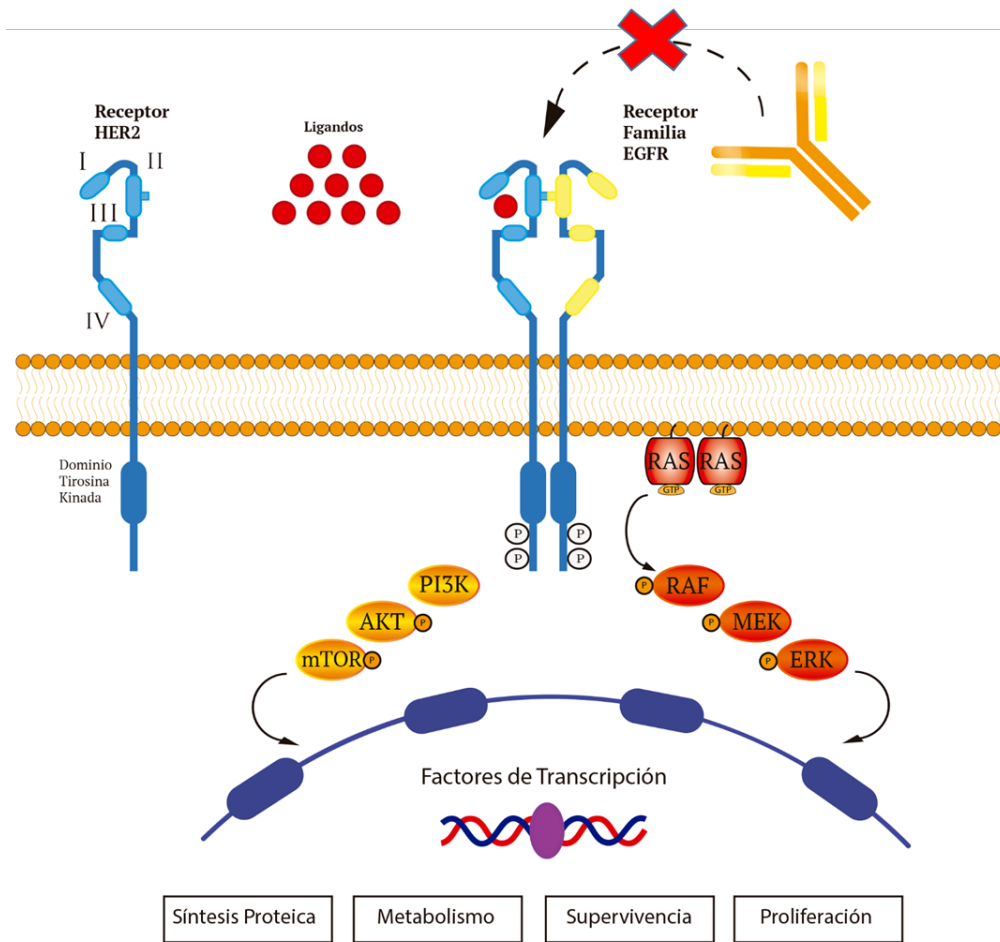


Figura 2.7 Rutas de transducción de señales en las células tumorales que favorecen su supervivencia y crecimiento inhibiendo mecanismos como la apoptosis. El anticuerpo monoclonal trastuzumab inhibe la activación y la señalización aguas abajo de estos receptores uniéndose a sus dominios extracelulares y neutralizando la unión entre el ligando y el receptor y por tanto su activación [83].

El **trastuzumab** es un anticuerpo monoclonal que actúa sobre el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (**Figura 2.7**). La sobre-expresión de este receptor en el cáncer de mama aparece en un tercio de los casos, y se relaciona con el aumento de la agresividad del tumor.

El trastuzumab previene la homodimerización y la heterodimerización del receptor, aumentando su degradación intracelular e inhibiendo la proliferación de células que sobre-expresan el receptor. Es uno de los pocos anticuerpos aprobados por la FDA tras demostrar actividad en combinación con paclitaxel en pacientes con cáncer de mama metastásico. Además, gracias a su versatilidad puede utilizarse como terapia coadyuvante de diversos tratamientos que vayan adaptándose a la evolución de la enfermedad [84-86].

Anticuerpos de cadena sencilla (ScFv)

Los anticuerpos son un sistema de defensa modular que identifica y neutraliza posibles amenazas para el organismo como bacterias y virus. Para interactuar con la mayor cantidad de antígenos necesitan un gran número de moléculas diferentes, esta diversidad se crea por recombinación somática. Al ser una parte fundamental del sistema inmune, la biomedicina investiga su posible perfeccionamiento mediante la manipulación genética. Desde entonces, los anticuerpos monoclonales se han visto beneficiados, gracias a que pueden producirse en cantidades ilimitadas para unirse prácticamente a cualquier antígeno y se estandarizan fácilmente [87].

Los anticuerpos monoclonales presentan una serie de desventajas en la práctica. Principalmente su origen es murino, por lo que generan una respuesta inmune al ser inyectados en humanos. Su síntesis es conjuntamente laboriosa y costosa, y su gran tamaño dificulta el acceso a determinadas células para su uso terapéutico. Para superar estos problemas, Skerra y Plücker propusieron el uso de una fracción del anticuerpo llamada Fv [88, 89].

Los anticuerpos monoclonales se componen de dos cadenas pesadas y dos ligeras. Ambas cadenas contribuyen a dos sitios de unión a antígeno idénticos. Un anticuerpo convencional está compuesto por dos dominios variables asociados no covalentemente, designado V_H y V_L [90]. Un anticuerpo de cadena sencilla o **ScFv** es la fusión de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas, unidas mediante un péptido conector. Pueden ser fácilmente expresados en bacterias (**Figura 2.8**) [91-93].

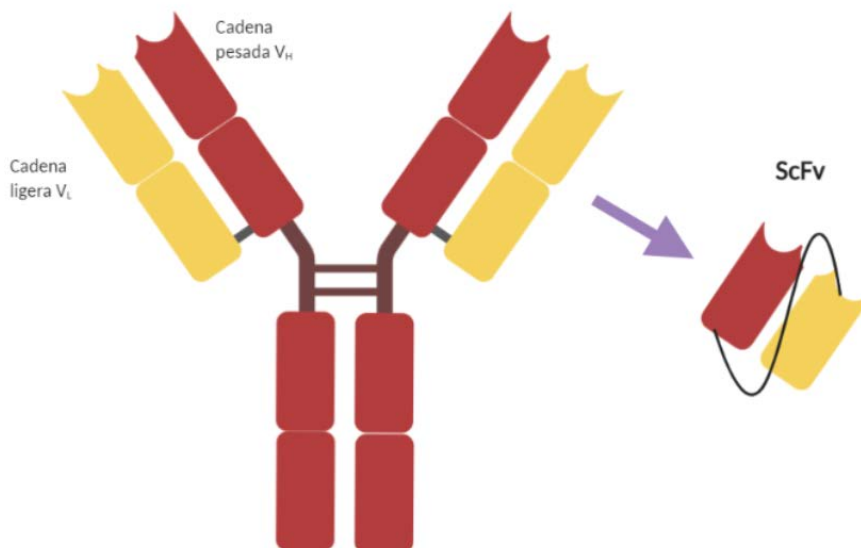


Figura 2.8 Modelo de anticuerpo y anticuerpo ScFv. Se muestra el anticuerpo formado por dos cadenas pesadas V_H y dos ligeras V_L . El anticuerpo de cadena sencilla (ScFv) está formado únicamente por una V_H y de una V_L unidas por un péptido conector [91].

Los anticuerpos ScFv se han obtenido principalmente a partir de hibridomas formados por células de bazo de ratones inmunizados y linfocitos B de humanos. Para ello, se aísla RNAm del hibridoma, seguido de transcripción inversa en cDNA, para que sirva como molde para la amplificación de genes de anticuerpos (PCR). Con este método, se podrían crear grandes bibliotecas con una amplia gama de genes de anticuerpos V_H y V_L [94].

Los anticuerpos ScFv se han usado en cáncer, y su especificidad y afinidad también los hace atractivos para radioinmunoimagen y radioinmunoterapia [95-97].

El tamaño reducido de los ScFv ofrece ventajas frente a un anticuerpo convencional. Los fragmentos más pequeños presentan menos impedimentos estéricos para interactuar con los receptores que reconocen específicamente en las células en comparación con otros anticuerpos de mayor tamaño. Todas estas propiedades son importantes en la terapia contra el cáncer, no obstante estos fragmentos tienen un aclaramiento bastante rápido de la sangre; lo que se traduce como una baja exposición en tejido sano (ventaja) y una eliminación rápida a nivel renal (inconveniente).

Otra aplicación de ScFv es como reactivos de diagnóstico. En general un anticuerpo monoclonal puede unirse a una variedad de antígenos. La detección de ScFv se puede hacer usando un anticuerpo secundario que reconoce una porción específica de este [90, 98].

La detección de células cancerosas residuales en el tejido mamario puede tener importantes implicaciones terapéuticas y de pronóstico. En el campo de la inmunoterapia los anticuerpos ScFv son capaces de interactuar con las células cancerosas, dando resultados prometedores *in vitro* [91, 97, 99].

Terapia génica en el cáncer

El estudio de las bases moleculares ha revelado los mecanismos de muchas enfermedades hereditarias o adquiridas, lo que ha permitido conocer las alteraciones que se producen en determinados genes. La investigación en esta área ha conducido a intentar tratar estas enfermedades mediante terapia génica.

Inicialmente, los científicos desarrollaron la terapia génica para la administración de material genético con el fin de tratar enfermedades monogénicas. Con el tiempo este campo fue avanzando y pronto se adaptó para su empleo en la lucha contra el cáncer. Aproximadamente dos tercios de los ensayos clínicos en terapia génica se han dirigido al tratamiento de varios tipos de cánceres [100]. Recientemente se ha demostrado que las terapias genéticas celulares pueden considerarse como una plataforma nueva y prometedora para la terapia contra el cáncer [101, 102].

Una forma de terapia génica consiste en el silenciamiento de genes, que se puede conseguir mediante el uso de RNA de interferencia (**RNAi**) [103, 104]. Esta terapia consiste en el empleo de una molécula pequeña de RNA de doble cadena para silenciar la expresión de un gen específico, impidiendo su traducción. El silenciamiento de genes mediante RNAi ha proporcionado a los investigadores una alternativa rápida y económica y, en algunas líneas celulares, su eficiencia de transfección es superior a la obtenida utilizando plásmidos [105]. Esta técnica, sin embargo, no es muy específica, variando los resultados entre experimentos y laboratorios.

Una nueva estrategia en terapia génica es la edición del genoma. Se basa en el empleo de nucleasas con dominios de unión a DNA específicos fusionados a dominios de corte no específicos, como las proteínas denominadas dedos de zinc y las enzimas TALENs (*Transcription activator-like effector nuclease*).

La versatilidad de los **dedos de zinc (ZNF)** y **TALENs** surge de la capacidad de personalizar el dominio de unión al DNA para reconocer prácticamente cualquier secuencia. Estos módulos de unión a DNA pueden combinarse con numerosos dominios efectores para alterar la estructura y función de los genes. Por lo tanto, la capacidad de ejecutar con éxito las alteraciones genéticas depende en gran medida de la especificidad de unión al DNA y la afinidad de las proteínas diseñadas [106, 107].

El sistema **CRISPR** (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) asociado a una nucleasa denominada Cas9 ha surgido como una nueva alternativa en la terapia génica. Posee una mayor eficiencia y facilidad de manipulación en comparación a ZNF y las enzimas TALENs. CRISPR/Cas9 es una herramienta molecular capaz de corregir y editar una secuencia determinada del genoma de una célula de manera precisa [108, 109].

Cas9 es una nucleasa guiada por RNA mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick. Representa un sistema fácil de diseñar, altamente específico, eficiente y adecuado para edición de genes. El sistema CRISPR presenta un alto rendimiento y una elevada diversidad en células y organismos [110, 111], ya que puede ser redirigido para escindir virtualmente cualquier secuencia de DNA. Las endonucleasas Cas9 también se han convertido en *nickasas*, lo que permite un nivel adicional de control sobre el mecanismo de reparación del DNA.

2.5 Técnicas de transfección

Los tratamientos mediante terapia génica necesitan el empleo de un vector que sea capaz de protegerlos y transportarlos hasta el interior de la célula. La terapia génica tiene potencial para combatir diversas enfermedades con éxito, sin embargo su uso se ha visto limitado debido a la falta de sistemas de transporte seguros y eficientes [112].

La transfección es un procedimiento que introduce ácidos nucleicos (DNA o RNA) en el interior celular para producir células modificadas genéticamente [113]. Los vectores de transferencia génica generalmente se clasifican en dos tipos: virales y no virales.

Los **vectores virales** emplean un virus como agente de transfección. La transfección mediada por virus es muy eficiente. Es sencillo lograr una expresión mantenida *in vivo*, debido a la naturaleza de algunos virus para integrarse en el genoma del huésped aunque otros vectores víricos como los adenovirales sólo producen una expresión génica transitoria [114]. Los vectores más comunes utilizados en ensayos clínicos incluyen retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus herpes simplex o poxvirus.

Los principales inconvenientes de los vectores virales son la inmunogenicidad y la citotoxicidad, la introducción de un vector viral puede causar una reacción inflamatoria. Los vectores virales se integran aleatoriamente en la célula huésped, pudiendo alterar genes supresores de tumores, activar oncogenes o interrumpir genes esenciales. Otra desventaja de los vectores virales es el tamaño del DNA que pueden transportar [113].

Los vectores **no virales** o plasmídicos son episomales, lo que significa que no se integran en el genoma del huésped, y se pueden perder en la división celular. Todas las transfecciones no virales comparten un mismo procedimiento: los productos químicos cargados positivamente forman complejos con ácidos nucleicos cargados negativamente. Estos complejos cargados positivamente son atraídos por la membrana celular. Se desconoce el mecanismo exacto de cómo atraviesan la membrana celular, pero se acepta que la endocitosis y la fagocitosis están involucradas en el proceso. El DNA debe entrar en el núcleo para ser expresado [115].

La eficiencia de transfección de los vectores no virales depende en gran medida de factores como la relación ácido nucleico/reactivo, el pH de la solución y las condiciones de la membrana celular. El proceso da como resultado una baja eficiencia de transfección, especialmente *in vivo*. Sin embargo, estos métodos tienen una citotoxicidad relativamente baja, sin mutagénesis y sin limitación de tamaño para el ácido nucleico. Además, los vectores plasmídicos son simples de usar, fáciles de producir a gran escala y generan una respuesta inmune menos severa que la mediada por virus [100].

2.5.1 Polietilenimina o PEI

La polietilenimina (PEI) es uno de los polímeros más estudiados y empleados como reactivo de transfección en células eucariotas. PEI es polímero catiónico que puede tener una estructura lineal o ramificada. La fuerte carga positiva que posee PEI permite la unión a moléculas con carga negativa, como el DNA, y a membranas plasmáticas *in vivo*. Además, el esqueleto de PEI contiene numerosas aminas primarias y secundarias, que ofrecen numerosas posibilidades de modificaciones estructurales y de funcionalización [116, 117].

A pH fisiológico, las moléculas de PEI se encuentran cargadas positivamente. La protonación de los grupos amino favorece la unión y condensación de ácidos nucleicos en su interior. El núcleo del polímero se encuentra compacto y con las cargas neutralizadas. Los ácidos nucleicos se encuentran protegidos del ataque de nucleasas, manteniendo la estabilidad e integridad del DNA durante su transporte hasta la llegada al núcleo de la célula [118, 119].

El complejo PEI-DNA retiene una carga positiva neta que promueve interacciones con las cargas negativas que se encuentran en la superficie celular. Estas interacciones provocan que las células endociten el complejo, ocurriendo así la transfección. Una vez en el interior, la capacidad del PEI para actuar como esponja de protones, atrayendo protones en el medio ácido del endosoma, permite que el complejo PEI-DNA escape de la degradación por las enzimas lisosomales. Además, la entrada de agua en el interior del endosoma, provoca la ruptura de su membrana [118].

El potencial de PEI como vector de transfección se describió por primera vez en 1995. Se utilizan polietileniminas de pesos moleculares entre 800 Da y 25 kDa [120]. Las polietileniminas ramificadas de alto peso molecular (más de 25 kDa) son agentes de transfección bastante eficientes. Las polietileniminas de bajo peso molecular son unos reactivos de transfección menos eficientes que el de 25 kDa, pero son mucho menos citotóxicos y permiten igualmente su funcionalización para mejorar la eficiencia de transfección o su especificidad [121-123].

2.6 Nanotecnología

El principal inconveniente de las estrategias actuales en la terapia contra el cáncer es la dificultad de administrar un fármaco específicamente. Actualmente, salvo en la inmunoterapia, el medicamento afecta a células sanas y cancerosas por igual. La mayoría de los fármacos que se usan en tratamientos anticancerosos presentan una baja solubilidad y un alto metabolismo e hidrofobicidad. Estas dos características conjuntas provocan una baja biodisponibilidad y toxicidad sistémica en el paciente, lo que dificulta la calidad del tratamiento. Como alternativa a este problema, la nanomedicina programa el transporte específico del fármaco, dirigiéndolo hacia una diana específica y minimizando los efectos secundarios del tratamiento [57, 124].

La nanomedicina propone como solución el empleo de nanomateriales. Su pequeño tamaño les brinda múltiples posibilidades en investigación médica. Las nanopartículas son estructuras supramoleculares sólidas ultradispersas, que generalmente (aunque no necesariamente) usan polímeros como soporte estructural y que presentan un tamaño submicrométrico, preferiblemente menor de 500 nm [125]. Las nanopartículas se diseñan utilizando diferentes materiales para ser similares a las proteínas, virus y otras estructuras macromoleculares en la composición biológica, y así simular sus propiedades y funciones [126-128].

2.6.1 Características de las nanopartículas

Tamaño de la partícula y superficie

La forma y el tamaño de las nanopartículas afectan a la distribución, toxicidad y a su especificidad. Si su tamaño lo permite, son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica proporcionando una biodisponibilidad a fármacos que antes no eran capaces de cruzarla [129]. A medida que reducimos el tamaño de una partícula aumentamos la relación superficie/volumen. Esto se traduce en que una mayor cantidad de medicamento estaría próximo a la superficie de la partícula, conduciendo a una liberación más rápida y, por tanto, más eficiente. El tamaño de estas partículas no debe superar los 200 nm, ya que se ha demostrado que su biodisponibilidad es menor [130].

La manipulación de las características superficiales empleando nanopartículas repercute en las propiedades del fármaco. Cuanto más hidrófoba es una partícula, mayor es la probabilidad de que se elimine en un corto período, lo que puede evitarse recubriéndolas con polímeros que disminuyan su hidrofobicidad [131].

La nanotecnología no es solo la miniaturización, es la preparación de nanomateriales con propiedades físicas y químicas, que difieran drásticamente de los materiales a granel por encontrarse a una escala nanométrica. Un ejemplo de esta propiedad es la administración intravenosa de suspensiones farmacéuticas; en la década de los 70 era impensable administrar suspensiones por vía intravenosa debido al riesgo de producir una embolia. En la actualidad, disponemos de suspensiones farmacéuticas de nanopartículas, que aumentan la biodisponibilidad del fármaco al mejorar la selectividad y el índice terapéutico (menor toxicidad y mayor actividad) [132].

Carga y liberación del fármaco

El tamaño y la superficie de las nanopartículas se modifican para optimizar su biodisponibilidad. Controlando estos parámetros debemos ser capaces de transportar el fármaco a zonas del organismo donde no era posible alcanzar, de mejorar el aclaramiento y de aumentar la estabilidad. No obstante, si no es posible controlar su liberación, todos estos avances no tendrán ningún impacto sobre el resultado final. Para liberar el fármaco en la zona idónea se tienen en cuenta muchos factores, como son el pH, la temperatura, la solubilidad del fármaco y otras propiedades fisicoquímicas [131].

La modificación de las características o la selección adecuada de las mismas, nos brinda una nueva estrategia en el campo de la farmacocinética. Sin embargo, lo que más interesa es que con las nanopartículas podemos administrar el fármaco de manera más eficiente. Las nanopartículas pueden actuar también como transportadores, protegiendo los compuestos anticancerosos de la biodegradación o eliminación y, por lo tanto, influir en el perfil farmacocinético de un compuesto [133].

Otra de sus aplicaciones en el ámbito del cáncer es la disminución de resistencias contra el fármaco. Si prolongamos el tiempo de circulación de un fármaco en el organismo su eficiencia será mayor, disminuyendo la probabilidad de supervivencia y de aparición de resistencias al tratamiento [124, 134].

Aprovechando el pequeño tamaño de la partícula, el siguiente desafío fue aumentar su selectividad. En la década de los 80, se realizaron los primeros intentos al unir anticuerpos específicos a nanopartículas [135]. Desafortunadamente no tuvieron éxito ya que el proceso de opsonización no se había optimizado.

En la actualidad se han realizado numerosas investigaciones para optimizar estos sistemas y dotarlos de especificidad. Sólo unas pocas nanopartículas han conseguido ser aprobadas como tratamiento; es el caso de Abraxane® y Endorem® [73]. El Abraxane® es un ejemplo de cómo los nanomateriales pueden ayudar a superar los problemas de solubilidad y estabilidad química de un medicamento contra el cáncer, en su caso el paclitaxel [136]. Los nanomateriales pueden albergar en su interior fármacos y transportarlos selectivamente a células tumorales [137].

2.6.2 Técnicas Teragnósticas

El término teragnosis apareció por primera vez en 2002 [138], y se asocia a partículas que combinan el tratamiento y diagnóstico por imagen al mismo tiempo [139, 140].

Las imágenes biomédicas tienen muchos beneficios sobre el diagnóstico. Permiten realizar un seguimiento en tiempo real y no suelen ser invasivas. Además, permitirían un diagnóstico temprano y, por tanto, un tratamiento pre-sintomático que se traduciría en una reducción de la mortalidad y de los costes asociados al cáncer (**Figura 2.9**).

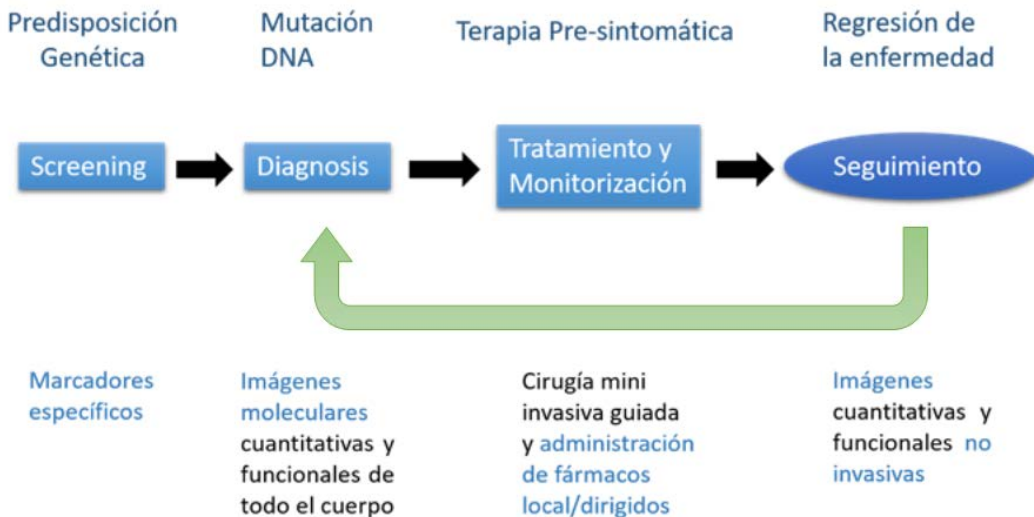


Figura 2.9 Esquema de las etapas del diagnóstico por imagen en el cáncer [141]. Adaptación de imagen.

Actualmente, se están utilizando biomarcadores, agentes de diagnóstico complementarios, que permiten el seguimiento de los tratamientos oncológicos. Disponer de un sistema de evaluación personalizado capaz de analizar la efectividad de un fármaco, y buscar si es necesario una alternativa más eficaz antes de que aparezcan resistencias constituye el futuro de la terapia [142, 143].

Los biomarcadores pueden ser de diagnóstico o de riesgo (**Figura 2.9**). Los biomarcadores permiten conocer una vez diagnosticado el cáncer, su agresividad y en qué estadio se encuentra. Así, se podría establecer el tratamiento apropiado y personalizado, como es, por ejemplo, el empleo de trastuzumab en el cáncer de mama HER2 positivo. Estos marcadores nos facilitarán información de la evolución, el pronóstico del paciente y la respuesta al tratamiento; y así modificar o mantener la estrategia para tratar al paciente [144-146].

Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CD) son dextrinas cristalinas obtenidas por digestión enzimática del almidón de la patata mediante el uso de *B. amylobacter*, [147] y que su estructura está formada por oligosacáridos cíclicos [148, 149].

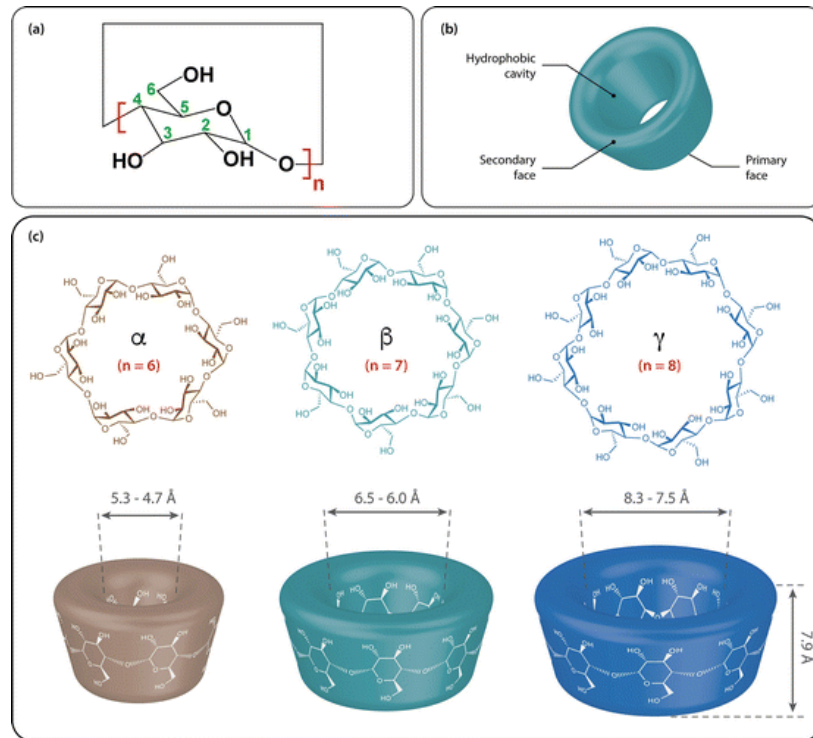


Figura 2.10 Representación esquemática de la estructura en dos y tres dimensiones (a, b), y de los tipos de ciclodextrinas naturales empleadas en el transporte de fármacos (c). Presentan una estructura de cono truncado con un hueco en su interior susceptible de alojar un fármaco para su transporte. Entre las ciclodextrinas naturales se distinguen las α , β y γ ciclodextrinas [150].

Las CD (**Figura 2.10**) son, por tanto, oligosacáridos cíclicos formados por unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces α -1,4. Se sintetizan por acción de la enzima ciclodextrina- α -glucosil transferasa [151, 152]. Las CD naturales más comunes, y utilizadas en farmacia, son α CD, β CD y γ CD; formadas por 6, 7 y 8 unidades de D-glucopiranosas respectivamente. Todas ellas tienen una estructura en forma de cono truncado huecas en el interior, con la superficie externa hidrofílica y la cavidad central lipofílica [152], y no tóxicas para los seres humanos [153, 154]. La cavidad interior se ha utilizado para la inclusión de moléculas hidrofóbicas con el fin de mejorar la solubilidad, mejorar la estabilidad y aumentar la biodisponibilidad de las mismas [155-157].

Las moléculas de fármaco unidas al complejo están en equilibrio dinámico con las moléculas de fármaco libres, presentando tasas de formación y disociación cercanas a los límites controlados por difusión [158, 159]. La estructura cíclica de las CD hace que sean menos susceptibles a la degradación enzimática que las dextrinas lineales y, por ello, son mejores agentes complejantes y solubilizantes [153, 160].

2.7 Proteínas de fusión

Dentro de la estrategia de expresión de proteínas recombinantes la generación de proteínas de fusión ofrece múltiples ventajas por lo que constituye la técnica de elección para la expresión recombinante. Esto es aún más cierto cuando hablamos de expresión recombinante heteróloga en bacterias [161]. En una proteína de fusión se genera una macromolécula que presenta dos o más dominios proteicos diferentes integrados. De estos dos dominios proteicos, el primero de ellos corresponde a una proteína que presenta elevados niveles de expresión en bacterias; a partir de su secuencia codificante se inserta sin rotura de la pauta de lectura la proteína heteróloga de interés a expresar. De esta forma y desde un único promotor bacteriano contenido en el plásmido de expresión es posible la síntesis de una molécula de mRNA que codifica en la misma cadena peptídica para ambas proteínas.

La proteína quimérica así generada estará formada por nuestra proteína de interés a la que se “fusiona” en su extremo amino o carboxilo una segunda proteína. Para que la proteína de fusión se genere de manera adecuada, entre las secuencias codificantes de ambas proteínas no debe existir ninguna señal de parada de la traducción, y la pauta de lectura de la traducción para la segunda proteína debe mantenerse en fase con respecto a la primera. Usualmente los vectores de expresión para la generación de proteínas de fusión presentan un sitio múltiple de clonación en 5' (en el caso que se desee una fusión en el extremo carboxilo de la proteína recombinante) o en 3' (en el caso de que la fusión se produzca en el extremo amino) con respecto a la secuencia de la proteína acompañante.

La proteína a la que se fusiona la proteína de interés, reúne una serie de propiedades que hacen que la proteína de fusión sea más soluble, se facilite su plegamiento, se exprese a mayores niveles, sea fácil de detectar y pueda ser purificada con facilidad mediante cromatografía de afinidad. Todas estas propiedades hacen que el uso de proteínas de fusión constituya una de las principales estrategias para la expresión de proteínas recombinantes.

2.7.1 Proteína de unión a maltosa (MBP) como proteína de fusión

Un buen ejemplo del uso de proteínas de fusión lo constituye la proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli*. Esta proteína es muy soluble y se expresa en elevados niveles en bacterias, por lo que su empleo como proteína fusión incrementará la solubilidad y nivel de expresión de la proteína recombinante. Adicionalmente, la MBP presenta una alta afinidad por maltosa y maltotriosa, por lo que se puede llevar a cabo su purificación mediante una cromatografía de afinidad utilizando columnas de cromatografía con amilosa inmovilizada y realizando la elución en condiciones suaves mediante el uso de tampones que contienen maltosa libre. Además, se dispone de anticuerpos comerciales frente a la MBP, por lo que la detección de la misma mediante técnicas inmunológicas (ELISA o Western blot) permitirá la localización y cuantificación de la proteína de fusión.

La MBP pertenece a la familia de proteínas de unión periplásmicas bacterianas. Es una superfamilia de proteínas diversificadas que han evolucionado para tener homólogos eucariotas. Toda la familia, aunque no mantengan una homología a nivel de secuencia comparten un motivo común: una estructura formada por dos dominios globulares, unidos por una región bisagra que rodea al sitio de unión del ligando, situado en la parte central [162] (**Figura 2.11**).

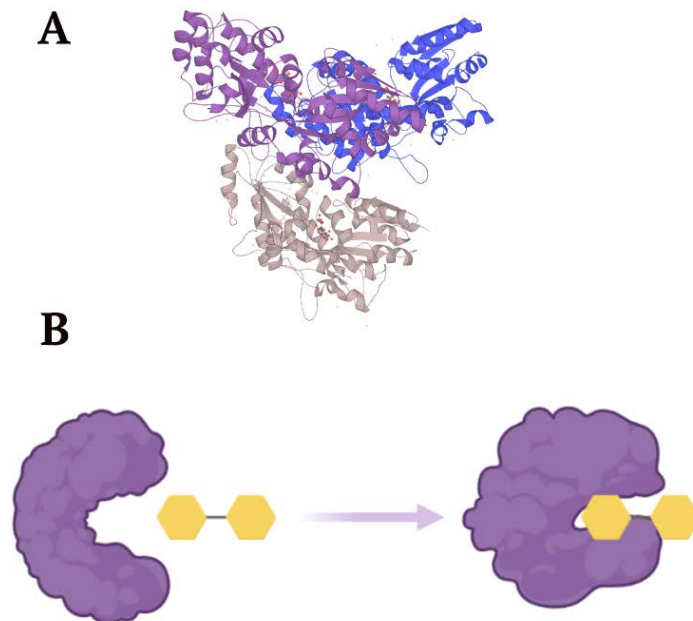


Figura 2.11 A. Estructura de la MBP obtenida de uniprot y B explicación visual del mecanismo de bisagra (representado mediante la aplicación biorender). La Maltosa es reconocida por la MBP y al unirse produce un cambio conformacional que atrapa a la Maltosa.

La MBP participa en la absorción y catabolismo de las maltodextrinas ya que es capaz de unirse a Maltosa y a maltodextrinas como la maltotriosa. La MBP (**Figura 2.11 A**) tiene un peso de aproximadamente 43 kDa, y forma parte de un complejo multiproteico compuesto por dos proteínas de unión a ATP (MalK), dos proteínas transmembrana (MalG y MalF) y una proteína de unión a solutos (MalE). Participa en procesos biológicos como el transporte de carbohidratos, la quimiotaxis celular, detección de estímulos dependientes de la Maltosa y en la respuesta celular al estímulo de daño del DNA [163, 164].

La MBP se ha propuesto como proteína de fusión a la hora de expresar proteínas recombinantes en bacterias por su actividad como chaperona [165]. La MBP mejora tanto la producción como la solubilidad de la proteína de fusión co-expresada [166]. Además, MBP se ha utilizado ampliamente para la purificación de proteínas recombinantes sobre la resina de amilosa, siendo este un método barato en el que obtenemos un grado de pureza bastante alto [167, 168].

Debido a la amplia comprensión de su estructura y función la MBP es el miembro prototípico de esta superfamilia. La especificidad de MBP es bien conocida, la estructura cristalina tanto en forma abierta como ligada a ligando se ha resuelto, y una variedad de mutantes que tienen diferentes afinidades por la Maltosa han sido diseñados [169, 170]. Así, se ha estudiado la conformación abierto-cerrado que mantiene la MBP con su ligando (**Figura 2.11 B**) [171]. La modificación de este equilibrio es una forma de alterar la afinidad de la proteína por su ligando, ya que las mutaciones introducidas tienden a facilitar la conformación en la forma cerrada que es la que presenta mayor afinidad por la maltosa [172, 173]. Algunas de las aplicaciones de estas MBP mutadas ha sido el diseño de biosensores [174-176].

3. Objetivos

El objetivo global de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de vectores teragnósticos que permitan el desarrollo de sistemas de tratamiento y diagnóstico específicos dirigidos frente a células tumorales. Una característica esencial que se persigue en estos sistemas de transporte dirigido es generar una estructura modular que proporcione una elevada versatilidad, tanto frente a diferentes dianas moleculares como para el transporte de diferentes moléculas terapéuticas o diagnósticas.

Para alcanzar este objetivo global se pretende:

- Desarrollar vectores teragnóstico basados en la generación de proteínas de fusión compuestas por:
 - Un dominio de unión a maltosa con una afinidad incrementada por la maltosa con capacidad de unir diferentes ligandos maltosilados.
 - Un anticuerpo de cadena sencilla que vaya dirigido frente a un receptor de membrana sobre-expresado en células tumorales.
- Evaluar en modelos celulares y animales la utilidad de estos sistemas mediante:
 - Su uso para el transporte dirigido de agentes terapéuticos.
 - Su uso como agentes de análisis por imagen.
 - Su empleo como vectores de transfección génica.

4. Material y Métodos

4.1 Material

4.1.1 Instrumentación

Cultivo de bacterias:

- Mechero Bunsen.
- Incubadora Gallenkamp con termostato y agitación circular.
- Estufa Memmert 500.

Cultivo de células eucariotas:

- Campana de flujo laminar Microflow de MDH.
- Incubadora de CO₂ Memmert INC 153.
- Microscopio óptico invertido Olympus CK2
- Microscopio óptico invertido para fluorescencia Olympus CKX41.
- Unidad de alimentación Olympus U-RFLT 50 para lámpara de mercurio de 100 W.
- Microscopio confocal Leica DMI 6000.
- Cámara digital refrigerada CCD Olympus XC30.
- Fluorímetro Shimadzu RF-5301 PC.

Análisis de ácidos nucleicos:

- Cubetas Mini-Sub para electroforesis horizontal de Bio-Rad.
- Transiluminador de luz ultravioleta de New Brunswick Scientific.
- Termociclador GeneAmp system 9700 de Applied Biosystems.
- Cámara digital Canon PC1234. PCR

Análisis y purificación de proteínas:

- Cubeta para electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell de Bio-Rad.
- Dispositivo para transferencia Trans-Blot Turbo Transfer System de Bio-Rad.
- Sistema de detección de quimioluminiscencia ChemiDoc-It 810 Imager de UVP.
- Sistema de detección de quimioluminiscencia y fluorescencia ChemiDoc MP de Bio-Rad.
- Bomba peristáltica P-1 GE de Healthcare.
- Columna de purificación HisTrap High Performance de GE Healthcare.
- MiniOpticon Real-Time PCR System de Bio-Rad

Equipos de uso común:

- Autoclave Selecta.
- Baño de agua con termostato Precistern de Selecta.
- Termobloque Multiplaces de Selecta.
- Espectrofotómetro UVmini-1240 de Shimadzu.
- Lector de placas Sunrise de Tecan.
- pH metro XS Instruments modelo pH 510.
- Centrífuga de sobremesa Eppendorf modelo 5415D.
- Centrífuga de sobremesa refrigerada Axyspin R de Axygen.
- Centrífuga J2-21 de Beckman.
- Rota tubos de VWR.
- Homogeneizador ultrasónico UP 100H de Hielscher Ultrasound Technology.
- Balanzas AUW220D de Shimadzu.
- Fuente de alimentación PowerPac 300 de Bio-Rad.
- Agitador magnético con calefactor Benchmark Scientific H4000-HSE.
- Agitador tipo vortex Reax Top de Heidolph.
- Mesa agitadora Stuart SSM1.
- Micropipetas Spinreact y Eppendorf.
- Cámara fría a 4°C y congeladores a -20°C y a -80°C.

4.1.2 Líneas celulares

4.1.2.1 Líneas celulares procariotas

Se empleó la cepa **XL1-Blue** de *Escherichia coli* (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]); la cepa **BL21(DE3)** (fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS/ pLemo(CamR) λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5 pLemo = pACYC184-PrhaBAD-lysY); la cepa **Novagen's Rosetta™ 2(DE3)** y **Rosetta-gami B (DE3)**.

XL1-Blue es una cepa de uso habitual en la clonación de plásmidos. Presenta mutaciones en los genes endA1, hsdR y recA. Los dos primeros codifican para endonucleasas y el tercero participa en el fenómeno de recombinación de DNA. En su conjunto, garantizan la integridad del plásmido. Por otra parte, incluye los genes lacIq y ZΔM15 en el episoma F'. El gen ZΔM15 es una mutación del gen LacZ que hace que se exprese la enzima β-galactosidasa sin la subunidad α. Este enzima es imprescindible si se desea usar el sistema de selección por α-complementación y rastreo por color azul-blanco de los clones.

BL21 (DE3) es una cepa químicamente competente adecuada para la transformación y expresión de proteínas. El ajuste fino de la expresión de la RNA polimerasa T7 puede disminuir la formación de cuerpos de inclusión o los efectos inhibidores sobre el crecimiento de las proteínas tóxicas. En muchos casos, una menor expresión equivale a mayor número de proteínas de interés producidas correctamente. La expresión de proteínas de membrana y la exportación de proteínas en *E. coli* están limitadas por la actividad dependiente de la translocasa Sec y en algunos casos de la translocasa Tat. Una actividad disminuida de la translocasa Sec a menudo puede conducir a la acumulación de cuerpos de inclusión o a la inhibición de la división celular si la expresión no está regulada. La expresión se logra variando el nivel de lisozima (lysY), el inhibidor natural de la RNA polimerasa T7. DE3 indica que el huésped es un lisógeno de λ DE3 y, por lo tanto, lleva una copia cromosómica del gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor lacUV5. Tales cepas son adecuadas para la producción de proteínas a partir de genes diana clonados en vectores pET por inducción con IPTG.

Novagen's Rosetta™ 2(DE3) es una cepa derivada de BL21 diseñada para mejorar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raramente utilizados en *E. coli*.

Rosetta-gami B (DE3) es una cepa derivada de BL21, Origami y Rosetta. Esta cepa es capaz de expresar proteínas eucariotas formando los puentes disulfuro necesarios en la estructura del anticuerpo ScFv.

4.1.2.2 Líneas celulares eucariotas

- **MDA-MB-231 (ATCC HTB-26):** Son células epiteliales procedentes de tejido mamario canceroso humano (adenocarcinoma). Son células cancerosas altamente agresivas invasivas y poco diferenciadas. Se las denominan triple negativo por carecer de receptores para hormonas (ER- y PR-) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Estas células se aislaron por Cailleau 1973 a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente con cáncer de mama [177]. Poseen la capacidad de formar tumores en ratones BALB/c y nude. [178].
- **SK-BR-3 [SKBR3] (ATCC HTB-30):** Son células epiteliales procedentes de tejido mamario canceroso humano (adenocarcinoma) que sobre-expresan el receptor HER2. Estas células se aislaron en 1970 a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente con cáncer de mama. Las células SKBR3 se emplean como controles positivos en ensayos para HER2. Además, es un modelo preclínico útil para testar agentes terapéuticos frente a HER2. Son células capaces de formar tumores poco diferenciados en ratones inmunodeprimidos [179].
- **Phoenix-AMPHO (ATCC CRL-3213):** Son células epiteliales procedentes de tejido renal, con la característica de que son capaces de producir retrovirus de segunda generación, ectópicos y anfotrópicos [180]. Se obtuvieron por transformación de células HEK293T/17 con el adenovirus E1a. Se incluyó un inserto de aproximadamente 4,5 kilobases de genoma viral en el cromosoma 19 humano. Las células eucariotas Phoenix Ampho fueron un regalo del Dr. JL García-Pérez, Genyo.

4.1.3 Animales de experimentación

- **Ratones NSG:** Son ratones que llevan la cepa NOD.Cg-Prkdcscidll2rgtm1Wjl/SzJl. Se caracterizan por encontrarse entre los ratones más inmunodeficientes del mercado al carecer de linfocitos T maduros, linfocitos B o células Natural Killer. Además carecen de múltiples citoquinas, por lo cual son ideales como modelos para xenografts [181].

4.1.4 Material de cultivo de células

4.1.4.1 Medios de cultivo para células procariotas

Utilizamos el medio Luria Bertani (LB) para el crecimiento de las cepas de *E. coli* [182] cuya composición por litro es la siguiente:

10 g de triptona
5 g de extracto de levadura
5 g de cloruro sódico

En caso de utilizar medio LB sólido, se añade a la mezcla de LB agar bacteriológico hasta alcanzar una concentración final de 1,5% (p/v). Los componentes utilizados en la preparación del medio fueron proporcionados por Scharlau Microbiology y Panreac.

Para la selección de bacterias transformadas, se prepararon soluciones madre de antibióticos 1000 x. La ampicilina (50 mg/mL, Sigma) se preparó en agua destilada y esterilizada por filtración, el cloranfenicol (30 mg/mL, Sigma) se disolvió en etanol; las soluciones se almacenaron a -20°C.

Para la preparación de células competentes, fueron necesarias las siguientes soluciones:

Medio A: Medio LB 49 mL
 20% (p/v) glucosa 500 µL
 1 M MgSO₄ 500 µL

Solución B: Disolver en medio LB 36% (v/v) glicerol, 12% (p/v) PEG 7500, 12 mM MgSO₄.

Los medios de cultivo antes de ser usados se esterilizaron por calor húmedo a 120°C y 1 bar de presión durante treinta minutos.

4.1.4.2 Medios de cultivo para células eucariotas

Se empleó como medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 100 U/mL penicilina, 2 mM L-glutamina y 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS). En el caso de la transfección de células eucariotas se utilizó el mismo medio de cultivo pero únicamente suplementado con 2 mM L-glutamina.

El material fungible empleado (placas, pipetas) fue suministrado por Cultek y VWR. Los medios y suplementos fueron suministrados por Merck.

4.1.5 Material para la manipulación de ácidos nucleicos

4.1.5.1 Plásmidos y Oligonucleótidos

-pMAL-c2X: Vector de expresión de proteínas de fusión asociadas con la proteína de unión a Maltosa (**Figura 4.1**). Este vector nos permite clonar la secuencia codificante de una proteína para expresarla con la MBP como proteína de fusión, ocurriendo dicha producción en el citoplasma. La expresión proteica estaría regulada por un promotor Lac que permite su expresión por inducción en el momento que se crea oportuno. El vector incluye resistencia a Ampicilina para asegurar la preservación del mismo una vez transformada la bacteria [173].

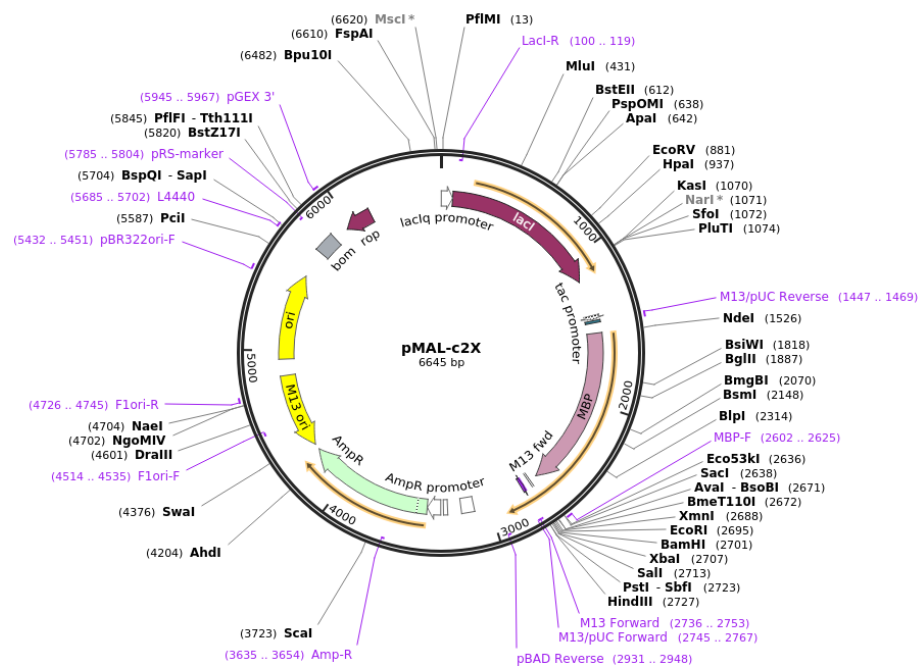


Figura 4.1 Mapa de restricción del plásmido pMAL-c2X [173].

- pACgp67B-HER2: Vector de clonación que contiene la secuencia codificante para el anticuerpo ScFv ML39 (**Figura 4.2**), (regalo de Judy Lieberman (Addgene plasmid # 10794) [183].

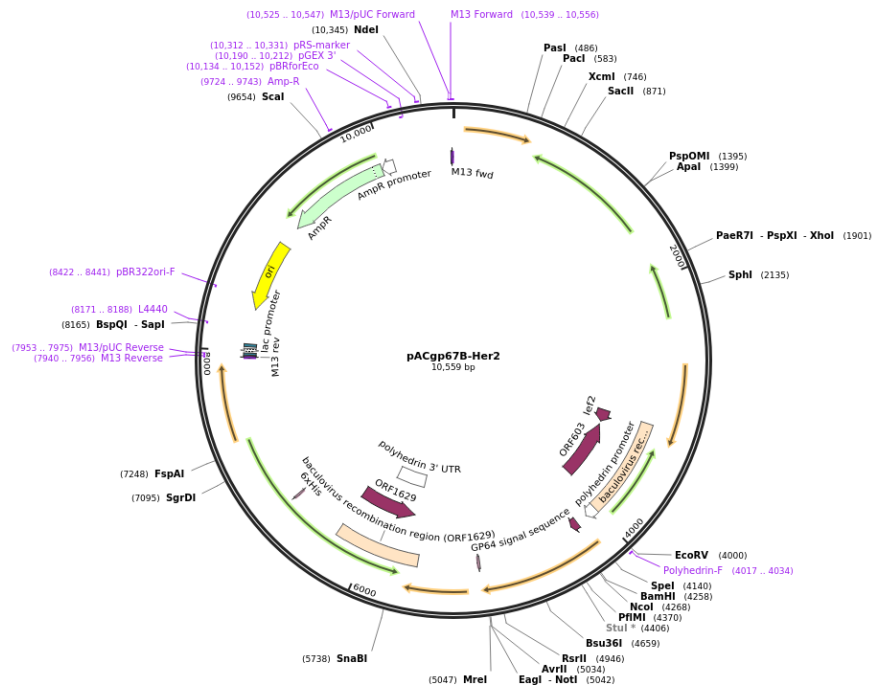


Figura 4.2 Mapa de restricción del plásmido pACgp67B-HER2 (Plasmid #10794) [183].

- *pBABEpuro-ERBB2*: Vector retroviral derivado del virus de la leucemia murina de Moloney (**Figura 4.3**). El vector proporciona la señal del paquete viral, los elementos de transcripción y procesamiento, y un gen diana. La transfección produce virus de alta titulación e incompetentes para la replicación. Las células infectadas expresarán el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano, y proporcionaran resistencia a la puromicina (regalo de Matthew Meyerson, Addgene plasmid #40978) [184].

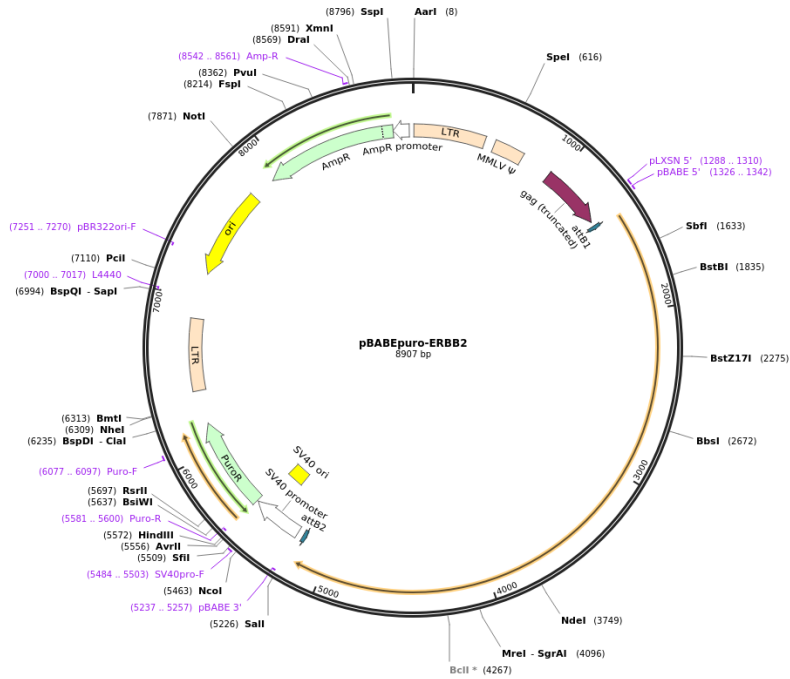


Figura 4.3 Mapa de restricción del plásmido pBABEpuro-ERBB2 (Plasmid #40978) [184].

La secuencia codificante de ScFv, que incluye una cola de 3'-poli histidina, se amplificó a partir de pACgp67B-HER2 mediante PCR añadiendo sitios de restricción 5'BamHI y 3'HindIII. El fragmento de PCR se subclonó en el vector pMAL-TEV, un vector de expresión pMAL-c2X modificado, donde el sitio de escisión del factor Xa se ha sustituido por un sitio de escisión de la proteasa TEV. El plásmido que se genera es pMAL-TEV-ScFv-HER2. La incorporación de la mutación I334W en la secuencia codificante de MBP por mutagénesis sitio-específica dio lugar al plásmido pMALI334W-TEV-ScFv HER2-His.

Los oligonucleótidos utilizados se indican en la tabla complementaria.

Lista de oligonucleótidos

Cebadores	Secuencia
I330W F	CAGAAAGGTGAAAtggATGCCGAACATCCCGCAGATGTCC
I330W R	GGACATCTGCGGATGTTTCGGCATccaTTCACCTTTCTG
I334W F	CAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACtggCCGCAGATGTCC
I334W R	GGACATCTGCGGccaGTTTCGGCATGATTTACCTTTCTG
I330W-I334W F	CAGAAAGGTGAAAtggATGCCGAACtggCCGCAGATGTCC
I330W-I334W R	GGACATCTGCGGccaGTTTCGGCATccaTTCACCTTTCTG

Tabla 4.1 Tabla con los cebadores diseñados para las mutaciones sitio-específicas del plásmido pMAL-TEV. Los codones en minúscula corresponden a los cambios realizados con respecto a la secuencia original.

4.1.6 Material para la manipulación de proteínas

Material de electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes y su tinción: Tris (Sigma), ácido clorhídrico (VWR), acrilamida, SDS, TEMED, persulfato amónico, marcadores de peso molecular (Thermo Scientific), glicina, glicerol (Panreac), β -mercaptoetanol (Merck), azul de bromofenol (Beckman), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fluka) y metanol (VWR).

En la realización de los Western blots se utilizaron membranas de nitrocelulosa y PVDF (GE Healthcare), BSA (Sigma), luminol (Sigma), ácido p-cumárico, DMSO, Tris, glicina, metanol, NaCl, Tween-20, H₂O₂ (Sigma), ácido clorhídrico (VWR), anticuerpos anti-IgG con afinidad por el receptor HER.

Para la extracción y análisis de proteínas también se utilizaron los siguientes reactivos: Tris, ácido clorhídrico, cloruro sódico, Nonidet-P40, SDS, desoxicolato sódico, EDTA, PMSF, fluoruro sódico, pirofosfato sódico, ortovanadato sódico, EGTA, ácido okadaico, aprotinina, leupeptina, pepstatina, cloruro potásico, HEPES y DTT. Estos productos procedieron de las siguientes casas comerciales: Amresco, Bio-Rad, Fluka, Merck, Panreac, Scharlau y Sigma.

Nombre de la proteína	Casa comercial del anticuerpo
HER2 Herceptin® biotina/estreptavidina	Síntesis en el laboratorio
HER2 MBP-ScFv biotina/estreptavidina	Síntesis en el laboratorio
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology sc-47724

Tabla 4.2 Lista de anticuerpos empleados en los experimentos de Western Blot.

Los anticuerpos MBP-ScFv fluoresceína y Herceptin® fluoresceína se sintetizaron en el laboratorio. Marcamos la proteína heteróloga y la Herceptin® empleando un enlace vinil sulfona, con una etiqueta bifuncional que presenta biotina y fluoresceína como marcadores de afinidad [185].

4.1.7 Material informático y análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA uni- o bidireccional seguido del test de Tukey según corresponda. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Todos los resultados se han procesado con las siguientes aplicaciones:

- Living Image Software 4.7.2 (IVIS Imaging Systems) para la adquisición y el procesamiento de las imágenes obtenidas en el IVIS.
- LAS AF Lite 2.6.0 (Leica Microsystems) para el procesamiento de las imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia.
- Kodak Digital Science 1D. Programa para el procesamiento de las imágenes de electroforesis de ácidos nucleicos obtenidas con la cámara fotográfica Kodak DC-120.
- Graphpad Prism 8 (GraphPad Software) para el diseño gráfico y análisis estadístico.
- EndNote X7 (Thompson Reuters) para la administración de la librería de referencias bibliográfica.
- Serial cloner 2.6.1 (Serial Basics) para el análisis de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas.
- PyMol 2.0 para comparar las configuraciones abierta y cerrada de la proteína de unión a maltosa.
- *Dynamut* para la predicción de cambios en la estabilidad de las proteínas tras la mutación.

4.1.8 Material para la experimentación general

- Polietilenimina ramificada 2 kDa y 25 kDa (PEI2kDa y PEI25kDa) (Merck).
- Clorhidrato de doxorubicina (DOX) y verde de indocianina (ICG) (Merck).
- Lipofectamine™ 2000 (LP) de Invitrogen.
- Plásmido pEGFP-N3 (Genbank U57609) obtenido de Clontech Laboratories. Este plásmido de 4729 pares de bases codifica para una variante mejorada de la GFP de tipo silvestre (eGFP), pero presenta desplazamiento hacia el rojo.
- Vector pGL3 control (Genbank U47296.2). Codifica para la expresión de luciferasa regulada por el promotor SV40 (Promega).
- Trastuzumab (Herceptin®) fue regalado por la Farmacia Oncológica del Hospital Virgen del Mar de Cádiz.

Los plásmidos libres de endotoxinas se purificaron de bacterias transformadas usando el EndoFree Plasmid Maxi Kit de Qiagen. La concentración de DNA se midió por fluorimetría utilizando el colorante Hoechst 33258.

4.2 Métodos

4.2.1 Metodología en células procariotas

4.2.1.1 Preparación de células competentes

Se preparan siguiendo el procedimiento de Nishimura [186]. Se parte de 50 mL de Medio A (ver 5.1.4.1), y se reservó 1 mL para su posterior uso. Se añadieron 0,5 mL de la cepa bacteriana en crecimiento en medio LB y se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6, midiendo a la longitud de onda 600 nm.

Una vez crecidas las bacterias se incubaron en hielo durante 10 minutos, y se centrifugaron a 1.500 \times g durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se re-suspendió en 250 μ L de Medio A. A la suspensión se le añaden 1,25 mL de Solución B (ver 5.1.4.1). Se divide la suspensión bacteriana en alícuotas de 100 μ L cada uno y los eppendorfs se conservan a -80°C.

4.2.1.2 Transformación bacteriana por choque térmico

Para realizar la transformación bacteriana se empleó el protocolo descrito por Hanahan [187].

Las células competentes que han permanecido al menos 4 horas a -80°C podrán ser utilizadas para la transformación.

Las células competentes se sacan de -80°C en hielo. Se añade el plásmido, se homogeniza con la pipeta suavemente, y las células se incuban durante 1 hora en hielo. Durante este período, el plásmido se introducirá en las bacterias competentes, una vez dentro procederemos a cerrar los poros de la pared bacteriana realizando un choque térmico. Incubamos las bacterias en un baño a 42°C durante dos minutos. Rápidamente, se transfiere el tubo al hielo durante 10 minutos. Se añaden 900 μ L de medio LB y se dejan crecer a 37°C en la estufa durante 1 hora.

Mientras, se prepararon placas de cultivo de bacterias con medio LB-agar y los antibióticos de selección correspondientes al plásmido y la cepa bacteriana. Se siembran 250 μ L de bacterias y se incuban O/N a 37°C en la estufa.

4.2.1.3 Inducción de la síntesis de proteínas

Se crecen las bacterias transformadas en medio LB y el antibiótico de selección a 37°C O/N. A continuación, se añade una alícuota de la suspensión bacteriana en matraces con 500 mL de medio y los mismos antibióticos de selección correspondientes. Las células crecieron con agitación a 37°C hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0,5 midiendo a 600 nm. En este momento, se añade IPTG 0,5 mM y las bacterias crecen con agitación a 30°C durante 6 horas. Después, se centrifuga a 8600 $\times g$ y se guardó el precipitado a -20°C.

4.2.2 Metodología para la manipulación de células eucariotas

Todos los procesos de manipulación de células eucariotas fueron realizados en condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar y material fungible esterilizado. Tanto las preparaciones descritas a continuación como los medios de cultivo también se encontraban en esterilidad durante su manipulación.

4.2.2.1 Cultivo celular y tripsinización

El cultivo de las células se realizó en el medio apropiado para cada línea celular, y fueron incubadas en una estufa a 37°C con una atmósfera al 5% CO₂.

Para poder separar las células que, normalmente, se encuentran adheridas a la placa de cultivo utilizamos tripsina. Las células despegadas son necesarias para poder realizar recuentos, subcultivos o su almacenamiento en crioviales.

Para realizar este proceso, primero se lava dos veces con PBS y después se adiciona la tripsina. El lavado se realiza para eliminar el FBS que se encuentra en el medio de cultivo y puede inactivar la tripsina.

A continuación, se añade una solución de 0,25% tripsina-EDTA, en cantidad suficiente como para recubrir la superficie de la placa. Se incuba en la estufa utilizada para el cultivo, comprobando *de visu* la separación de las células. Por último, se añade medio completo con suero bovino fetal para inactivar la tripsina.

4.2.2.2 Recuento celular

Tras la tripsinización, una vez homogenizada la suspensión celular, se procede a realizar el recuento de las células en la cámara de Neubauer. Dependiendo de la confluencia de la placa realizaremos una dilución mayor o menor del producto de la tripsinización (normalmente entre 1:5-1:10).

Las células se cuentan en una cámara de Neubauer, se añade un volumen adecuado de células en suspensión y se cuenta en el microscopio los 4 cuadrados coloreados en las esquinas de la cámara (**Figura 4.4**).

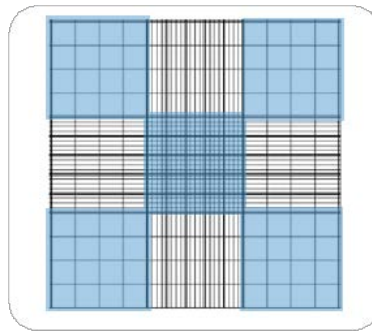


Figura 4.4.4 Representación esquemática de la cámara de Neubauer.

El número de células se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

$$\frac{n^{\circ} \text{ de células en 16 cuadros} \times 10^4}{\text{número de cuadros contados}} = \text{Número de células}$$

Dependiendo de la superficie de la placa se siembran un mayor o menor número de células:

	cm ²	Células/pocillo
p100	78,5 cm ²	2 x10 ⁶
p60	20 cm ²	650 - 800 x10 ³
p6	10 cm ²	210 - 250 x10 ³
p12	4 cm ²	72 - 89 x10 ³
p24	2 cm ²	40 - 50 x10 ³
p48	0,7 cm ²	18 - 22 x10 ³
p96	0,3 cm ²	7 x10 ³

Tabla 4.3 Estimación de número de células a sembrar por superficie de placa.

4.2.2.3 Criogenización celular

Tras la tripsinización, las células se pueden subcultivar o congelar, a este último proceso lo denominamos criogenización celular. Gracias a esta técnica una población de células vivas se conserva hasta su uso de nuevo.

Se mezclan 0,8 mL de células en suspensión con 1 mL de una solución de congelación (DMSO-FBS (80%-20% (v/v)) en crioviales que se introducen en un contenedor apropiado y se almacenan a -80°C. Estos contenedores (CoolCell Biocision) tienen la propiedad de disminuir la temperatura en su interior del orden de 1°C/minuto.

Transcurridas 24 horas, los viales congelados pueden ser almacenados en nitrógeno líquido (-195°C), o mantenerse en el congelador de -80°C. En este último, la viabilidad de la suspensión celular es aproximadamente de un año, mientras que las células conservadas en nitrógeno líquido mantienen su viabilidad durante periodos más largos de tiempo.

4.2.2.4 Transfección celular retroviral

Esta técnica ha sido realizada con la finalidad de obtener partículas virales aptas para infectar a células MDA-MB-231 de cáncer de mama, introduciendo dentro de las células empaquetadoras Phoenix-Ampho el plásmido pBABEpuro-ERBB2.

Primero se realiza la transfección de las células Phoenix-Ampho; se siembran 250.000 células/pocillo en placas p6 y se dejan crecer en medio DMEM completo hasta que se encuentran en una confluencia del 70-80% (normalmente O/N). Al día siguiente se realizó la transfección mezclando por separado el DNA en 100 µl de medio Optimen (medio de cultivo especial pobre en suero), y en otro eppendorf el reactivo de transfección, Lipofectamina 2000 en 100 µl de medio Optimen, dejándose ambos incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, para luego añadir la mezcla de DNA sobre la del reactivo de transfección. Se volvieron a incubar 20 minutos más a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos entre el reactivo de transfección y el DNA. Tras esto, se lavaron las placas de cultivo dos veces con PBS eliminando todo resto de FBS (contiene DNAsas que degradarían el DNA plasmídico) y se añadieron los complejos a las células. Durante el día se agitaron las placas cada una o dos horas para asegurar que todas las células están cubiertas por el medio. Al final del día se eliminó el medio de las placas y se añadió 2 ml de DMEM completo.

Al día siguiente se volvió a cambiar el medio. A las 48 horas, se recogió el sobrenadante que presenta partículas virales ya ensambladas, conteniendo en su interior pBABEpuro-ERBB2, procedentes del cultivo de las células Phoenix Ampho. Los sobrenadantes (sopas virales) se recogieron a las 72 y 96 horas. Cada vez que se recogían para ser usados en la infección, se añadían 2 ml de medio de cultivo completo.

Para realizar la infección, se sembraron 400.000 células MDA-MB-231 en placas p100 y la infección tuvo lugar 24 horas más tarde. Para ello se mezclaron 2 ml de sopa retroviral con 4 ml de DMEM completo y 6 µl de polibreno (de un stock 100x). El polibreno es un polímero catiónico que aumenta la eficiencia de la infección, al neutralizar la repulsión de cargas existente entre las partículas virales y la membrana celular.

Tras esto, se aspiró el medio que cubría las placas, se lavó una vez con DMEM completo y se volvió a aspirar por completo, para añadir a continuación la mezcla preparada anteriormente a las células, y agitar suavemente. Tras esto, se dejó la sopa en las placas durante toda la noche. Este procedimiento se repitió con cada uno de los sobrenadantes recogidos del crecimiento de las células Phoenix-Ampho. Finalmente, 48 horas de la última infección, se cambió el medio por uno selectivo, que contenía 8 µg/mL de puromicina, para así seleccionar solamente las células infectadas. Una vez seleccionadas se confirmó la sobre-expresión de ERBB2 mediante Western Blot y a estas células se les asignó el nombre de MDA-HER2+.

4.2.2.5 Transfección celular no retroviral

Para realizar la transfección se ha utilizado como reactivo Lipofectamina™2000, que está formado por liposomas catiónicos. Las cargas positivas interaccionan mediante fuerzas electrostáticas con los restos fosfato que se encuentran en la parte exterior de la doble hélice del DNA, y con las cargas negativas de la superficie de la membrana celular. Se han utilizado además como reactivos de transfección PEI2kDa y PEI25kDa, modificados o no. El pDNA utilizado en estos ensayos de transfección es pEGFP-N3, que codifica para la proteína verde fluorescente.

Se siembran en una p48 entre $1,7 \times 10^4$ y $2,2 \times 10^4$ por pocillo y se incuban O/N para tener al día siguiente una confluencia que oscilará entre el 60% y 80%. La transfección se realiza tal como se ha descrito en 4.2.2.4. El DNA y el reactivo de transfección se incuban de forma separada en eppendorfs en medio bajo en suero o sin suero por 5 minutos, se mezclan y se dejan 20 minutos a temperatura ambiente para que se formen los correspondientes complejos. En el caso de utilizar PEI25kDa y derivados, se utilizan distintas cantidades de los reactivos de transfección para una cantidad fija de DNA (0.3 µg/pocillo).

Cuando fue requerido, una vez formados los complejos que contienen PEI25kDa o derivados, éstos se incubaron con MBP o MBP-ScFv (10 µg/mL) por 20 minutos. Las células se lavan 2x con PBS estéril para eliminar los restos de antibióticos y FBS remanentes. Se añade DMEM sin FBS y a continuación los complejos formados. Las células se incuban a 37°C durante unas 4 o 6 horas. A continuación, se retira el medio y se vuelve a añadir el medio de cultivo completo de crecimiento de las células.

Las cantidades utilizadas están pensadas para una placa de 48 pocillos, siempre que se use un tipo diferente de placa deberemos ajustar los cálculos a la superficie de cada pocillo para que el procedimiento sea reproducible.

4.2.2.6 Cuantificación de la eficiencia de transfección

Pasadas 24 horas de la transfección, las células expresarán el DNA transfectado y se puede medir la eficiencia de transfección.

Primero, se comprueba en el microscopio de fluorescencia (Olympus CKX41) si las células expresan proteína fluorescente verde. En caso afirmativo, se lisan las células, utilizando un reactivo de lisis (Promega). Se lavan los pocillos con PBS dos veces, y se añaden 50 μ L del reactivo de lisis a cada pocillo. Las placas se dejarán incubando a temperatura ambiente en agitación, observando al microscopio hasta comprobar que las células se han despegado. A continuación, se añade 150 μ L de PBS a cada pocillo y se mide la fluorescencia en un fluorímetro (Shimadzu RF-5301 PC) usando los siguientes parámetros: Excitación: 485 nm, Emisión: 510 nm; apertura de las ventanas 5 para excitación y 10 para emisión.

La fluorescencia de cada pocillo se normaliza usando la concentración de proteínas.

4.2.2.7 Microscopía confocal de fluorescencia

Las células se siembran en cubreobjetos empleando placas de 12 pocillos (densidad igual a 9×10^5 células/pocillo), y se incubaron a 37°C (24 horas) para alcanzar una confluencia celular de 80-90%. Una vez crecidas e incubadas con los diferentes efectores, las células se lavan tres veces con PBS. A continuación, se incuban a temperatura ambiente con paraformaldehído al 2% (p/v) en PBS. Se lava de nuevo con PBS, y se montan los cubreobjetos sobre un portaobjetos en el que se ha depositado una gota de líquido de montaje (Vectashield mounting media, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA).

Para la detección de células positivas para HER2, se sembraron células SKBR3 que expresan HER2 o células MDA-MB-231 negativas para HER2, en cubreobjetos y 24 horas después se fijaron e incubaron con el fluoróforo correspondiente, se lavaron y montaron.

Una vez montadas las preparaciones se pueden almacenar a 4°C hasta el momento de su visualización. Se utilizó un microscopio confocal espectral de alta velocidad y multifotón Leica TCS-SP5 II para la toma de imágenes (Servicios Centrales de la Universidad de Granada).

Las muestras no se expusieron más de 5 minutos al láser para evitar fotoblanqueo. Se utilizaron los fotomultiplicadores al máximo voltaje posible para utilizar la mínima potencia necesaria para visualizar la fluorescencia. Se usó un pinhole de un tamaño correspondiente a una unidad Airy. Los datos se procesaron usando el software Leica LAS AF. Las imágenes adquiridas poseen una resolución 1024x1024p y se recogieron las series en modo xyz.

4.2.2.8 Ensayos de captación de Doxorubicina por fluorescencia

El ensayo de captación se emplea para conocer la capacidad cuantitativa y cualitativa de entrada de fármaco al interior de la célula. La Doxorubicina (DOX) se ocluyó en β -ciclodextrinas (β CD) mediante la incubación de ambos componentes en una relación molar nDOX: n β CD = 0: 9 O/N a 4°C. La solución se liofilizó y se confirmó la inclusión de DOX en la ciclodextrina mediante espectroscopia de fluorescencia y UV-Vis. Este procedimiento se realizó para ocluir Indocianina Verde (ICG) en la β CD usando el mismo protocolo y estequiometría.

Tras la incubación de las células con 1 μ M doxorubicina o concentraciones equivalentes ocluidas en β CD, se determinó la entrada del fármaco al interior de las células y la citotoxicidad del mismo.

Para determinar la entrada de DOX, las células se lisaron con 200 μ L de Tritón X-100 al 0,5% en PBS y la fluorescencia debida a la DOX se midió en un espectrofluorímetro JASCO FP-8300 con ventanas de apertura de 2,5 nm a una excitación de 499 nm y longitudes de onda de emisión de 555 nm.

4.2.2.9 Ensayos de captación de Doxorubicina empleando citometría de flujo

El ensayo de captación se emplea para conocer la capacidad cuantitativa y cualitativa de entrada de fármaco al interior de la célula.

Tras la incubación de las células con 1 μ M doxorubicina o concentraciones equivalentes ocluidas en β CD, se determinó la entrada del fármaco al interior de las células.

Se retiró el medio de cultivo y se tripsinizaron las células adheridas. El producto de la tripsinización se recogió en un tubo de 1,5 mL y se centrifugó a 400 xg durante 5 minutos. Se lavó dos veces con PBS y centrifugándose nuevamente a 400 xg durante 1 minuto entre cada lavado, y se resuspendieron de nuevo en PBS. Las células se procesaron por citometría de flujo.

4.2.2.10 Ensayos de viabilidad celular y proliferación celular basados en MTT

El ensayo MTT o Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol es ampliamente usado en el estudio de viabilidad o proliferación celular. Las células vivas, por acción de sus deshidrogenasas mitocondriales, convierten el MTT en formazán, un compuesto morado con un máximo de absorbancia a 570 nm.

Tras la incubación con los correspondientes efectores, las células se lavan con PBS y se incuban en medio DMEM sin FBS al que se ha añadido 0,5 mg/mL MTT. Se incuba en estufa a 37°C durante 45-70 minutos (según el tipo celular). Transcurrido el tiempo de incubación se retira el medio, se adiciona una solución de 40 mM de HCL en isopropanol con el fin de extraer el formazán del interior de la célula y se mide la densidad óptica a 570 nm.

La intensidad de la señal generada es dependiente de varios parámetros entre los que se encuentran la concentración de MTT, el tiempo de incubación, el número de células viables y su actividad metabólica. Todos estos parámetros deben tenerse en cuenta para la optimización del ensayo; y deben de ser constantes a fin de ser comparables.

4.2.3 Métodos para la manipulación de proteínas

4.2.3.1 Purificación de proteínas

Tras la inducción de la síntesis de proteínas en las bacterias que sobre-expresan el plásmido que la codifica, se necesita purificar la proteína de interés. La purificación de las proteínas usadas en esta tesis doctoral, MBP y MBP-ScFv, se ha realizado a partir del pellet de bacterias inducidas correspondientes a un cultivo de 500 ml.

Para ello, el precipitado bacteriano se resuspendió en un tampón HEPES 20 mM, imidazol 20 mM, glicerol 10%, Triton X-100 0,2%, pH 8, al que se le había añadido PMSF 1 mM y 100 µg/mL de lisozima, y las células se lisaron por sonicación (100% y 0,5 ciclos). El lisado se centrifuga a 12000 xg durante 30 minutos para eliminar los restos celulares. Se transfiere el sobrenadante a un tubo de 50 mL y se le añade sulfato de protamina 0,1% para precipitar las endonucleasas; se incuba por agitación en un rotatubos durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se centrifuga durante 30 minutos a 12000 xg para precipitar la protamina junto con las endonucleasas. El sobrenadante se filtra con un filtro de 0,45 µm para eliminar posibles contaminantes. El sobrenadante de la centrifugación se considera el punto de partida de la purificación.

Para la purificación de la proteína de interés, se utiliza una columna de cromatografía de afinidad (HisTrap GE®). Primero, se equilibra la columna con el tampón de equilibrio (HEPES 20 mM, imidazol 20 mM, pH 7,4), y después el sobrenadante se pasa a través de la columna. Tras el lavado en el tampón de equilibrio (se utiliza tanto tampón como sea necesario hasta que no eluyan proteínas de la columna), y con objeto de eliminar cualquier residuo que pueda contaminar la proteína de interés, se realiza un segundo lavado utilizando un tampón 20 mM HEPES, NaCl 500 mM, pH 7,4.

Finalmente, se eluye la proteína con tampón de elución (HEPES 20 mM, imidazol 500 mM, pH 7,4). El eluato se concentra con tampón HEPES 20 mM a pH 7,4 en un filtro de centrifuga de membrana de polietersulfona con corte de peso molecular en 10 kDa (VWR) a 10000 xg .

4.2.3.2 Preparación de extractos proteicos

El Western Blot es un método empleado para medir, de manera cuantitativa y cualitativa, proteínas en un extracto celular. Para poder utilizar esta técnica es necesario obtener y aislar las proteínas de otros restos celulares que puedan interferir en el estudio.

Tras la incubación de las células con los diferentes efectores, se retira el medio y las células se lavan con PBS dos veces. Se añaden 50 µL de tampón de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl, pH8; 150 mM NaCl; 1% (v/v) Nonidet P-40; 0,1% (p/v) SDS; 1% (p/v) desoxicolato sódico; 5 mM EDTA; 1 mM PMSF). Se recogen las células, se sonicán (50% y 0,5 ciclos) y el lisado resultante se centrifuga a 10.000 xg a 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo.

4.2.3.3 Cuantificación de la concentración de proteínas

Para el empleo de una proteína obtenida por purificación, o los extractos proteicos de un cultivo celular, se debe conocer su concentración con el fin de que nuestros resultados sean reproducibles.

Existen varios métodos para la cuantificación de proteínas, como las muestras poseen detergentes el mejor método para cuantificar sin interferencias sería el método del ácido bicinconínico (BCA) [188].

El método de detección de proteínas BCA se basa en la reacción de reducción del cobre, desde Cu^{2+} a Cu^{1+} por grupos reductores de las proteínas. El ion Cu^{1+} reacciona con dos moléculas de ácido bicinconínico, mostrando una coloración medible en un espectrofotómetro. Este método se caracteriza además de por su sensibilidad, por una baja interferencia en la medida de moléculas como SDS, glicerol o imidazol. El método se ha adaptado a su uso en placas de ELISA y como curva de calibrado se han utilizado soluciones de albúmina bovina desde 0-10 µg/pocillo. La medida espectrofotométrica se ha realizado a 595 nm.

4.2.3.4 Electroforesis vertical en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida) (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas en geles SDS-poli(acrilamida) se ha realizado utilizando el sistema Mini-Proteom II (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. La acrilamida es un polímero entrecruzado que permite la separación de las proteínas por tamaño. El porcentaje de acrilamida a emplear dependerá de las necesidades de eficiencia en cuanto a la resolución, en el caso de esta tesis utilizamos geles con acrilamida al 10% (p/v). Los geles de acrilamida contienen dos partes; la primera parte es la zona de compactación o *Stacking* y la segunda la zona de resolución. Su composición se muestra en la **Tabla 4.4**.

	Compactación o <i>Stacking</i>	Gel de resolución
Tris-HCl, pH 6,8	0,125 M	-----
Tris-HCl, pH 8,8	-----	0,375 M
Acrilamida	4% (p/v)	10% (p/v)
SDS	0,1% (p/v)	0,1% (p/v)
TEMED	0,1% (v/v)	0,05% (v/v)
APS	0,05% (p/v)	0,05% (p/v)

Tabla 4.4 Composición de los geles de acrilamida

El SDS es un detergente que presenta carga negativa y se emplea para que la separación de proteína se realice en función del peso molecular. La carga negativa del SDS se considera alta, por lo que la carga intrínseca de la proteína queda reducida a un valor insignificante. Al ser un detergente provoca una desnaturalización de las proteínas al unirse a ellas.

Las muestras se preparan mezclando 30 µg de proteínas con tampón de carga 5x (200 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% (p/v) SDS; 20% (v/v) glicerol; 5% (v/v) β-mercaptoetanol; 0,1% (p/v) azul de bromofenol). A continuación, se calientan a 98°C durante 5 minutos. En este proceso de calentamiento y de incubación con el tampón de carga favorece la desnaturalización de las proteínas.

El gel se sumerge en tampón de electroforesis 1x TGS pH8,3 (25 mM Tris; 192 mM glicina; 0,1% (p/v) SDS) y las muestras se cargan en los pocillos del gel de compactación. La electroforesis tiene lugar a 150 V durante unos 70 minutos aproximadamente. El tiempo de resolución variará en función del tamaño de las proteínas de interés y de la calidad de resolución que necesitemos. La tinción de las proteínas se realiza con 0,2% (p/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 40% (v/v) metanol y 15% (v/v) ácido acético. El gel se deja sumergido O/N en agitación suave a temperatura ambiente. Al día siguiente los geles se pasan a la solución de decoloración (40% (v/v) metanol, 15% (v/v) ácido acético) hasta que las bandas coloreadas correspondientes a las proteínas se hacen visibles. Inmediatamente después, los geles son fotografiados.

4.2.3.5 Western Blot

Esta técnica permite la detección y cuantificación de una proteína concreta de interés, mediante el uso de anticuerpos específicos. Tras la electroforesis vertical, las proteínas se transfieren del gel de acrilamida a una membrana, que puede ser de nitrocelulosa o PVDF según las características del anticuerpo. Para realizar la transferencia, utilizamos un dispositivo Trans-Blot Transfer System de Bio-Rad. La transferencia se realiza a 25 V/1 A durante 30 minutos. El tampón de transferencia pH 8,3 contiene 25 mM Tris; 0,2 M glicina; 20% (v/v) metanol.

Después de la transferencia, las membranas se introducen en un Falcon de 50 mL y se añade una solución de bloqueo formada por 5% (p/v) de BSA o leche desnatada en polvo, en TBS-Tween (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween20). Esta solución de bloqueo tiene la misión de ocupar sitios de unión inespecíficos que se encuentren en la membrana y evitar así interferencias. La membrana se agita con la solución de bloqueo durante una hora.

Tras la hora de incubación se retira la solución de bloqueo y se procede a la incubación con agitación de la membrana en la solución de bloqueo que contiene el anticuerpo primario O/N a 4°C. Se realizan tres lavados con TBS-Tween durante 5 minutos con rotación a temperatura ambiente y, a continuación, se incuba la membrana con el anticuerpo secundario diluido en una solución igual a la de bloqueo durante 2 horas. El anticuerpo secundario tiene la capacidad de unirse al anticuerpo primario, además tiene una peroxidasa unida cuya actividad utilizaremos para su detección.

Se realizan otros tres lavados con TBS-Tween y un último lavado, esta vez con TBS sin Tween durante 5 minutos. Por último detectamos la proteína mediante quimioluminiscencia empleando un reactivo [189] y un dispositivo de detección ChemiDoc-It 810 Imager de UVP. En el caso de los anticuerpos fluorescentes el proceso es exactamente igual, salvo que las imágenes se obtuvieron en un ChemiDoc MP de Bio-Rad.

4.2.3.6 Ensayo de estabilidad térmica empleando Thermal Shift Assay

La determinación de las curvas de desnaturalización por temperatura de la MBP y MBP-ScFv se ha realizado mediante el uso de la técnica de Thermal Shift Assay. Para ello se ha utilizado un Termociclador a tiempo real miniOpticon de 48 pocillos (Bio Rad). Se ha empleado para la determinación como fluoróforo Sypro® Orange (Sigma Aldrich) y como filtros de excitación y emisión la pareja HEX del equipo (excitación en el rango de 470-505 nm y emisión entre 540 y 700 nm). Se han realizado curvas de desnaturalización entre 30 y 75°C, con un incremento de temperatura de 0.2°C. A partir de los datos de fluorescencia obtenidos se han determinado las curvas de fusión (*melt curves*), los picos de fusión (*melt peaks*) y la temperatura de fusión (*T_m*) de cada condición experimental.

Para la preparación de las muestras, a partir de la solución comercial de Sypro® Orange se realiza una dilución 1:500 en DMSO y se dispone en tiras de PCR ópticamente transparentes en un volumen final de PBS de 30 µl. Incluimos en el volumen la dilución 1x del colorante y 5 µM de concentración final de la MBP purificada. En algunas determinaciones, la MBP ha sido incubada con concentraciones crecientes (0-500 µM) de maltosa (Merck) durante 10 minutos antes de iniciar las curvas de desnaturalización.

4.2.4 Métodos para la manipulación de ácidos nucleicos

4.2.4.1 Aislamiento y purificación de DNA plasmídico

DNA miniprep

La purificación de DNA plasmídico se ha realizado utilizando el kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Este kit se basa en la realización de una etapa de lisis alcalina a partir de un cultivo saturado de bacterias (1.5-3 ml), en presencia de SDS para liberar el DNA plasmídico y la precipitación del DNA cromosómico. Una vez neutralizado el lisado se separaron las proteínas y restos celulares por centrifugación y el sobrenadante se aplicó a microfiltros de centrifugación con membranas de sílice, contenidos en el kit. El DNA absorbido se lavó para eliminar contaminantes y se eluyó con H₂O miliQ. La pureza y cuantificación del DNA se llevó a cabo espectrofotométricamente.

Tras este procedimiento, el plásmido purificado queda preparado para su uso en procedimientos como la digestión con las enzimas de restricción, PCR, transformación y secuenciación automática.

DNA midiprep

Este método se ha empleado con el objetivo de obtener grandes cantidades de DNA plasmídico de gran pureza y libre de endotoxinas. Para ello, se ha inoculado 1 ml de cultivo saturado de bacterias transformadas con el plásmido de interés en 500 ml de medio LB suplementado con los antibióticos de selección y se ha incubado a 37°C en agitación a 200 rpm. Pasadas 24 horas, se ha centrifugado el cultivo a 7000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se ha re-suspendido el pellet en solución I (25 mM TRIS pH 8, 10 mM EDTA).

A continuación, se han lisado las bacterias con la solución de lisis (0,4 M NaOH, 0,1% (p/v) SDS), se ha neutralizado el lisado con acetato potásico (5 M, pH 4,8) y se ha centrifugado a 7000 rpm durante 15 minutos. Pasado el tiempo, se ha filtrado el sobrenadante, se han añadido 0,6 volúmenes de isopropanol y se ha vuelto a centrifugar 15 minutos a 10 000 rpm. El pellet se ha re-suspendido en solución I con LiCl 5 M para eliminar las toxinas y se ha centrifugado. Posteriormente, se ha incubado con 20 µg/ml de RNAsa A durante 30 minutos a 37°C y se ha añadido 13% PEG 8000 en NaCl 1,6 M y se ha centrifugado a 13500 rpm durante 20 minutos a 4°C.

El precipitado de DNA se ha re-suspendido con solución I y se ha extraído dos veces con solución fenol-cloroformo (1:1) a pH 8 y una vez con cloroformo. A la fase acuosa se le ha adicionado acetato amónico 7,5 M y dos volúmenes de etanol absoluto y se ha centrifugado 15 minutos a 13500 rpm a 4°C. Finalmente, el DNA plasmídico se ha lavado con etanol al 70% y se ha diluido en agua MiliQ.

4.2.4.2 Cuantificación DNA

Método fluorimétrico

Se basa en el empleo de un reactivo comercial denominado Hoechst 33258, que se intercala en la doble hebra del DNA y emite fluorescencia. Dicha fluorescencia es proporcional a la cantidad de DNA presente en la muestra, por lo que podemos cuantificarlo comparando con la de un DNA de concentración conocida.

En primer lugar se prepara una recta patrón con cantidades crecientes (1-5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de DNA de espermatozoos de salmón (1 mg/mL). El DNA se mezcla con reactivo de Hoechst y tampón TNE (0,2 M NaCl; 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 7,4). A continuación se mide la fluorescencia a una longitud de onda de 365 nm de excitación y 460 nm de emisión.

La concentración de DNA de la muestra problema se calcula por interpolación de los valores de fluorescencia obtenidos en la recta patrón.

Cuantificación espectrofotométrica en dispositivo NanoDrop

Se utiliza un espectrofotómetro NanoVue Plus (GE Healthcare) para hacer una medida directa de la concentración de pDNA. El equipo se calibra con agua destilada y la densidad óptica de la muestra a 260 nm, es proporcional a la concentración de DNA en la muestra.

4.2.4.3 Digestión con endonucleasas de restricción

Una endonucleasa de restricción es una enzima capaz de reconocer secuencias específicas de DNA generando una serie de fragmentos más pequeños. Existe una variedad amplia de estas enzimas de diferentes especies bacterianas. Estas enzimas se aislaron, purificaron y catalogaron por su interés en el campo de la bioquímica como herramienta de trabajo.

Para digerir el DNA con enzimas de restricción se han seguido las instrucciones del fabricante (ThermoFisher Scientific). Usualmente, se han utilizado 0,1- 0,5 μg de DNA, 1 μl de tampón de digestión Fast Digest 10x y 10 U/ μg de DNA del enzima de restricción Fast Digest en un volumen final de 10 μl . Las digestiones se han realizado incubando a 37°C en el termobloque durante 30-90 minutos.

4.2.4.4 Electroforesis horizontal en geles de agarosa

Utilizamos este tipo de electroforesis para la separación de DNA y poder visualizarlo posteriormente mediante tinción con bromuro de etidio, un agente intercalante y fluorescente cuando se expone a luz ultravioleta. La electroforesis se ha realizado en geles de agarosa de 0,8% (p/v) preparados en tampón de electroforesis o TAE (40 mM Tris; 0,11% (v/v) ácido acético glacial; 1 mM EDTA- Na_2 pH 8).

Sumergimos el gel en tampón TAE y cargamos las muestras de DNA, disueltas en un tampón de carga (40% (v/v) glicerol, 60% (v/v) dH₂O y cantidad suficiente de azul de bromofenol) en proporción 5:1. A continuación se aplica un voltaje de 90 V durante 30 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo de electroforesis, se sumerge el gel en una disolución de bromuro de etidio en tampón TAE a una concentración de 1 µg/mL durante al menos 10 minutos. Después podremos visualizar el gel y fotografiarlo en presencia de luz ultravioleta. El tamaño de los fragmentos se ha determinado utilizando marcadores de peso molecular como Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker o 100 pb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific).

4.2.4.5 Ligación de DNA

La reacción de ligación consiste en la unión de dos fragmentos de DNA mediante el empleo de una DNA ligasa. La reacción debe realizarse en hielo. Los fragmentos obtenidos por digestión con endonucleasas, o por el resultado de una reacción de PCR, se mezclan con vectores que se encuentran linealizados y cuyos extremos son compatibles en una proporción molar 3:1. Se añaden 5 µL de T4 DNA ligasa y 10 µL de tampón para la ligación (Reaction Buffer 2x Thermo Scientific). La mezcla se lleva usualmente a un volumen final de 20 µL con agua destilada y se incubó a 10°C O/N.

4.2.4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Utilizamos la PCR para aumentar de forma exponencial una hebra de DNA de cadena doble que presenta una secuencia específica. En el proceso añadimos una pareja de oligonucleótidos que hibridan con esta secuencia concretamente, su función es de actuar como molde para la duplicación de la hebra. Por último, se usa una DNA polimerasa termorresistente y desoxirribonucleótidos libres para formar las nuevas hebras.

Las reacciones de amplificación se realizan en un termociclador Perkin Elmer 9700. Las reacciones se llevan a cabo en un volumen final de 50 µL que incluye los oligonucleótidos (*forward* y *reverso*) a una concentración final 0,1 pM, los desoxirribonucleótidos a 100 µM y 1,25 U.I. de Pfu polimerasa, en el tampón apropiado para la enzima.

La reacción comienza con un ciclo de desnaturalización de una duración de 5 minutos a 94°C. A continuación un número variable de ciclos (entre 20 y 35) en cada cual se repetirán tres fases:

- Desnaturalización de la hebra a 94°C durante 30 segundos.
- Fase de hibridación (la temperatura depende de la longitud de los oligonucleótidos)
- Fase de amplificación a 72°C.

La última de estas fases tiene una duración variable en función del tamaño final del fragmento a amplificar. Finalmente un último ciclo de amplificación de 7 minutos a 72°C para asegurar que se acabaran de sintetizar todos los fragmentos iniciados. Para conocer la temperatura de la fase de hibridación de los oligonucleótidos, se utiliza el programa informático Serial Cloner 2.6.1.

4.2.4.7 Mutación dirigida Quick Change

La mutagénesis dirigida se basa en una reacción de termociclado no-PCR que emplea cebadores con la mutación incluida, seguido de la eliminación del plásmido original mediante su digestión con DpnI [190]. Para las reacciones de mutagénesis, no se utilizan kits comerciales. Las reacciones de PCR se preparan de acuerdo con Laible y Boonrod [191]: se adiciona 60 ng del molde del plásmido, el par seleccionado de oligonucleótidos mutagénicos (concentración final de 0,4 µM cada uno), nucleósidos trifosfato 0,25 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8,8 a 25°C), (NH₄)₂SO₄ 10 mM, KCl 10 mM, 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino, Triton X-100 al 0,1% (v/v), MgSO₄ 2 mM y 2,5 U de DNA polimerasa recombinante Pfu (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania) en un volumen final de 50 µL.

El plásmido pMal-TEV-His, que codifica para la MBP unida a una cadena de polihistidina, se ha utilizado de molde para realizar las mutaciones sitio-específicas I330W e I334W.

En la secuencia de aminoácidos QKGEIMPNIQMS, la primera isoleucina corresponde a la posición Ile330 y la segunda a la posición Ile334. La secuencia traducida será la siguiente (resaltando en negrita los codones que codifican para la isoleucina):

CAGAAAGGTGAAAT**C**ATGCCGAACAT**C**CCCGCAGATGTCC

Con la secuencia definida, diseñamos los cebadores (Merck) para cada una de las mutaciones (**Tabla 4.1**).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una fase de desnaturalización inicial (30 segundos, 95°C); seguida de 18 ciclos de desnaturalización (30 segundos, 95°C), hibridación (30 segundos, 55°C) y extensión (4 minutos, 72°C). Después del ciclo, se programó la PCR para una extensión adicional de 10 minutos a 72°C seguido de enfriamiento a 4°C.

Una vez que se completa la reacción de termociclado, se reserva una alícuota de 10 µL para el análisis de electroforesis en agarosa y se agrega 1 µL (10 U) de enzima DpnI al resto de la reacción. Se incuba a 37°C durante al menos 2 horas para eliminar el molde de DNA plásmidico. Para confirmar que se ha producido la mutación se realiza una electroforesis en un gel de agarosa de la reacción de amplificación antes y después de la digestión con DpnI, y la cantidad equivalente del plásmido base utilizado para la reacción de mutagénesis.

4.2.4.8 Construcciones realizadas en el laboratorio

Partiendo de un vector de expresión comercial (pMAL-c2X) se realizaron varias modificaciones empleando la técnica *Quick Change*. Se sustituyó el sitio de escisión del factor Xa por el de escisión para la proteasa TEV [192], y se insertó una cola de poli histidina en el extremo 3'. Tras las modificaciones se obtuvo un plásmido que codifica para la MBP silvestre (**pMAL-TEV-HIS**).

Se realizó una mutagénesis dirigida en el pMAL-TEV-HIS amplificando por PCR [193]. Se cambiaron las isoleucinas situadas en las posiciones 330 y en 334 de la secuencia codificante, por triptófanos (**Tabla 4.1**). Con estas modificaciones se generaron tres tipos de mutaciones, que junto con el plásmido original se denominaron **pMAL-TEV-HIS**, **pMAL_{I330W}-TEV-HIS**, **pMAL_{I334W}-TEV-ScFv-HIS** y **pMAL_{I330W-I334W}-TEV-HIS**.

Tanto el plásmido que codifica para la MBP silvestre como los mutados, se complementaron con la secuencia que codifica para el anticuerpo ScFv. Se insertó a continuación del sitio TEV empleando enzimas de restricción y la técnica de ligación. Los plásmidos resultantes se denominaron **pMAL-ScFv_{HER2}-HIS**, **pMAL_{I330W}-TEV-ScFv_{HER2}-HIS**, **pMAL_{I334W}-TEV-ScFv_{HER2}-HIS**, **pMAL_{I330WI334W}-TEV-ScFv_{HER2}-HIS**.

4.2.4.9 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética

La capacidad para unir DNA de un compuesto de transfección es una de las cualidades a ensayar para conocer su eficacia. A mayor capacidad de unión, mayor es la probabilidad de que sea eficaz. Con el fin de conocer esta cualidad, se realiza una incubación de un pDNA con el compuesto de transfección y luego se observa su comportamiento mediante electroforesis en geles de agarosa.

El pDNA utilizado es pEGFP-N2 (5 µL a 0.1 mg/mL). Se mezcla con bPEI25kDa como control y con su derivado con Maltosa, y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente; en caso de ser necesario, tras la incubación se incuba con las proteínas (MBP_{I334W} o MBP_{I334W}-ScFv_{HER2}) otros 20 minutos.

Se recoge una alícuota de 5 µl de cada mezcla para someterla a electroforesis en un gel de agarosa (0,8% p/v) en tampón TAE. La electroforesis se llevó a cabo a 7 V/cm y los geles se tiñen después de la electroforesis con bromuro de etidio.

La cuantificación de la intensidad de la banda se realizó con el software NIH ImageJ [194]. Se asigna un valor del 100% a la banda que contiene el DNA desnudo y se calcula el porcentaje de unión con respecto a la banda de control.

4.2.4.10 Ensayos de protección frente a DNAsas

Otra de las cualidades a conocer en un compuesto de transfección es su capacidad para proteger frente a DNAsas el DNA que lleva unido. Esta capacidad puede ser crucial para el éxito de la transfección. El DNA de pEGFP-N2 (10 μ L a 0.1 mg/mL) se mezcla con los derivados de PEI (0.25, 0.5, 1 ratio N/P), y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añade una solución de DNasa I (10 μ L, 50 μ g/mL en Tris-HCl 50 mM, pH 8), y se incuba durante 1 hora a 37°C.

Después de la digestión con DNasa, se añade SDS al 20% para desnaturalizar la DNasa y detener la reacción. Las muestras se incuban durante 15 minutos a 65°C. Con el fin de comprobar la integridad del pDNA se disocia la unión con el compuesto de transfección añadiendo 30 μ g heparina para luego realizar una electroforesis en gel de agarosa.

Los geles se tiñeron después de la electroforesis con bromuro de etidio. La cuantificación de la intensidad de la banda se realizó con el software de imágenes NIH [194]. Se asignó un valor de 100 a la banda correspondiente al DNA no digerido control.

4.2.5 Manipulación *in vivo*

Se emplean ratones inmunodeficientes NSG hembra (6-8 semanas de edad, 25-30 g de peso) en las instalaciones del Animalario de la Universidad de Granada. Se mantienen de acuerdo con las pautas establecidas por la Directiva 2012/707/UE, y la aprobación del Comité de Investigación Animal en la Universidad de Granada (15/11/2017/154).

Para los modelos xenografts, se utilizaron células SKBR3 que se tripsinizaron y se resuspendieron en PBS (densidad igual a 2×10^7 células/mL). Se inyectaron 1×10^6 células por vía intradérmica, en el área de la mama. Cuando el tamaño de los tumores alcanza un diámetro de 1 a 6 mm, se procedió a inyectar en la vena de la cola las nanopartículas unidas a los fluoróforos a ensayar.

La obtención de imágenes *in vivo* se realiza en un equipo IVIS (xCaliper Life Sciences). Se colocan los ratones, anestesiados con isoflurano, en la cámara oscura para la adquisición de luminiscencia o fluorescencia. Las imágenes se toman y se analizan con el paquete de software Living Image 2.6 (Xenogen).

4.2.5.1 Ensayos de captación de Doxorubicina *in vivo*

Debido a que el espectro de la DOX no es capaz de detectarse *in vivo* en tumores animales, se utiliza la ICG como fluoróforo para detectar la captación. El complejo ICG- β CdbPEI2k-Mal se incubó con cantidades equimoleculares de MBP_{1334W}-ScFV_{HER2} durante 30 minutos a temperatura ambiente con el objeto de obtener el complejo [ICG- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFV_{HER2}]. Como control negativo se emplea el mismo complejo pero incubado con MBP_{1334W} sin el receptor. Los complejos se administran por vía intravenosa en la cola, y las imágenes se obtienen en el IVIS durante 30 minutos.

4.2.5.2 NIR *in vivo*

Para la detección de células que presenten el receptor HER2 por fluorescencia incubamos MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} con cantidades equimoleculares de NIR-Mal. Tras 30 minutos de incubación obtenemos el complejo [(NIR) Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}]. Como control negativo utilizamos una cantidad equivalente de NIR-Mal. Los compuestos se administraron por vía intravenosa en la cola y 24 horas más tarde se obtuvieron las imágenes *in vivo* mediante IVIS.

4.2.5.3 Transfección *in vivo*

Para la detección de la eficiencia de transfección de las nanopartículas recogidas en esta tesis doctoral, 50 µg de plásmido pGL3 control (Genbank U47296.2) se incuban con bPEI25k-Mal en un ratio N/P de 7, durante 20 minutos. Tras la incubación, se realiza una segunda incubación de 20 minutos con la proteína MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} en cantidades equimoleculares. Los complejos se administran por vía intravenosa en la cola y 24 horas más tarde se mide la emisión de luminiscencia tras la inyección intraperitoneal de 150 mg/kg de D-Luciferina (Melford Laboratories). Se obtienen las imágenes *in vivo* mediante IVIS.

5. Resultados

5.1 Estrategia de diseño de vectores teragnósticos

Se considera molécula teragnóstica a cualquier molécula con la capacidad para operar como agente de diagnóstico y tratamiento de manera específica, sobre un tipo celular o de tejido. Como se ha indicado en los objetivos propuestos para esta Tesis, el objetivo fundamental es el desarrollo de sistemas teragnósticos que permitan tanto la visualización como el transporte dirigido a células tumorales en modelos celulares y animales de procesos neoplásicos.

El disponer en una misma partícula la capacidad de visualización de la misma junto con la de un transporte activo y específico de fármacos permitiría combinar el diagnóstico de la evolución del proceso tumoral junto con la administración del tratamiento. La combinación de un transporte dirigido con la visualización del mismo permite el desarrollo de agentes terapéuticos más específicos, con menos efectos secundarios y una mayor eficacia, al mismo tiempo que validar la utilidad de los mismos mediante técnicas de imagen.

Existen varias posibilidades para el desarrollo de estos agentes terapéuticos. En todos los casos es necesario disponer de una molécula directora hacia una diana molecular que se exprese en las células tumorales. En numerosas ocasiones la molécula directora elegida es un anticuerpo monoclonal, y en el caso que se ocupa esta Tesis, es un anticuerpo de cadena sencilla (ScFv) dirigido frente a receptores HER2, que se sobre-expresan en diferentes tumores como algunos tipos de cáncer de mama y de pulmón [146, 195].

En adición a la molécula directora es necesario disponer de una molécula que sea responsable de la unión del agente terapéutico (fármaco) y del agente de visualización. Esto se puede lograr por diversas estrategias, que en general implican la modificación covalente del anticuerpo director a distintas moléculas implicadas en el transporte de fármacos y la visualización. Esto constituye una de las etapas limitantes del proceso, ya que en función de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo será necesario utilizar diferentes estrategias de conjugación que tendrán que ser individualizadas. Esta optimización no es sólo necesaria para cada uno de los anticuerpos que se empleen sino también para las diferentes moléculas que se unan a los mismos, lo que hace el proceso especialmente complejo.

Para solventar los problemas expuestos en el párrafo anterior, proponemos una estrategia que permita el desarrollo de agentes terapéuticos modulares que puedan ser aplicados a diferentes dianas moleculares mediante el cambio de la secuencia codificante del anticuerpo director, pero que mantenga el resto de la estructura modular, de forma que la optimización para cada aplicación sea fácil. El sistema que proponemos tiene como núcleo central una proteína de fusión entre la proteína de unión a maltosa de *E. coli* (MBP) y un anticuerpo de cadena sencilla. Como prueba de

concepto, el anticuerpo ScFv utilizado está dirigido frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 o receptor HER2) (**Figura 5.1**).

Mientras que ScFv-HER2 actuará como la molécula directora, MBP tiene una doble función. Por una parte permitir el desarrollo de un sistema de expresión heterólogo en bacterias del ScFv, debido a la capacidad de la MBP de facilitar la expresión de proteínas recombinantes incrementando sus niveles de expresión y solubilidad. En segundo lugar, la MBP aprovechando la afinidad que presenta por maltosa y derivados maltosilados permitirá la unión de distintas moléculas que serán las responsables del transporte de fármacos, la transfección génica y la visualización.

Los derivados maltosilados, sintetizados por el grupo de investigación del Profesor Francisco Santoyo González (Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada), que se utilizarán son:

1. NIR-Mal: Contiene una molécula de maltosa unida covalentemente a un colorante que emite fluorescencia en el infrarrojo cercano derivado de heptametina de cianina (NIR), con la finalidad de permitir la detección *in vivo* e *in vitro* de células con receptores para HER2 (HER2+).
2. β CD-PEI-Mal: Maltosa unida a bPEI2kDa unido a cuatro β -Ciclodextrinas (β CD) en las que se pueden ocluir diferentes agentes terapéuticos, de manera que permitan el transporte selectivo del fármaco antineoplásico a células HER2+ *in vivo* e *in vitro*. Como fármaco modelo a ocluir se ha seleccionado la Doxorubicina (DOX).
3. bPEI25k-Mal: bPEI25kDa unido a cinco moléculas de Maltosa, para su uso *in vivo* e *in vitro* como agente de transfección.

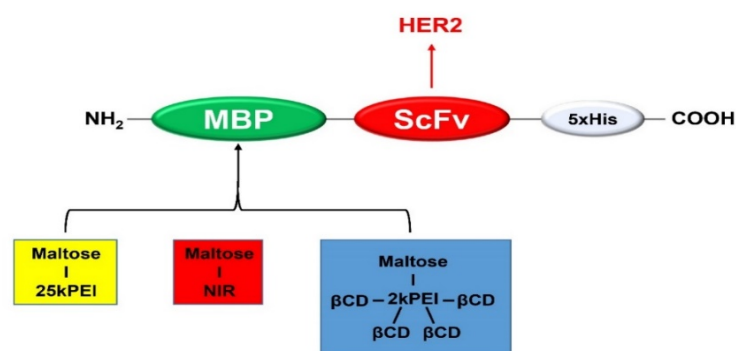


Figura 5.1 Esquema de la proteína recombinante MBP-ScFv_{HER2}. La proteína de fusión recombinante contiene la secuencia codificante de la MBP, una región flexible que contiene la secuencia de escisión proteolítica de la proteasa TEV, un anticuerpo de cadena sencilla frente a HER2 (ScFv) y una cola de poli histidina para su purificación. Los diferentes ligandos conteniendo maltosa se unirán al centro activo de la MBP.

La proteína de fusión propuesta contiene en su estructura dos regiones de interés adicionales. Así, entre los dominios MBP y ScFv se ha dispuesto un *linker* flexible en el que además se ha incluido una secuencia de reconocimiento por la proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus Protease*). Esto permite, si es necesario el procesamiento proteolítico de la proteína de fusión. En segundo lugar se ha incluido en el extremo carboxilo de la proteína de fusión una cola de poli histidina para disponer de un mecanismo alternativo de purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*).

5.2 Optimización mediante mutagénesis dirigida de la proteína de unión a maltosa

Dentro de la estrategia que hemos presentado en el apartado anterior, la MBP tiene un papel central ya que va a ser responsable de la unión de los diferentes ligandos maltosilados que posibiliten la teragnosis. Se han descrito diferentes proteínas capaces de unir ligandos con una elevada afinidad. Dentro de ellas, la avidina o la estreptavidina tienen una posición destacada, ya que presentan una muy elevada afinidad por la biotina. No obstante, estas proteínas presentan diferentes problemas. Por una parte, tienen una limitada solubilidad, lo que dificulta su expresión recombinante. Por otra parte se trata de proteínas tetaméricas, lo que puede presentar problemas de multivalencia. Aunque se han diseñado sistemas de expresión de avidina monomérica, su solubilidad también es limitada. Por otra parte, la elevada afinidad de la avidina por la biotina presenta un problema adicional que es la dificultad de liberación del ligando en el interior celular, limitando en parte la capacidad de transporte de estas proteínas.

La MBP es una proteína monomérica que además presenta una muy elevada solubilidad. Además actúa como una chaperona facilitando el correcto plegamiento de las proteínas fusionadas a ella. Mediante sistemas de expresión heteróloga en bacterias permite niveles de expresión elevados de las proteínas de fusión. Estas propiedades la hacen un buen candidato para el desarrollo de nuestro sistema teragnóstico.

Por el contrario, la MBP presenta una afinidad moderada por la maltosa. Aunque presenta una baja capacidad de liberación de los maltósidos unidos a ella (una baja K_{off}), un aumento en la afinidad de unión a la maltosa incrementaría la utilidad de la proteína para el desarrollo de nuestro sistema teragnóstico. El aumento de la afinidad entre proteína y ligando reduce las posibilidades de romper el complejo, mejorando así su eficacia. Con esta mejora será mayor la probabilidad de que se mantenga la integridad estructural del complejo en momentos críticos, como por ejemplo en el torrente sanguíneo cuando se administra in vivo.

Se han descrito diferentes mutaciones en la MBP que son capaces de incrementar su afinidad por la maltosa. La mayoría de estas mutaciones se localizan en la región de bisagra, que constituye el centro de unión a ligandos de la proteína (**Figura 5.2**). Una de las mutaciones descritas, sustituye la Isoleucina del residuo 330 por un triptófano (I330W) [196]. Esta sustitución por un residuo de mayor volumen desestabiliza la forma abierta desplazando el equilibrio a cerrado, al mismo tiempo que disminuye la entalpía libre de formación. Si comparamos el nuevo residuo en la conformación abierta y cerrada, descubrimos que se encuentra expuesto al solvente en el estado abierto y empaquetado en conformación cerrada [197]. De esta manera, al desplazar el equilibrio hacia la forma cerrada, se incrementa la afinidad de la proteína mutada por la maltosa. Empleando una estrategia similar y basándonos en la estructura tridimensional de la proteína, hemos encontrado otra posición equivalente, Ile334, que es predecible que también pudiera afectar al equilibrio abierto-cerrado en la MBP y por ende a la afinidad de unión por la maltosa.

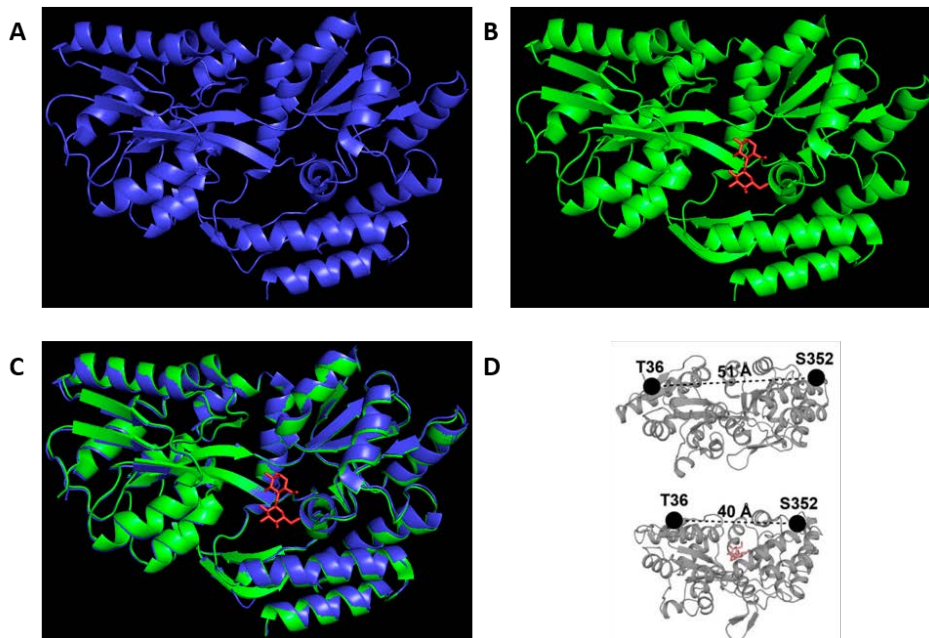


Figura 5.2 Representación de la unión de la maltosa a la proteína MBP en PyMol. **A** Configuración abierta. **B** Configuración cerrada, maltosa en rojo. **C** Superposición de ambas estructuras. **D** Representación esquemática del cambio conformacional resultante [198]. Las configuraciones abiertas y cerradas se renderizaron en PyMol [199].

A partir de la estructura tridimensional de la secuencia silvestre de la proteína de unión a maltosa (MBP_{wt}) depositada en el *Protein Data Bank*, tanto de las conformaciones abierta (1JW4) como cerrada (1JW5) de la proteína; es posible llevar a cabo una modelización y un estudio de la influencia que las posiciones Ile330 e Ile334 tienen en la estructura de la proteína. Para ello se ha utilizado un programa de modelización, denominado *Dynamut* [200], que permite el cálculo del efecto de mutaciones puntuales sobre la estructura de la proteína de partida. Los resultados de esta modelización sobre las conformaciones abierta y cerrada de la MBP_{wt} se muestran en las **Figuras 5.3 y 5.4**.

5.2.1 Optimización de la Proteína de unión a Maltosa empleando mutagénesis dirigida para aumentar la afinidad

Se postularon varias mutaciones en la MBP de tipo silvestre con la finalidad de sustituir un residuo por otro de mayor volumen. De esta forma se pretende desplazar el equilibrio de abierto hacia cerrado, disminuyendo la entalpía libre de formación. Gracias a los datos obtenidos de la cristalización de la MBP tanto en su configuración abierta (**Figura 5.3**) como cerrada (**Figura 5.4**), se puede observar la influencia de las mutaciones en ambas conformaciones.

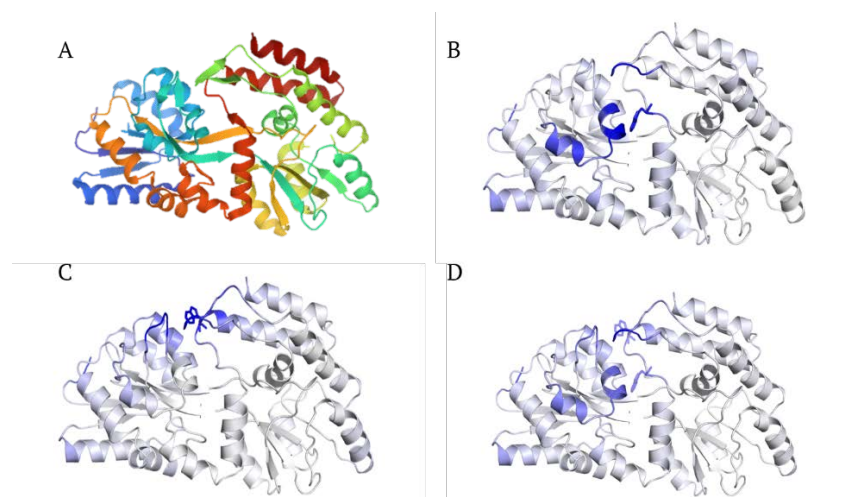


Figura 5.3 Configuración abierta de la proteína de unión a Maltosa. Imágenes y datos obtenidos a partir de la estructura 1JW4 (*Protein Data Bank*) y la modelización realizada mediante el programa *Dynamut* de la Universidad de Melbourne [200]. **A** Representación de la proteína de unión a Maltosa silvestre, **B** mutación de la I330W, **C** mutación de I334W, y **D** doble mutación I330W y I334W. Las zonas en azul en los mutantes **B**, **C** y **D** corresponden a un aumento de la rigidez de enlace.

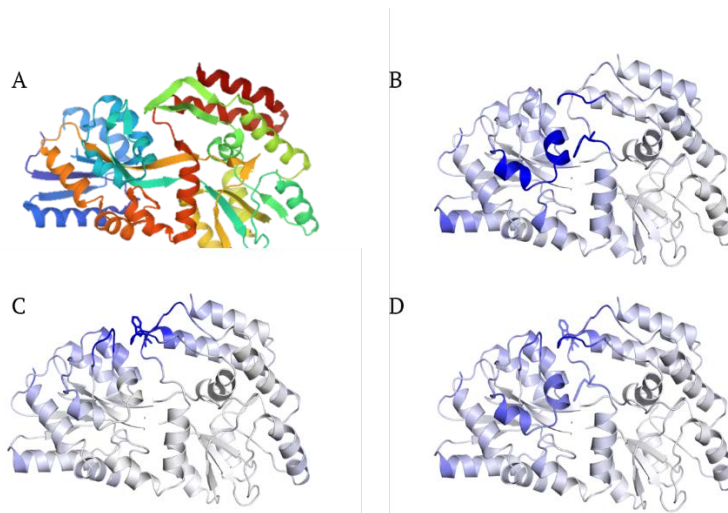


Figura 5.4 Configuración cerrada de la proteína de unión a Maltosa. Imágenes y datos obtenidos a partir de la estructura 1JW5 (*Protein Databank*) y la modelización realizada mediante el programa *Dynamut* de la Universidad de Melbourne [200]. **A** Representación de la proteína de unión a Maltosa silvestre, **B** mutación de la I330W, **C** mutación de I334W, y **D** doble mutación I330W y I334W. Las zonas en azul en los mutantes **B**, **C** y **D** corresponden a un aumento de la rigidez de enlace.

La modelización de estas mutaciones ofrece los siguientes datos:

- Una mutación en el residuo 330 sustituyendo una isoleucina por un triptófano (MBP_{I330W}). provoca un incremento en la estabilidad de la proteína con una variación de la energía libre de Gibbs $\Delta\Delta G=1,218$ kcal/mol, que aumenta hasta $\Delta\Delta G=1,666$ kcal/mol en la configuración cerrada.
- Una mutación en el residuo 334 sustituyendo una isoleucina por un triptófano (MBP_{I334W}). provoca un incremento en la estabilidad de la proteína con una variación de la energía libre de Gibbs $\Delta\Delta G=1,811$ kcal/mol, que aumenta hasta $\Delta\Delta G=1,005$ kcal/mol en la configuración cerrada.
- Una doble mutación que comprende las dos anteriores ($MBP_{I330W-I334W}$) provoca un incremento en la estabilidad de la proteína con una variación de la energía libre de Gibbs $\Delta\Delta G=1,218$ kcal/mol y $\Delta\Delta G=1,811$ kcal/mol, que aumenta hasta $\Delta\Delta G=1,666$ kcal/mol y $\Delta\Delta G=1,005$ kcal/mol en la configuración cerrada.

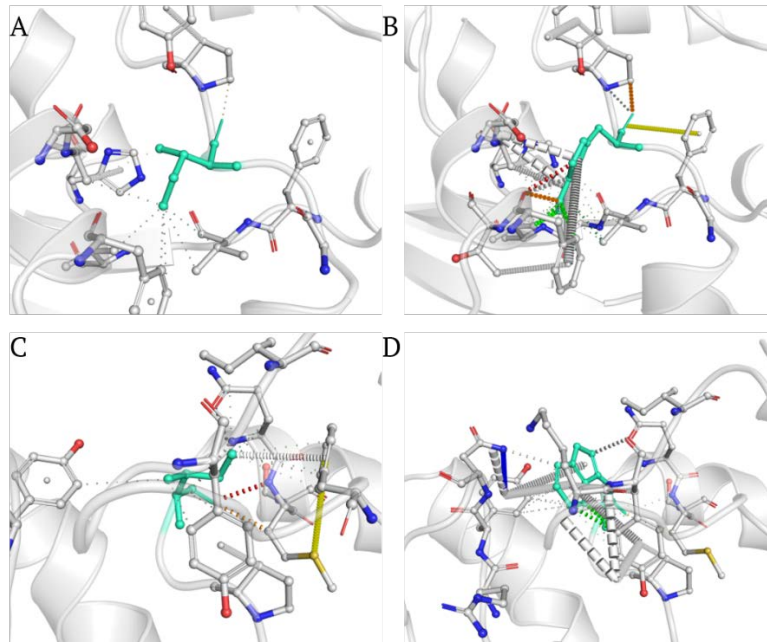


Figura 5.5 Modelo predictivo de las interacciones moleculares antes y después de insertar las mutaciones en la proteína de unión a Maltosa en la configuración abierta. **A** Isoleucina en la posición 330, **B** Triptófano mutado en la posición 330, **C** Isoleucina en la posición 334, y **D** Triptófano mutado en la posición 334. Se modelizaron mediante el programa *Dynamut* de la Universidad de Melbourne [200]. En rojo se representan puentes de hidrógeno, en azul enlaces de halógeno, en verde oscuro interacciones hidrofóbicas, en amarillo interacciones iónicas, y en verde claro el residuo a mutar/mutado.

Un análisis detallado de las posibles interacciones que se establecen entre los restos mutados de las proteínas y el resto de la estructura se muestran en las **Figuras 5.4 y 5.5**. Se puede observar en el modelo predictivo de la configuración abierta, un aumento de las interacciones moleculares al sustituir la isoleucina (**Figura 5.5 A y C**), fortaleciendo los enlaces en la zona como predice la imagen (**Figura 5.5 B y D**). Estas interacciones aumentan aún más en los modelos predictivos de la configuración cerrada. Se producen un aumento de las interacciones iónicas tanto en la posición Ile330 como la Ile334 (**Figura 5.6 B y D**) en comparación con la conformación cerrada de la MBP_{wt}. Por tanto, ambas mutaciones, tanto por separado como juntas, aumentan la estabilidad y la rigidez de la proteína al mismo tiempo que deberían favorecer un incremento de la afinidad de la MBP por la maltosa.

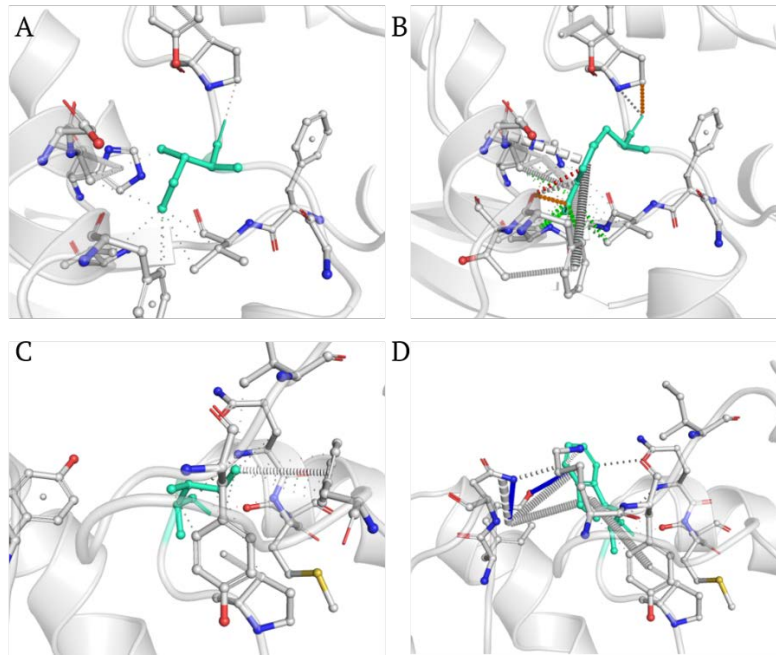


Figura 5.6 Modelo predictivo de las interacciones moleculares antes y después de insertar las mutaciones en la proteína de unión a Maltosa en la configuración cerrada. **A** Isoleucina en la posición 330, **B** Triptófano mutado en la posición 330, **C** Isoleucina en la posición 334, y **D** Triptófano mutado en la posición 334. Se modelizaron mediante el programa *Dynamut* de la Universidad de Melbourne [200]. En rojo se representan puentes de hidrógeno, en azul enlaces de halógeno, en verde oscuro interacciones hidrofóbicas, en verde claro el aminoácido a mutar/mutado y en amarillo interacciones iónicas.

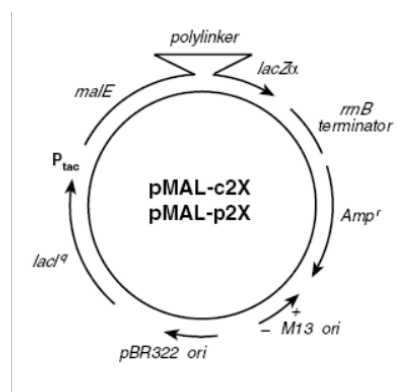
5.2.1.1 Expresión y análisis de los mutantes de la proteína de unión a maltosa

De los datos de modelización de la MBP, las posiciones Ile330 e Ile334 resultan atractivas para la introducción de mutaciones que incrementen la afinidad de unión a la maltosa. En ambos casos, la sustitución por aminoácidos voluminosos como el triptófano, debería producir un incremento en la afinidad. Para confirmar esta hipótesis es necesario en primer lugar disponer de un sistema de expresión de la MBP y en segundo lugar introducir las mutaciones propuestas:

- Una sustitución de una isoleucina por un triptófano en la región 330 (I330W).
- Una sustitución de una isoleucina por un triptófano en la región 334 (I334W).
- Una doble mutación recogiendo ambas mutaciones anteriores (I330W-I334W).

Para la producción y purificación de la MBP, es necesario disponer de un sistema de expresión de la misma. Se ha diseñado un sistema de expresión homólogo en bacterias, de tal manera que la purificación de la proteína expresada no se realiza mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de amilosa sino mediante cromatografía IMAC, al incluirse en el extremo carboxilo de la proteína expresada una cola poli-His. De esta manera se mantiene el sitio de unión a ligandos de la MBP libre y es posible realizar sin interferencias (la proteína tiene una baja K_{off}) el estudio de su capacidad de unión a maltosa.

Para conseguir expresar esta proteína, se ha diseñado un vector de expresión en bacterias, partiendo de un vector comercial pMAL-C2x (New England Biolabs) diseñado para generar proteínas de fusión, que codifica para la MBP, y en el que se ha sustituido el sitio de corte para el factor Xa por un sitio de corte para la proteasa TEV, y se ha adicionado la secuencia codificante para una cola de poli histidina seguida de una señal de parada de la traducción. El plásmido resultante se ha denominado pMAL-TEV-His y se ha utilizado para la expresión recombinante de la MBP silvestre así como punto de partida para la obtención por mutagénesis dirigida de los mutantes de la misma (**Figura 5.7**).



pMAL-C2-TEV-His

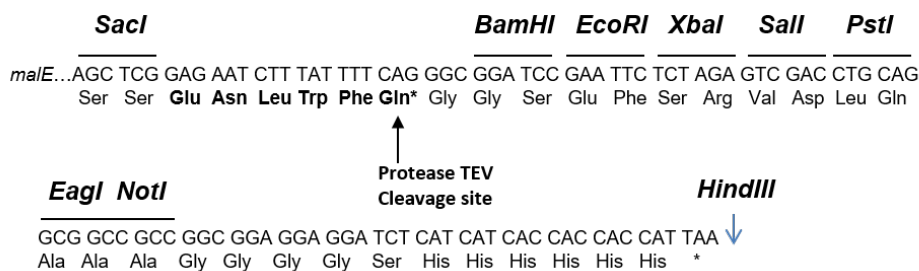


Figura 5.7 Fragmento de la secuencia del plásmido pMal-TEV-His correspondiente al final de la región codificante para la MBP, el sitio de procesamiento de la proteasa TEV, el polilinker y la cola de poli-His.

La mutagénesis dirigida se ha realizado mediante la técnica denominada *Quick Change* (tal y como se describe en la sección de materiales y métodos) utilizando oligonucleótidos que introducen las mutaciones deseadas junto con mutaciones silenciosas que permiten modificar sitios de restricción del plásmido y, por tanto, realizar un análisis rápido de las mutaciones mediante digestión con los enzimas apropiados. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se encuentra en la sección de materiales y métodos. En todos los casos la presencia de las mutaciones se ha confirmado mediante secuenciación automática.

Una vez obtenidas las construcciones que codifican para la MBP_{wt} y los diferentes mutantes propuestos, el primer paso ha sido estudiar el efecto que las diferentes mutaciones ejercen sobre los niveles de expresión y la solubilidad de la MBP. Para ello, bacterias competentes Rosetta-gami B (DE3) fueron transformadas con los correspondientes plásmidos. Se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE los niveles de expresión tras la inducción en lisados celulares (fracción total), así como en la fracción soluble tras una centrifugación de los extractos (**Figura 5.8**).

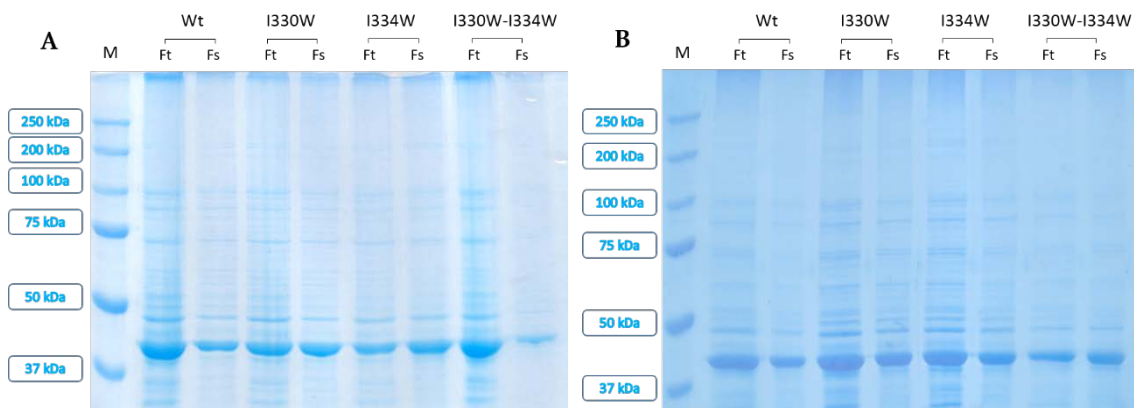


Figura 5.8 Expresión recombinante de la MBP_{wt} y MBPs mutadas en bacterias crecidas **A** 30°C o **B** 37°C tras la inducción de la síntesis de proteína con IPTG. M, Marcador de tamaño; Ft, Fracción total; Fs, Fracción soluble.

A 37°C se observa que mientras que los niveles de expresión en la fracción total para todos los mutantes es elevada, en la fracción soluble se produce claramente una disminución de la cantidad de proteína soluble para el mutante MBP_{I330W-I334W}. Por el contrario, cuando la inducción se produce a una temperatura de 30°C, los niveles de expresión soluble se incrementan de una manera apreciable para todos los mutantes ensayados. Se seleccionó 30°C para la inducción de proteínas recombinantes basados en estos vectores. Además, y tal y como se muestra en la **Figura 5.9**, utilizando un protocolo de purificación basado en una columna IMAC (descrito en la sección de Materiales y Métodos) es posible la purificación de todas las proteínas recombinantes ensayadas. Tras la electroforesis se observa una única banda que presenta el peso molecular esperado, por lo que estas muestras se han considerado idóneas para caracterizar su capacidad de unión a maltosa.

Se han realizado dos tipos de determinaciones, una mediante fluorescencia utilizando un NIR maltosilado, y una segunda determinación mediante ensayos de estabilidad térmica de la proteína (*Thermal Scan Shift Assay*).

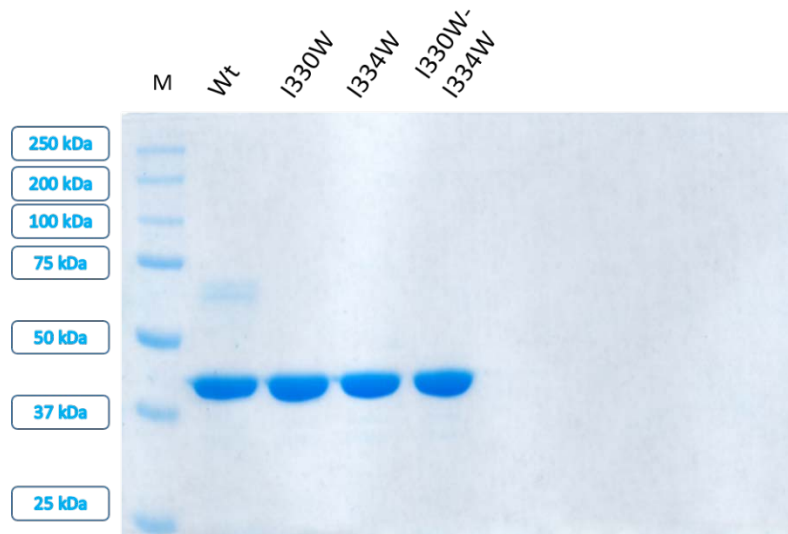


Figura 5.9 Expresión de las proteínas recombinantes purificadas a partir de los extractos crudos. MWM, MBP, MBP_{I330W}, MBP_{I334W}, MBP_{I330W-I334W}.

5.2.2 Análisis de la afinidad de la MBP y sus mutantes por la maltosa empleando Thermal Shift Scan Assay

El grupo de investigación del Profesor Santoyo ha sintetizado a partir de un derivado NIR, IR-783, una molécula fluorescente que incorpora una molécula de maltosa. A esta molécula se le denomina NIR-Mal. Los fluoróforos con base de *heptamethine cyanine* tienen un marcado carácter hidrofóbico y por tanto, en medio acuoso tienden a apilarse formando agregados autoensamblados, este apilamiento provoca una disminución de la fluorescencia (*Quenching*). Por el contrario, si la molécula NIR-Mal se une a la MBP se provoca un desmontaje del apilamiento producido en el fluoróforo, aumentando la intensidad de la señal [201]. Este incremento de la fluorescencia puede ser usado para calcular la afinidad de la proteína por el ligando.

En primer lugar se incubó NIR-Mal en ausencia o presencia de cantidades fijas de MBP_{wt} y sus mutantes. La adición de la proteína al NIR-Mal es capaz de producir un incremento significativo en los espectros de emisión de fluorescencia (**Figura 5.10**). Además, la adición posterior de un exceso de maltosa es capaz de disminuir esta emisión de fluorescencia por desplazamiento del NIR-Mal del centro de unión de la proteína por la maltosa libre.

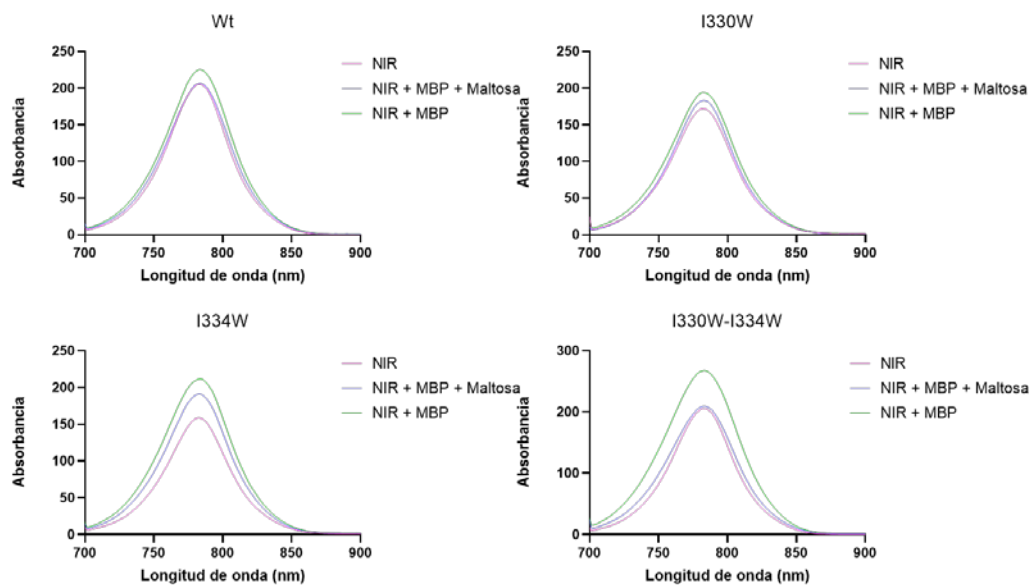


Figura 5.10 Espectro de fluorescencia de emisión de NIR-Mal unido a MBP y sus mutantes. En cada gráfica se observan espectros de emisión correspondientes al NIR-Mal sólo, unido a la MBP, o en presencia de maltosa. Los espectros se realizaron analizando 15 μM de NIR-Mal y 50 μM de Maltosa en 20 mM de Na-HEPES, 120 mM NaCl pH 7,4. La excitación se ajustó a 550 nm y se registraron con ventanas de banda de 2,5 nm. En las muestras en las que se analizó la fluorescencia en presencia de proteína se emplearon concentraciones de 10 μM de MBP.

Una vez determinado que la variación de fluorescencia del NIR-Mal en presencia de MBP podía constituir un método válido de ensayo de la afinidad de la MBP por la maltosa, se realizaron ensayos en los que a una cantidad fija de NIR-mal. Se adicionaron cantidades crecientes de proteína purificada y se determinó el incremento de la fluorescencia. A partir de estos datos fue posible calcular (**Figura 5.11**) las constantes de unión para la maltosa de cada uno de los mutantes ensayados.

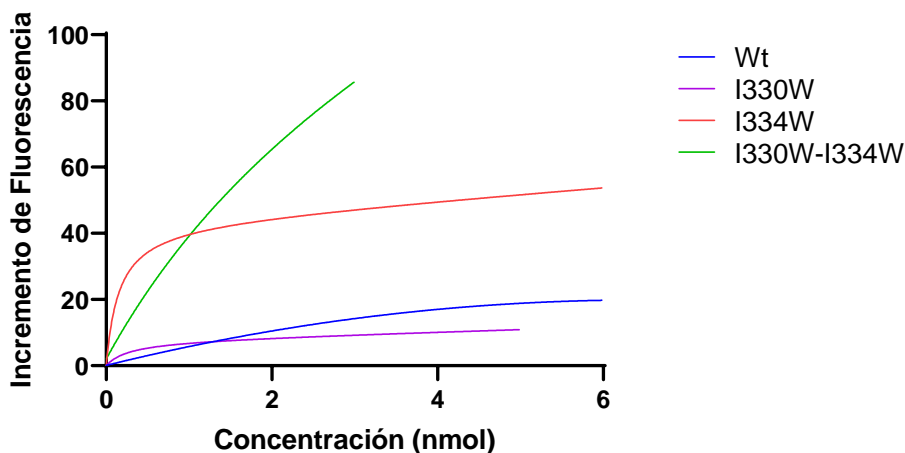


Figura 5.11 Determinación de la constante de afinidad de la MBP y sus mutaciones. Representación gráfica de las curvas de fluorescencia de la MBP_{wt} y sus mutaciones.

	MBP			
	WT	I330W	I334W	I330W-I334W
Bmax (nmol)	38,77 ± 6,22	13,06 ± 1,27	62,01 ± 2,153	206,00 ± 24,29
Kd (nM)	53,85 ± 15,16	7,79 ± 2,26	3,77 ± 0,48	42,59 ± 7,50

Tabla 5.1 Valores de la concentración de saturación (Bmax) y la constante de disociación (Kd) de la MBP de tipo silvestre y sus derivados.

De los valores de incremento de fluorescencia y tras calcular la constante de disociación **Kd** y concentración de saturación **Bmax** para cada uno de los mutantes, se observa que la mutación I334W es la que posee una Kd menor y que es del orden de 10 veces inferior a la del tipo silvestre. Puesto que el objetivo que se perseguía para el desarrollo de una plataforma teragnóstica basada en la MBP era el incremento de la afinidad, la mutación I334W ofrece en principio un resultado idóneo. Además y, tal y como se muestra en la **Figura 5.8**, la mutación I334W no afecta negativamente los niveles de expresión de la MBP_{I334W} o su solubilidad comparada con MBP_{wt}. Un último aspecto a destacar que justifica la elección de MBP_{I334W} es que además en este mutante (**Tabla 5.1**), el desplazamiento de NIR-Mal por maltosa libre es inferior (medido como disminución de la intensidad de fluorescencia), en comparación con los otros mutantes o el tipo silvestre. Esto es indicativo de una menor K_{off} , que también es uno de los objetivos perseguidos.

Un aspecto adicional de la unión de NIR-Mal a la MBP es su posible utilización como método de análisis de los niveles de expresión de proteínas de fusión basadas en MBP. Para demostrar su utilidad se ha realizado una electroforesis en poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (**Figura 5.12**). En ella se han separado muestras correspondientes a la MBP_{wt}, tras la incubación con NIR-Mal. En la **Figura 5.12 A** se muestra el contenido total de proteínas del gel (mediante una tinción mediante la técnica Stain-Free basada en la reacción del tricloroetanol con los triptófanos de las proteínas). En la **Figura 5.12 B** se muestra una imagen de fluorescencia en el espectro de emisión del infrarrojo cercano.

Puede observarse que es posible detectar en geles la presencia de la MBP, y que esta fluorescencia es proporcional a la cantidad de MBP presente en el gel. Esta técnica puede ser utilizada no sólo a partir de MBP purificada sino también en extractos celulares que contengan la proteína (datos no mostrados), lo que constituye un método rápido y sencillo de análisis de los niveles de expresión de proteínas recombinantes basadas en la MBP.

Necesitamos conocer primeramente si se produce la unión entre la MBP y el NIR-Mal. Se incubó durante 20 minutos NIR-Mal (2 mg/ml) con concentraciones decrecientes de MBP. Después se resolvieron en un gel de acrilamida para observar si la macromolécula emitía fluorescencia en el infrarrojo cercano.

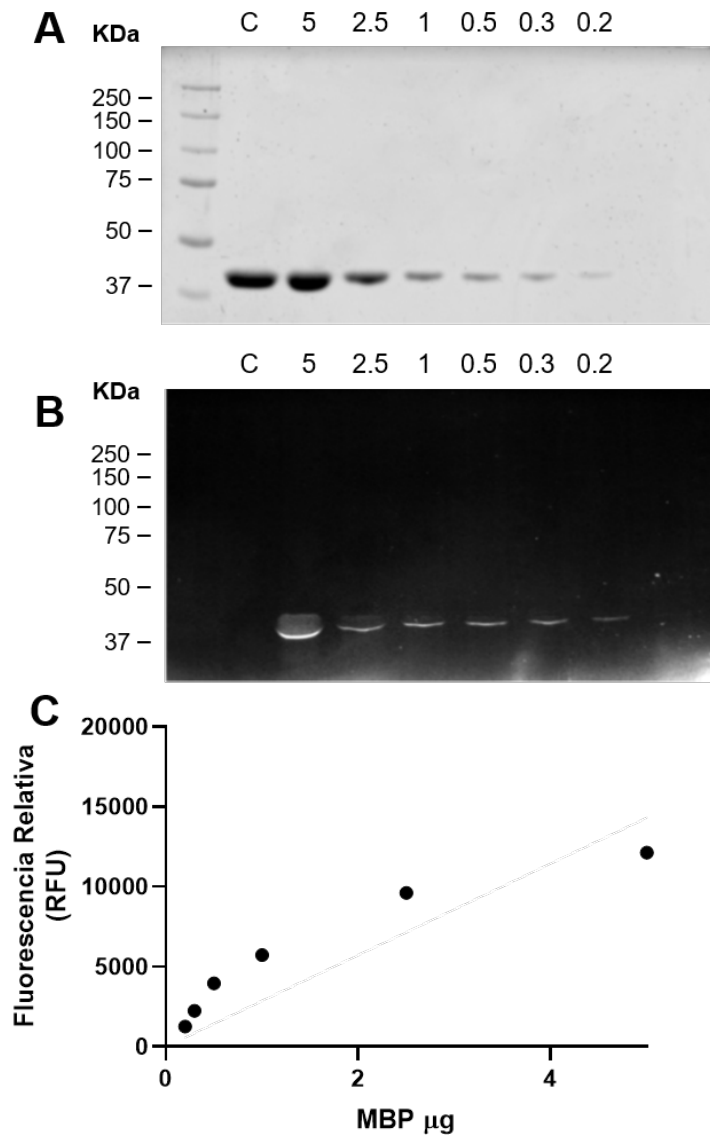


Figura 5.12 Ensayo de capacidad de unión de la MBP a NIR-Mal en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida. **A** Imagen *Stain-Free* de cantidades crecientes de MBP_{wt} (5-0.2 µg). **B** Imagen de la fluorescencia en el infrarrojo cercano. **C** Cuantificación de la emisión de NIR obtenida en la imagen B.

5.2.3 Análisis de la proteína de unión a Maltosa empleando *Thermal Shift Assay*

Las determinaciones realizadas para calcular la afinidad de los diferentes mutantes de la MBP por su ligando las hemos realizado utilizando la variación de la intensidad de fluorescencia, que se produce cuando se une un ligando modificado, NIR-Mal.

Aunque en principio esta determinación debe ser correcta, se basa en el uso no de maltosa sino de un derivado en el que el NIR podría ejercer alguna influencia sobre la capacidad de unión a la proteína. Por ello, hemos empleado un método alternativo que utiliza maltosa como ligando y que se basa en la técnica del *Thermal Shift Scan*.

Esta técnica permite la determinación de la estabilidad de una proteína frente a la desnaturalización por incremento de la temperatura. El incremento de la temperatura produce un desplegamiento de la proteína que expone hacia el exterior restos hidrofóbicos normalmente ocultos. Estos restos interactúan con el colorante SYPRO® Orange y se produce un incremento de la fluorescencia asociada a esta interacción. Incrementos adicionales de temperatura conducen a la disociación del colorante con los restos hidrofóbicos, originando un pico de desnaturalización que puede ser medido de manera precisa.

La unión de un ligando a la proteína se traduce en el establecimiento de interacciones adicionales, que conducen a la estabilización de la proteína y al incremento en temperatura del pico de desnaturalización obtenido. Midiendo estos incrementos de temperatura en función de cantidades crecientes de ligando se pueden determinar las constantes de unión de los ligandos a las proteínas.

Adicionalmente, esta técnica proporciona un dato de interés que es la temperatura de desnaturalización en ausencia de ligando. Esta temperatura va a ser reflejo de la estabilidad estructural de la proteína, y nos va a indicar si las mutaciones introducidas en ella pueden tener algún efecto negativo sobre la misma.

En primer lugar se determinaron las temperaturas de desnaturalización de cada una de las proteínas mutadas en ausencia de la Maltosa, y se compararon con la proteína de tipo silvestre (**Figura 5.13**).

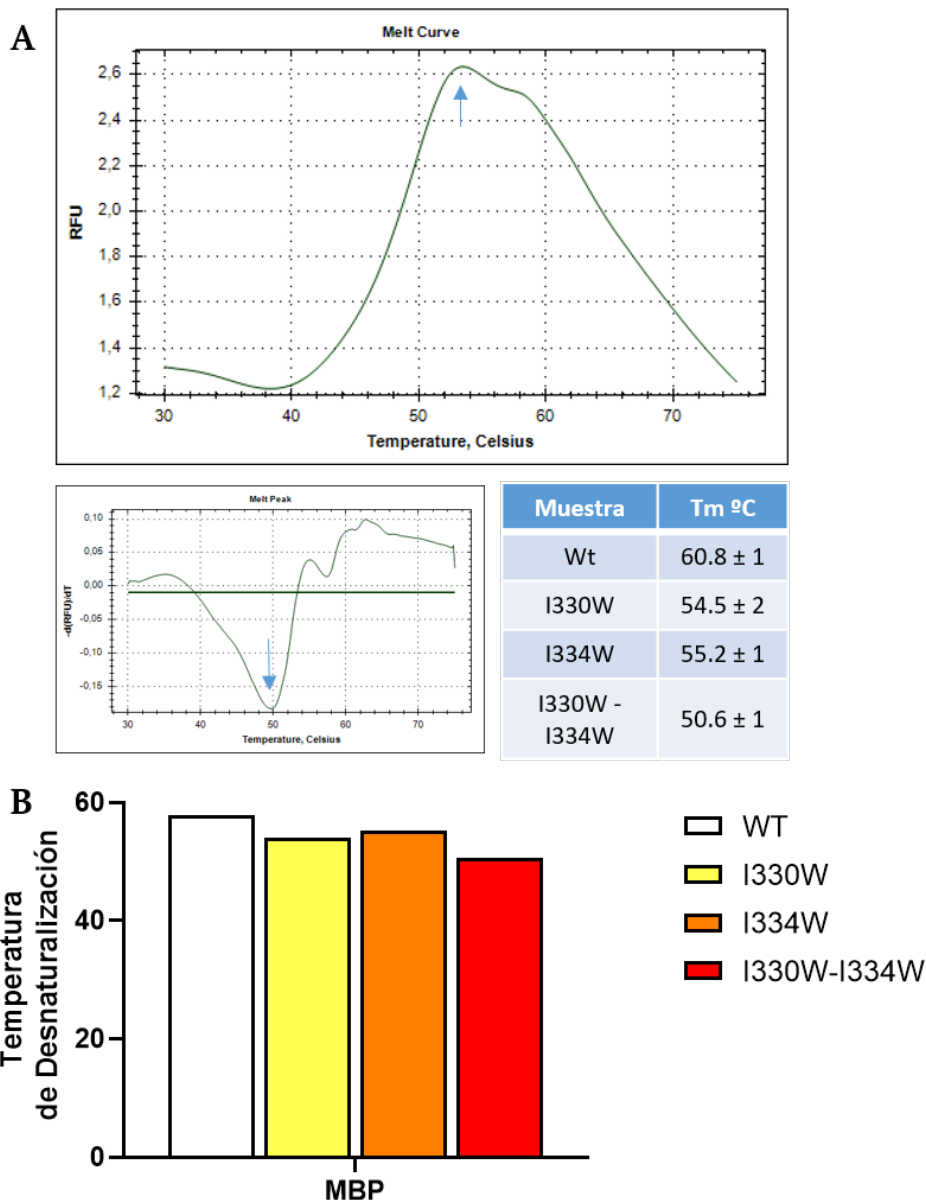


Figura 5.13 Valores de termoestabilidad base de la proteína MBP, y los mutantes seleccionados para su estudio. **A** Representación gráfica de la curva de desnaturalización de la MBP_{wt} y la temperatura media de desnaturalización de la proteína MBP y sus mutaciones. **B** Comparación en gráfica de la temperatura media de desnaturalización de la proteína MBP y sus mutaciones.

De los datos de la **Figura 5.13**, se deduce que las mutaciones a priori no suponen una mejora de la termoestabilidad, en ausencia de ligandos. Esta disminución de estabilidad es pequeña en el caso de las mutaciones I330W y I334W por separado, pero es significativamente más importante en el caso del doble mutante. Por tanto, de nuevo a partir de estos datos, la doble mutación queda descartada para un posterior uso.

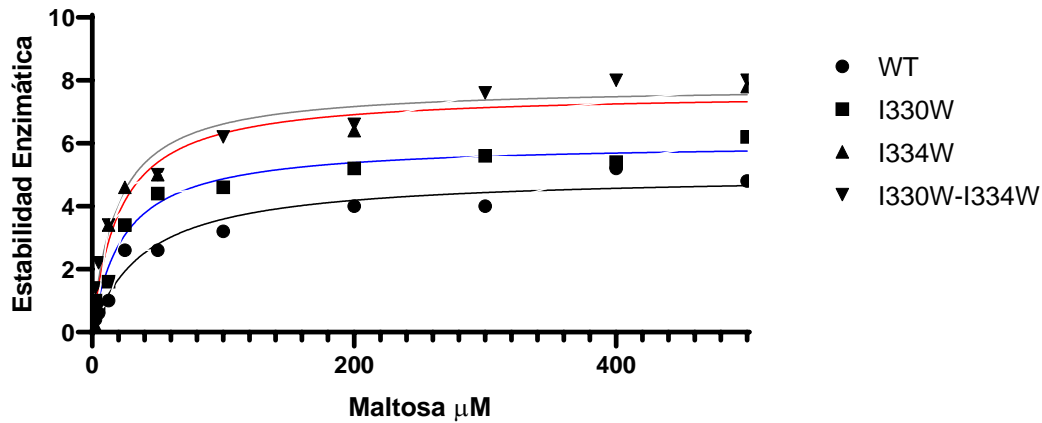


Figura 5.14 Incremento de termoestabilidad entre la MBP y los mutantes de estudio a concentraciones crecientes de Maltosa.

	MBP			
	WT	I330W	I334W	I330W-I334W
Bmax (μmol)	4.992	3.309	3.382	6.232
Kd (μM)	22.61	10.18	11.35	3.963

Tabla 5.2 Constantes de disociación del equilibrio (Kd) y concentración de saturación (Bmax), de la proteína silvestre, la proteína de fusión y sus respectivos mutantes.

A continuación se analizó mediante la adición de concentraciones crecientes de maltosa la afinidad de los diferentes mutantes de la MBP por la maltosa. Los datos obtenidos se muestran en la **Figura 5.14**. En ella puede observarse de nuevo que las mutaciones I330W e I334W producen un incremento en la afinidad de la proteína por la maltosa. La mutación I334W presenta una mayor estabilidad térmica, una mayor solubilidad y niveles de expresión. La mutación I334W presenta un valor de K_{off} menor, por lo que fue seleccionada para ser empleada en nuestro sistema teragnóstico (**Tabla 5.2**).

5.3 Clonación y expresión heteróloga de la proteína de fusión MBP_{I334W}-TEV-ScFv_{HER2}-His

Una vez establecida la proteína MBP_{I334W} como punto de partida para la generación de nuestro sistema teragnóstico, se seleccionó la secuencia de un anticuerpo de cadena sencilla frente a HER2 como molécula directora. La secuencia de este anticuerpo está contenida en un plásmido para la expresión en células de insecto pACgp67B-HER2 (proporcionado por la profesora Judy Lieberman, Addgene plasmid # 10794) [183].

Puesto que se pretendía el desarrollo de un sistema de expresión heterólogo en bacterias; a partir de este plásmido se realizó una amplificación por PCR de la secuencia codificante de ScFv_{HER2}, incluyendo los sitios de restricción *Bam*HI y *Sal*I, y se subclonó manteniendo la pauta de lectura en el vector de expresión pMAL_{I334W}-TEV-His. La secuencia del plásmido resultante pMAL_{I334W}-TEV-ScFv_{HER2}-HIS, se secuenció para confirmar que el plásmido resultante contenía la secuencia correcta.

El plásmido pMAL_{I334W}-TEV-ScFv_{HER2}-His se transformó en cuatro cepas bacterianas de *E. coli* XL1-Blue, BL21(DE3), Novagen Rosetta™ 2(DE3) y Rosetta-gami B. Las cepas BL21(DE3) Novagen Rosetta y Rosetta-gami B se utilizan normalmente en la expresión heteróloga. El uso de la cepas Novagen Rosetta y Rosetta-gami B tienen la ventaja de permitir la expresión recombinante de proteínas que incluyan en su secuencia codificante codones raros y además, Rosetta-gami B expresa como chaperonas para facilitar el plegamiento de las proteínas recombinantes prolina isomerasa y disulfuro isomerasa, por lo que tras una prueba inicial esta cepa fue utilizada para la expresión recombinante. Los niveles de expresión tras la inducción de la expresión a 30°C se muestran en la **Figura 5.15**.

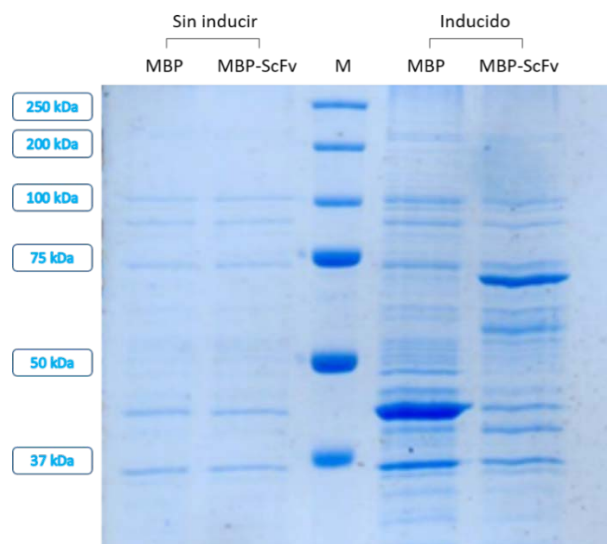


Figura 5.15 Expresión de las proteínas recombinantes MBP_{I334W} y MBP_{I334W}-ScFv_{HER2}-His antes y después de la inducción de la expresión a 30°C.

Para MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}-His se observan niveles de expresión adecuados de la proteína, que se localiza en la fracción soluble de los extractos bacterianos, y por tanto se estableció como punto de partida para la purificación.

Puesto que el uso de la proteína de fusión se seleccionó como etapa fundamental, empleamos la cromatografía de afinidad por metales inmovilizados de Níquel (Cromatografía IMAC) para purificar, aprovechando la presencia de la cola de poli His en nuestra proteína de fusión. Este método evita el uso de una cromatografía sobre amilosa utilizando la proteína MBP_{1334W}, garantizando que el sitio de unión a maltosa de esta proteína se encuentra libre para la unión de los diferentes ligandos maltosilados que se adicionarán posteriormente. Un último paso de purificación implica el uso de una cromatografía sobre una columna de heparina, para la eliminación de restos de ácidos nucleicos.

Utilizando este protocolo de purificación se ha obtenido una proteína recombinante soluble, libre de ácidos nucleicos y endonucleasas con un grado de purificación suficiente para permitir usos posteriores (**Figura 5.16**). Se ha obtenido un rendimiento aproximado por cada 500 mL de cultivo bacteriano de 0,5 mg de la proteína MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} purificada.

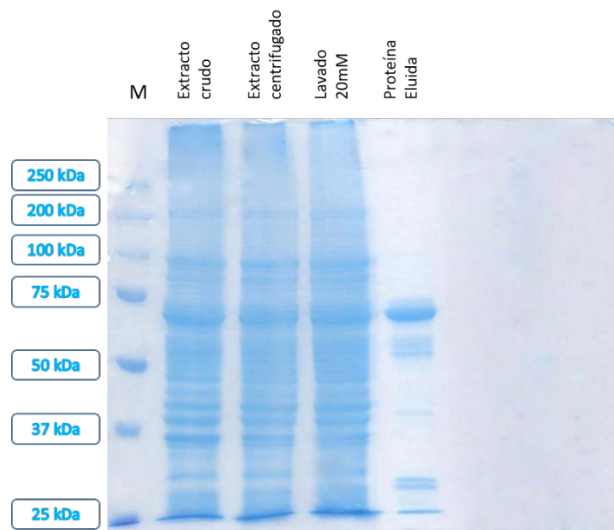


Figura 5.16 Composición extracto proteico de MBP-ScFv durante las etapas de purificación, el lavado de la proteína se realizó con 20 mM. La proteína, cercana a la región de 70 kDa se encuentra libre de contaminantes.

La proteína de fusión MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} tiene un sitio de corte para la proteasa TEV. Aunque el procesamiento proteolítico no es necesario en el sistema teragnóstico propuesto, se ensayó la capacidad de corte por esta proteasa. Esto, de manera indirecta sirve para confirmar que la proteína de fusión se pliega de manera correcta y que el *linker* que contiene la secuencia de procesamiento por la proteasa es accesible. La incubación con concentraciones crecientes de la proteasa TEV durante 20 minutos (**Figura 5.17**) produce dos fragmentos, una aproximado de 50 kDa (MBP_{I334W}) y otro más pequeño por encima de los 25 kDa (ScFv_{HER2}).

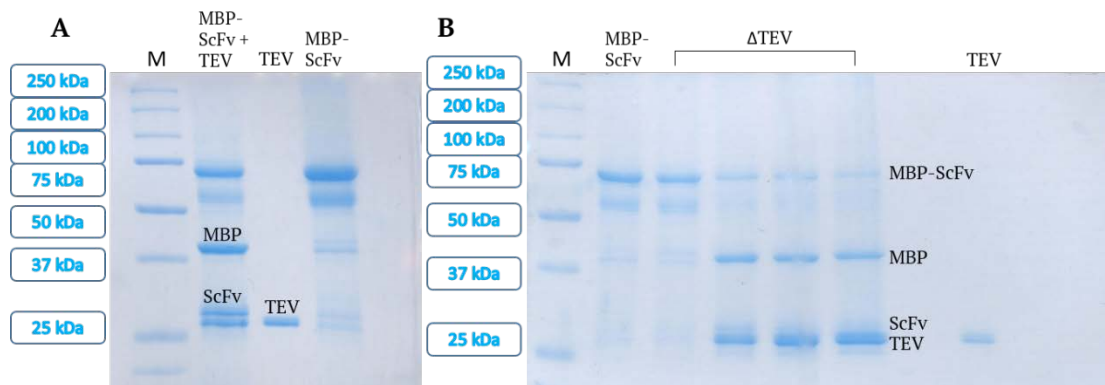


Figura 5.17 A Incubación de la proteína MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} con la proteasa TEV. A continuación del marcador tenemos la proteína incubada con la proteasa, la proteasa TEV sola y la proteína sin incubación. B Incubaciones crecientes (0-30-80-130 μ M) de TEV con la proteína MBP_{I334W}-ScFv_{HER2}. A medida que aumentamos la concentración aumenta la escisión.

5.3.1 Análisis de la funcionalidad de la proteína de fusión MBP_{I334W}-ScFv_{HER2}-His

Una vez expresada y purificada la proteína de fusión, se ensayó tanto su capacidad de unión a maltosa como de reconocimiento de epítomos en el receptor HER2. El mantenimiento de ambas capacidades es esencial en el desarrollo de nuestro sistema teragnóstico.

En primer lugar se ensayó la capacidad de unión a maltosa utilizando como ligando de la MBP_{I334W} el NIR-Mal. Como se observa en la **Figura 5.18**, la incubación con nuestra proteína de fusión produce un incremento significativo de la intensidad de emisión de fluorescencia, cosa que no se produce cuando se utiliza como proteína control BSA. Consideramos que se mantiene la capacidad de unión a ligandos maltosilados.

En segundo lugar se ha ensayado la capacidad del ScFv_{HER2} en la proteína de fusión de detectar HER2.

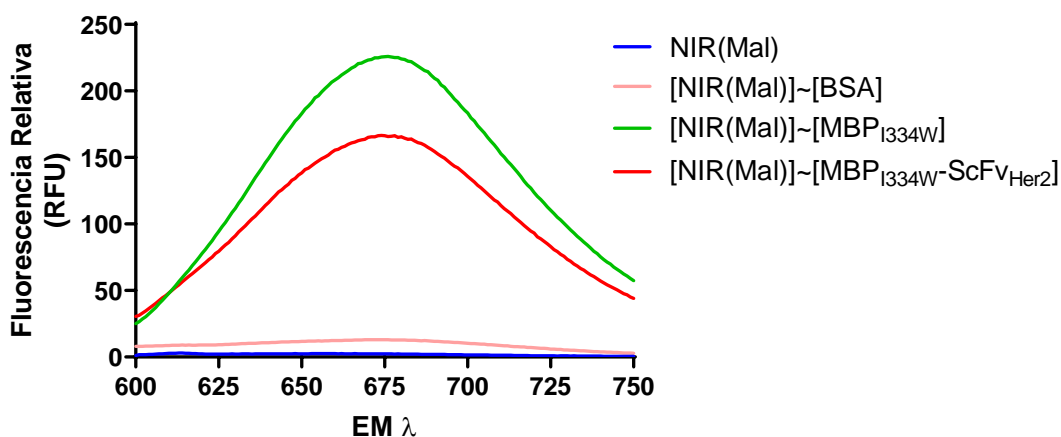


Figura 5.18 Desapilamiento del fluoróforo basado en cianuro (NIR) inducido por la unión de la Maltosa a la proteína de fusión. Los espectros se realizaron analizando 15 μM de NIR-Mal en 20 mM de Na-HEPES, 120 mM NaCl pH 7,4. La excitación se ajustó a 550 nm y se registraron con ventanas de banda de 2,5 nm. En las muestras en las que se analizó la fluorescencia en presencia de proteína se emplearon concentraciones de 10 μM de cada una (BSA, y MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}).

5.4 El complejo MBP-ScFv como sistema de diagnóstico de imagen

5.4.1 Ensayos *in vitro*

5.4.1.1 Uso de la proteína de fusión como anticuerpo anti-HER2

Una vez demostrada que la proteína de fusión MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} puede unir derivados de maltosa, a continuación se analizó la habilidad de la misma para reconocer el epítipo HER2. Para ello, la proteína de fusión y el Herceptin® (anticuerpo trastuzumab comercial frente a HER2, que se utilizó como referencia) se utilizaron como anticuerpos en un Western Blot, con el fin de distinguir entre células que expresan o no el receptor.

En primer lugar, se procedió al marcaje de estos anticuerpos covalentemente. Se incubaron Herceptin® y MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} con una etiqueta bifuncional que contiene biotina y fluoresceína unidos por un enlace vinil sulfona [202]. Esta molécula reacciona preferentemente, a través del grupo vinil sulfona, con las colas de histidinas (**Figura 5.19**), de manera que permite el marcaje de la proteína sin modificar el dominio ScFv. Esto se puede comprobar mediante el análisis por electroforesis en SDS-PAGE de la proteína marcada y digerida con la proteasa TEV.

La MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} marcada con Fluoresceína-Biotina se digirió con concentraciones crecientes de proteasa TEV, y el resultado de las digestiones se resolvió en una electroforesis SDS-PAGE (**Figura 5.19 A**). La calle 1 corresponde con la proteína sin digerir y las siguientes (2-5) con las muestras obtenidas tras la incubación de la proteasa TEV. Se observa que a medida que aumenta la concentración de proteasa, disminuye la banda correspondiente a la proteína de fusión de aproximadamente 70 kDa y aumentan las bandas correspondientes a la MBP (42.5 kDa) y ScFv (27.5 kDa). La calle 6 corresponde con la proteasa TEV. En la imagen de fluorescencia se observa que la proteína MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} está marcada con fluorescencia y que al añadir proteasa TEV va disminuyendo la fluorescencia de la proteína completa y que las bandas correspondientes a ScFv son más fluorescentes que las de MBP (**Figura 5.19 B**).

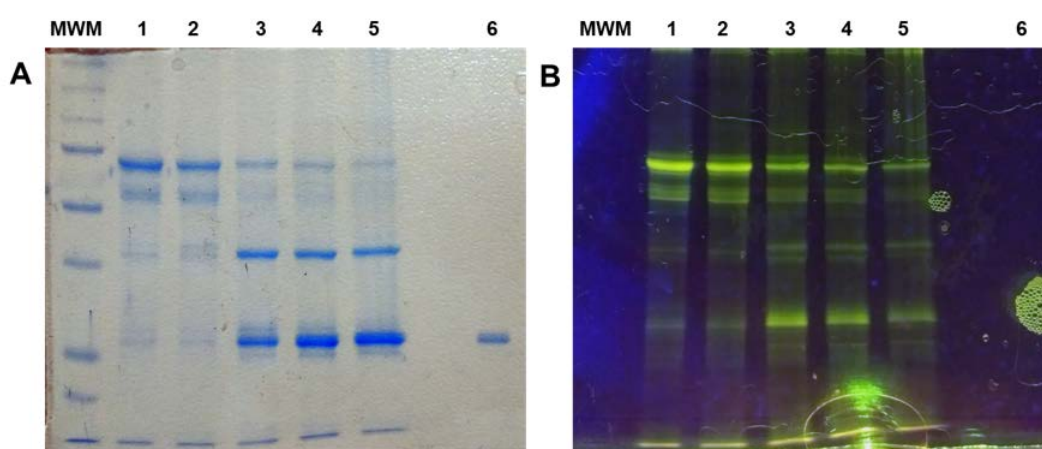


Figura 5.19 Electroforesis de la proteína MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} marcada con Fluoresceína-Biotina. La proteína de fusión se incubó con una etiqueta bifuncional y a continuación, se digirió con concentraciones crecientes de la proteasa TEV. **A** Imagen del gel de poliacrilamida teñido con Comassie Blue. **B** Imagen de Fluorescencia.

Las dos proteínas marcadas con fluoresceína-biotina se utilizaron como anticuerpos para la detección de células que expresan receptores HER2 mediante un Western Blot en el que se utilizaron extractos de células HER2+, las líneas celulares SKBR3 y MDA-HER2+, y HER2-, la línea celular MDA-MB-231.

Tal y como se ha indicado en la sección de Materiales y Métodos, las células MDA-HER2+ se han obtenido en nuestro laboratorio mediante infección de la línea MDA-MB-231 que es HER2-, con un vector retroviral que codifica para la expresión de HER2. Así se ha obtenido una línea celular isogénica, que sólo se diferencia de la parental en la expresión de este receptor de membrana. Esta línea así obtenida se ha utilizado como control positivo a lo largo de esta Tesis Doctoral.

Como se muestra en la **Figura 5.20**, tanto MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} como Herceptin® sólo reconocen los extractos de las células que sobre-expresan receptores HER2, mientras que no se detecta expresión de HER2 en los procedentes de las células MDA-MB-231. La expresión de HER2 fue mayor en las células MDA-HER2+ que en las SKBR3. Esta figura además confirma que las células MDA-MB-231 infectadas con el vector viral que codifica para HER2 y, que hemos denominado MDA-HER2+, realmente lo expresan.

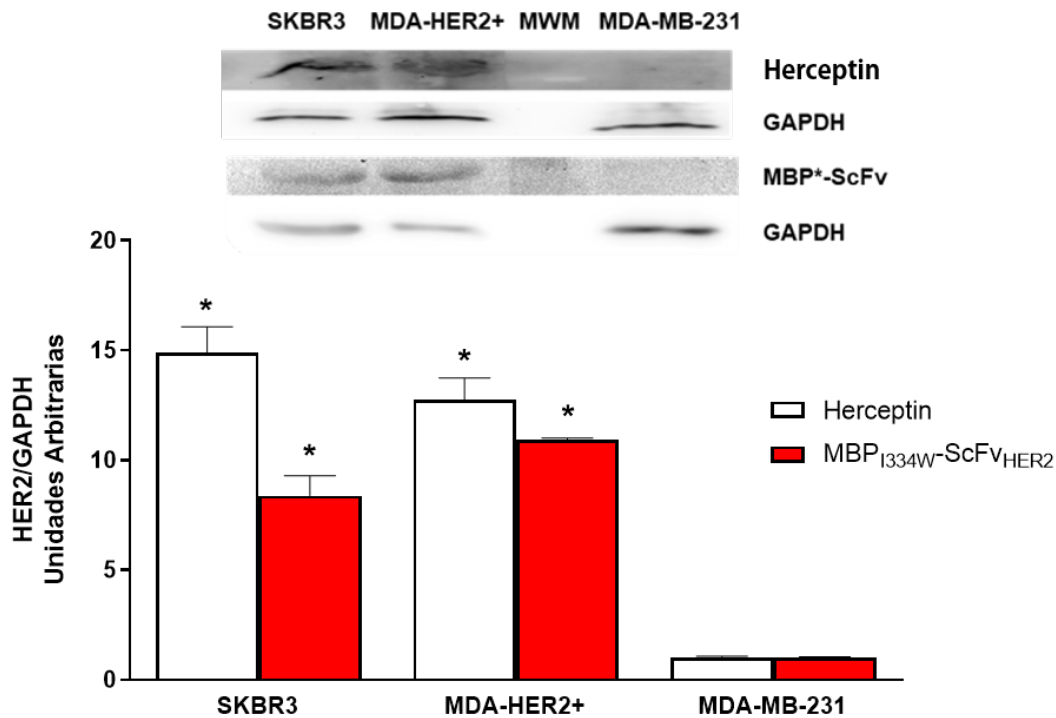


Figura 5.20 Expresión de HER2 en diferentes líneas celulares. Los niveles de HER2 se midieron mediante Western Blot usando Herceptin® o MBP-ScFv marcados con fluoresceína. Se muestra una imagen representativa, así como la cuantificación de la intensidad de las bandas detectadas. Los datos se muestran como medias \pm SEM (n = 4). * p < 0.05 vs la intensidad de expresión de HER2 en las células MDA-MB-231.

5.4.1.2 Uso del complejo MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} como agente de diagnóstico

La unión de la proteína de fusión MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} a un derivado de la Maltosa marcado con un fluoróforo NIR (NIR-Mal), es la base para el empleo como agente de diagnóstico para la detección de células receptor HER2+. Mientras que la emisión infrarroja del fluoróforo NIR puede ser detectada a través de tejidos y órganos, convirtiendo el complejo en un candidato a agente de diagnóstico, la presencia de maltosa garantiza la capacidad de unión a la proteína de fusión para general el agente de diagnóstico.

Detección por microscopía confocal de fluorescencia de células HER2+ utilizando MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} como ligando

Para comprobar la validez de esta aproximación, se ha realizado en primer lugar un experimento de microscopía confocal empleando dos fluoróforos. Se ha marcado la proteína MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} (empleada para los ensayos de expresión de HER2 por Western Blot) con fluoresceína (FL-MBP_{I334W}-ScFv_{HER2}) como control de detección de células HER2+. La fluorescencia del control se ha comparado con el segundo fluoróforo NIR-Mal-MBP_{I334W}-ScFv_{HER2}. Se han usado células que expresan (SKBR3) o no (MDA-MB-231) el receptor HER2.

En la **Figura 5.21** se muestran las células SKBR3 (**Figura 5.21 A**) y células MDA-MB-231 (**Figura 5.21 B**), incubadas con FL-MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} o NIR-Mal-MBP_{I334W}-ScFv_{HER2}. En las células SKBR3 utilizando ambas proteínas, la fluorescencia se localiza en la membrana plasmática, una localización compatible con la del receptor HER2. Por el contrario en las células HER2- se observa únicamente una fluorescencia difusa en todo el interior celular. Estos resultados confirman la posibilidad del uso de NIR-Mal-MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} como agente de diagnóstico específico para la detección de células que sobre-expresen receptores HER2.

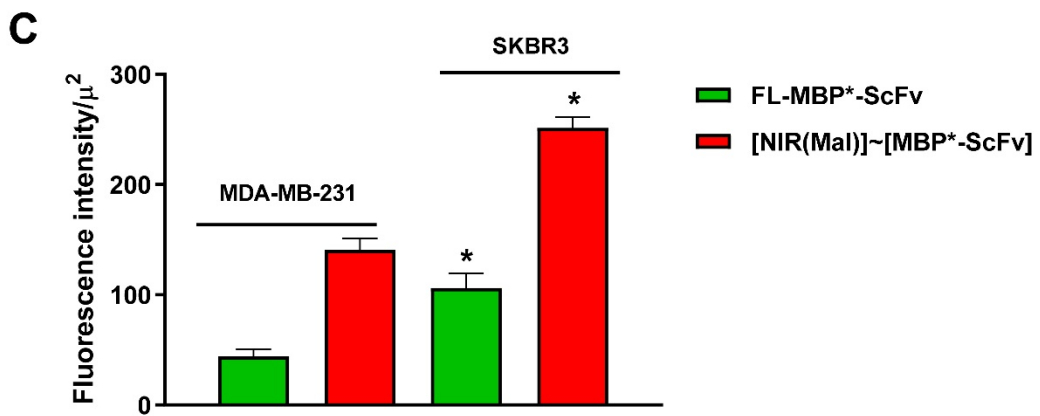
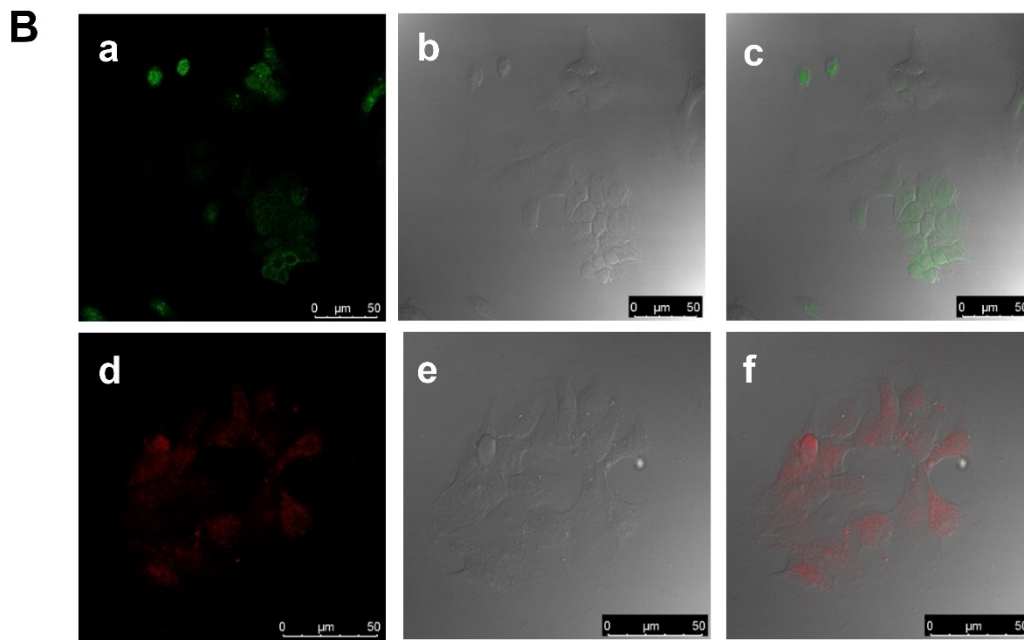
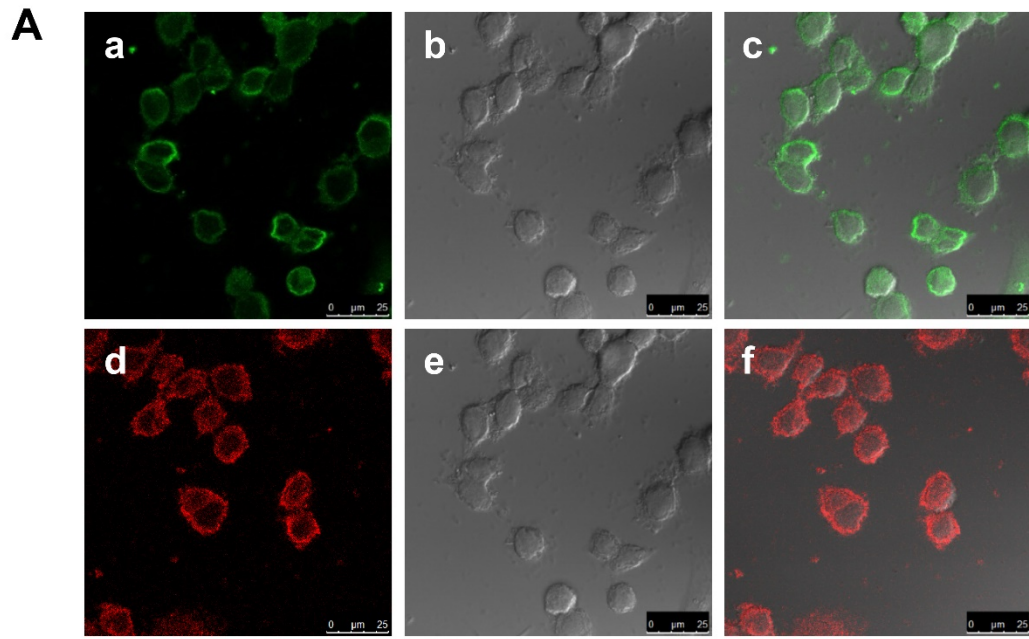


Figura 5.21 Imágenes de células que expresan el receptor HER2 o no utilizando la proteína MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} unida a fluoresceína o a NIR-Mal. Células SKBR3 (**A**) y MDA-MB-231 (**B**) se sembraron en cubreobjetos, 24 horas más tarde se fijaron y se incubaron con MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} marcada con FL (**a, b, c**) o con NIR-mal (**d, e, f**), se lavaron y se montaron para microscopía confocal de fluorescencia. Imágenes de fluorescencia (**a, d**), de contraste de interferencia diferencial (Nomarski) (**b, e**) y fusionadas (**c, f**). **C**: Promedio de la fluorescencia/ μm^2 asignada a cada tipo celular. Los datos se muestran como media \pm SEM (n = 10). * p < 0,05 frente a fluorescencia de las células MDA-MB-231.

5.4.2 Ensayos *in vivo*

Una vez demostrado el uso en cultivos celulares del complejo NIR-Mal-MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} para la detección de células HER2+, se analizó el uso de este complejo *in vivo* en modelos animales. Se emplearon ratones hembra inmunosuprimidos NSG, en los cuales se inocularon células SKBR3 en el pániculo adiposo de la mama, para obtener xenografts que expresaran el receptor HER2. Los tumores se hicieron visibles tras 3 o 4 semanas de la inoculación, y una vez que alcanzaron un tamaño de 4-6 mm, se procedió a la inyección del agente de diagnóstico (NIR-Mal-MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}) por vía intravenosa en la cola. Como control se inyectó una concentración equivalente de NIR-Mal. A las 24 horas, se analizó la fluorescencia de la sonda NIR-780 incluida en las nanopartículas. Los animales inyectados con NIR-Mal presentan la fluorescencia localizada mayoritariamente en el hígado y parcialmente en el tumor, tal y como había descrito nuestro grupo de investigación [203], indicando que el colorante NIR tienen afinidad por células tumorales.

No obstante, los ratones a los que se inyectó la proteína de fusión unida a NIR-Mal presentan una intensidad fluorescencia en los xenografts significativamente superior a la de los animales control (**Figura 5.22 A**). Estos resultados se confirmaron tras el sacrificio de los animales y aislamiento de los xenografts e hígado (en el que se localizaban lesiones metastásicas) (**Figura 5.22 C**). En los animales tratados NIR-Mal-MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}, la intensidad de fluorescencia fue significativamente mayor en los xenografts y metástasis de los animales, lo que confirma el uso de NIR-Mal-MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} como agente de diagnóstico *in vivo* hacia células que sobreexpresen HER2 (**Figura 5.22 B**).

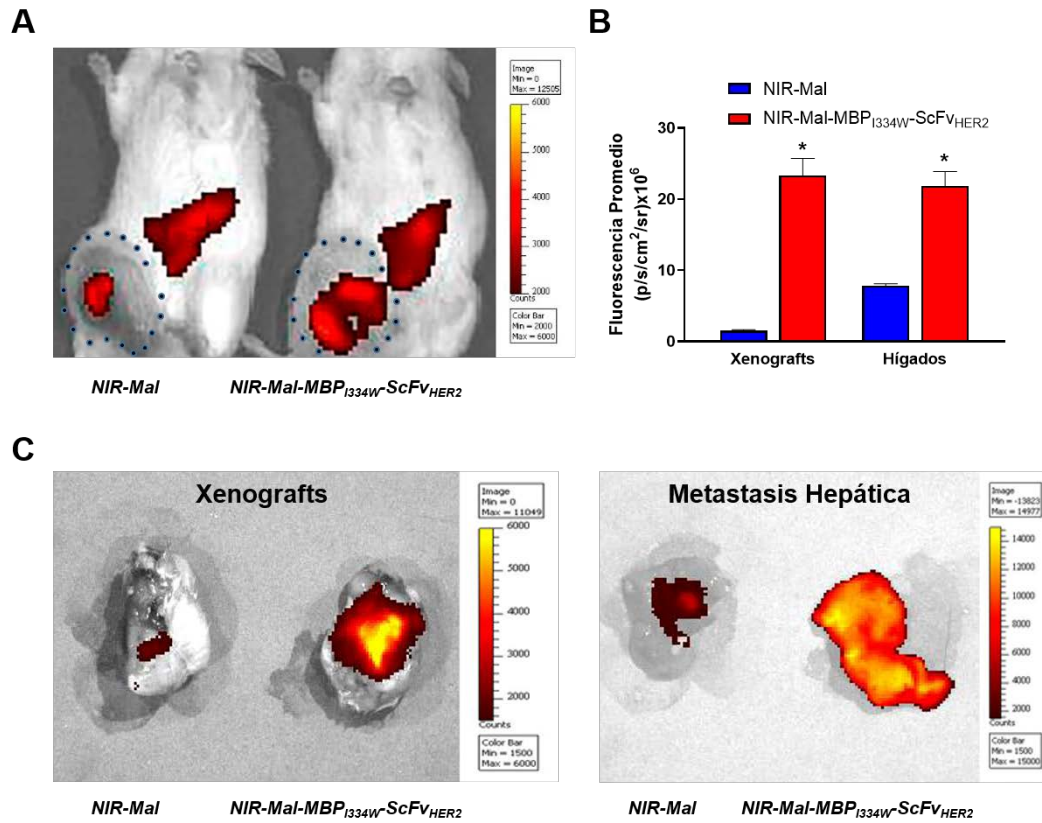


Figura 5.22 Imágenes in vivo de ratones NSG con xenografts de células que expresan HER2. Los compuestos NIR-Mal y NIR-Mal-MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} se inyectaron en la vena de la cola de ratones NSG con xenografts de células HER2+, SKBR3. Transcurridas 24 horas se midió la fluorescencia debida al NIR tal y como se describe en el apartado correspondiente del material y métodos. **A:** Imágenes de fluorescencia, **B:** representación gráfica de la medida de fluorescencia (fluorescencia/cm₂) en los tumores e hígados, **C** Imágenes de fluorescencia de los tumores e hígados extraídos de los animales. Los datos se muestran como media ± SEM (n = 4). * p < 0.05 vs NIR-Mal.

5.5 Uso de MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} para el transporte de fármacos

El siguiente uso que proponemos de MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} es como transportador de fármacos, lo que permitiría su transporte dirigido hacia células que sobre-expresen una diana concreta. Para ello, se ha diseñado (por el grupo de investigación del Profesor Santoyo) otra molécula maltosilada basada en bPEI de 2kDa como plataforma, a la que se une β -ciclodextrinas (β CD), en las que se ocluirán los fármacos, y maltosa que será reconocida por la MBP. Se unió maltosa-vinil-sulfona al PEI en una proporción 1:1 y a continuación, se le unieron a este complejo cuatro β CD para obtener β CdbPEI2k-Mal. Esta molécula se incubó con doxorubicina (DOX) en una relación 1:3,6 para formar un complejo que presenta la DOX ocluida en las β CD y que se denominó DOX- β CdbPEI2k-Mal.

La DOX se ha elegido como fármaco quimioterápico por su relevancia clínica, si bien es conocida la aparición de resistencias al fármaco durante el tratamiento y su cardiotoxicidad. La molécula de DOX entra en el interior celular por difusión pasiva, y se localiza principalmente en el núcleo aunque también puede encontrarse en el citoplasma celular. Las resistencias a DOX en numerosos tipos de cáncer se debe a la sobre-expresión de la glicoproteína P en la superficie de las células tumorales, que causa el bombeo activo del fármaco hacia el exterior celular [204]. DOX es una molécula fluorescente con una emisión a 550 nm, que permite monitorizar el transporte del fármaco, incluido en la plataforma, al interior celular.

La combinación de DOX- β CdbPEI2k-Mal con cantidades equimoleculares de MBP_{1334W} o MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} dio lugar a los complejos [DOX- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}] o [DOX- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}]. A partir de estos complejos, se evaluó in vitro la capacidad de [DOX- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}] para transportar DOX. Para ello, células MDA-MB-231 (HER2-) y HER2+ (SKBR3 y MDA-HER) se incubaron durante dos horas con 1 μ M DOX o cantidades equimoleculares de DOX ocluida en DOX- β CdbPEI2k-Mal, [DOX- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}] o [DOX- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}], y la medida de captación de DOX se realizó mediante la determinación de fluorescencia asociada a DOX en los extractos celulares.

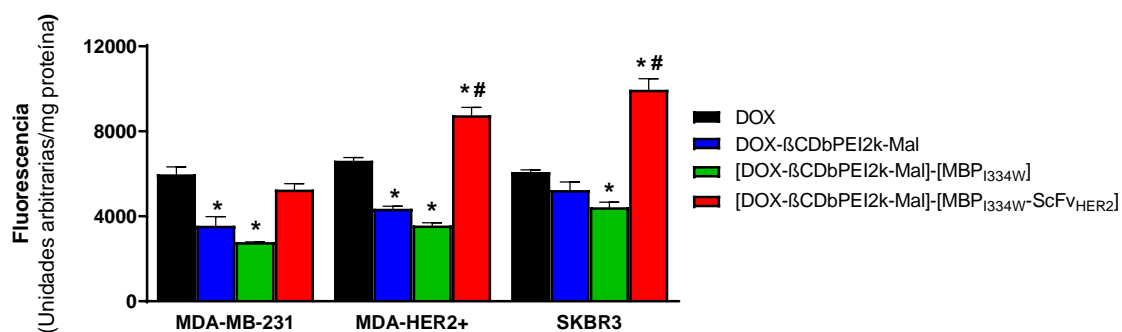
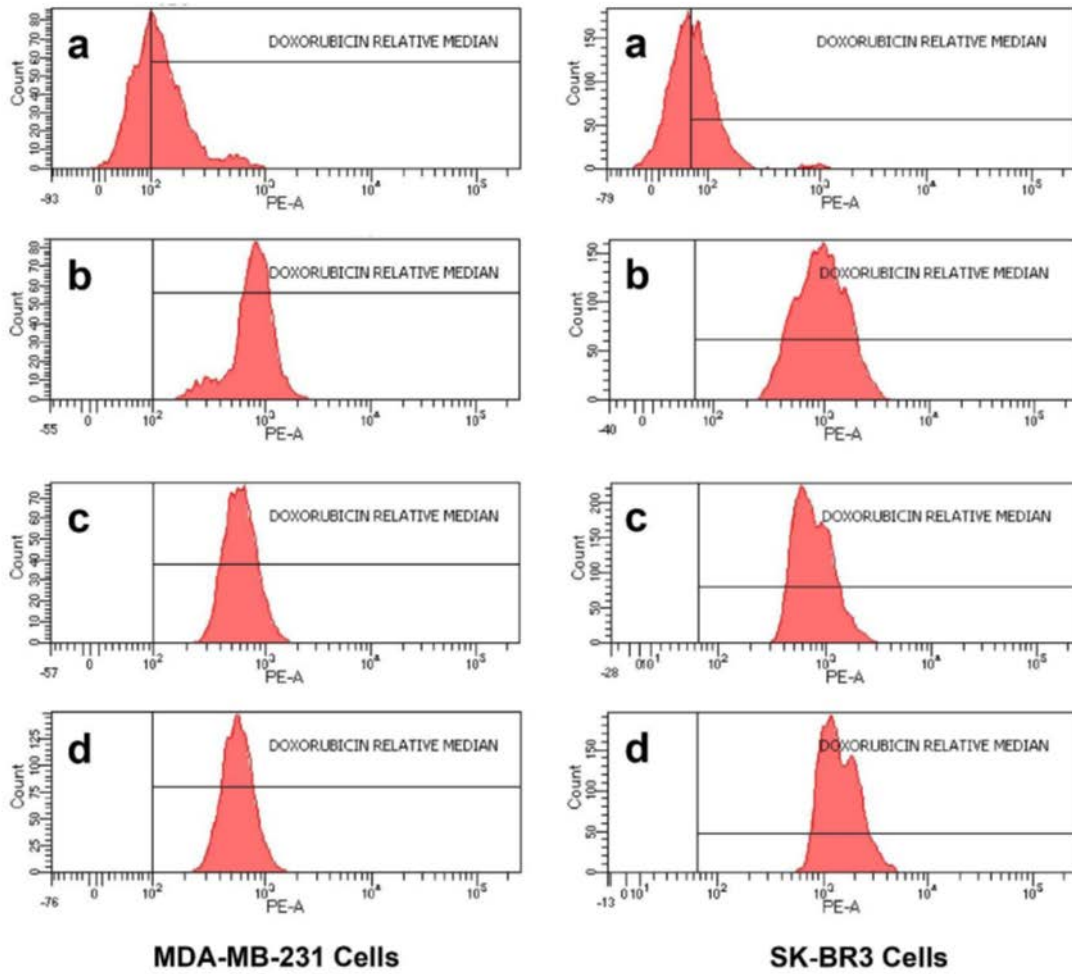


Figura 5.23 Transporte dirigido de DOX mediado por el complejo MBP_{1334W}-ScFV_{HER2}. Células MDA-MB-231 (HER2-) y HER2+ (SKBR3 y MDA-HER2+) se incubaron con 1μM de DOX libre y concentraciones equivalentes de DOX-βCDBPEI2k-Mal, [DOX-βCDBPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}], o [DOX-βCDBPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFV_{HER2}] durante 2 horas. Se representa la fluorescencia de los lisados respecto a la concentración de proteínas. Los resultados se expresaron como media ± SEM (n=8) *:p<0.05 vs células tratadas con DOX. #: p<0.05 vs células tratadas con [DOX-βCDBPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}].

La entrada de DOX libre fue similar en las 3 líneas celulares, mientras que cuando se administró unida a βCDBPEI2k-Mal (el módulo de transporte sin la plataforma directora) o MBP_{1334W} (el módulo de transporte unido a la MBP pero sin la molécula directora), se produjo una disminución en su captación. Por el contrario, es de destacar el transporte de DOX aumentó significativamente en las células con receptores para HER2 cuando era vehiculizada por la [DOX-βCDBPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFV_{HER2}], lo que pondría de nuevo de manifiesto la especificidad del transporte hacia las células que presentan receptores que son reconocidos por el ScFV_{HER2} (**Figura 5.23**).

Resultados similares se obtuvieron cuando lisados de células que expresan (SKBR3) o no (MDA-MB-231) se analizaron por citometría de flujo (**Figura 5.24**). Para ello, ambos tipos celulares se incubaron durante una hora con los diferentes complejos que contenían DOX y se determinó la captación. Se ha observado que las células SKBR3 incubadas en presencia del módulo de transporte y la plataforma directora hacia receptores HER2 tienen unos valores de PE-A tres veces mayores que los de las células que no expresan el receptor.



MDA-MB-231 Cells

SK-BR3 Cells

	<i>PEA-Mean</i>	
<i>Sample</i>	<i>MDA-MB-231 cells</i>	<i>SK-BR3 cells</i>
Control	141	89
2kPEI(DOX<CD)Mal	788	1026
2kPEI(DOX<CD)Mal~[MBP*]	609	787
2kPEI(DOX<CD)Mal~[MBP*-ScFv]	566	1477

Figura 5.24 Análisis de citometría de flujo del transporte de DOX mediado por el complejo MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}. Se muestran los histogramas de fluorescencia de células MDA-MB-231 o SKBR3 que han sido incubadas durante 1 hora en ausencia (izquierda) o presencia de 1μM DOX (derecha): **a** Control, **b** DOX-βCDbPEI2k-Mal, **c** [DOX-βCDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}], **d** [DOX-βCDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}]. Se muestra en la tabla los valores medios de PE-A de las células MDA-MB-231 y SKBR3.

Finalmente, el uso como agente de diagnóstico específico de [DOX- β CD_bPEI_{2k}-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFV_{HER2}] se estudió por microscopía confocal de fluorescencia. En este caso, se analizó la distribución celular y la intensidad de fluorescencia de la DOX. La DOX libre o vehiculizada en el módulo de transporte se ha localizado principalmente en los núcleos, aunque se ha observado una distribución difusa en el citoplasma. La intensidad de fluorescencia asociada a las células confirma los resultados de entrada de DOX (**Figura 5.25**). Cuando las células SKBR3 se han incubado con los complejos DOX- β CD_bPEI_{2k}-Mal (**Figura 5.25 b**), [DOX- β CD_bPEI_{2k}-Mal]-[MBP_{1334W}] (**Figura 5.25 c**), se observa una disminución de la fluorescencia, que puede deberse a que el fármaco necesita difundir desde la ciclodextrina en el primer caso; y en el segundo a que la MBP_{1334W} impediría la entrada del complejo al no presentar la molécula directora y, por tanto, la única DOX libre es la que se va liberando de la CD.

Por último, la fluorescencia de las células incubadas con [DOX- β CD_bPEI_{2k}-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFV_{HER2}] presenta una intensidad de fluorescencia mayor que las que lo hicieron en presencia de DOX libre en las dos líneas celulares que expresan receptores HER2 pero no en las que no lo expresan.

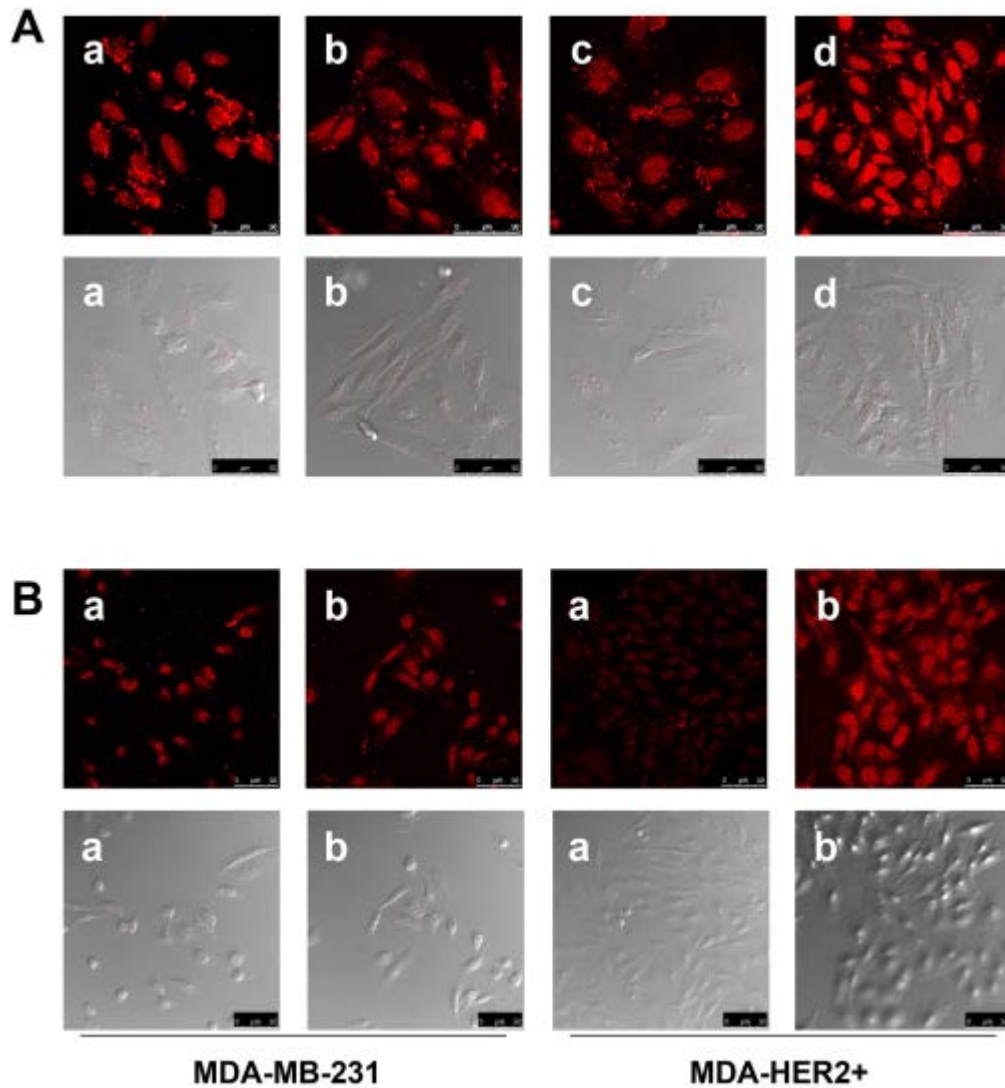


Figura 5.25 Imágenes de microscopía confocal de células que expresan o no HER2 incubadas con DOX vehiculada en MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}. Las células SKBR3 **A** se incubaron con 1 μ M de DOX libre **a** o concentraciones equivalentes de DOX- β CDbPEI2k-Mal **b**, [DOX- β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}] **c**, o [DOX- β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}] **d** durante 2 horas. **B** Células MDA-HER2+ y MDA-MB-231 se incubaron con DOX libre **a** y [DOX- β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}] **b** durante 2 horas. La imagen de fluorescencia se muestra conjuntamente con imágenes de contraste de interferencia diferencial (Nomarski).

Por tanto, estos resultados en su conjunto demuestran que la entrada de DOX es dependiente de la presencia o no en la superficie celular del receptor HER2, ya que los niveles de captación en las células HER2- son similares a los de DOX libre u ocluida en CD (DOX- β CDbPEI2k-Mal), o unida a la MBP_{1334W} sin molécula directora ([DOX- β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}]).

Ensayos de citotoxicidad de la Doxorubicina mediada por MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}

La localización de la DOX en el interior de la célula es principalmente nuclear [205]. La citotoxicidad de la DOX se debe a que estabiliza el complejo de la topoisomerasa II con el material genético durante la replicación, evitando la separación del DNA de la enzima y produciendo su rotura. Asimismo, actúa como un agente intercalante formando aductos con el DNA al establecer puentes de hidrógeno con la guanina en los sitios con numerosas guaninas-citosinas adyacentes, causando daño en el material genético [206]. Sin embargo, la inhibición por parte de la DOX sobre la topoisomerasa II presente en los cardiomiocitos va a ocasionar la cardiotoxicidad de este fármaco.

La siguiente pregunta que se ha tratado de resolver es si se mantienen los efectos citotóxicos de la DOX, al ser administrada asociada a los complejos directores. Si se mantiene el efecto citotóxico sobre las células tumorales de una manera dirigida, sería posible disminuir la dosis efectiva del fármaco y reducir sus efectos secundarios. Por tanto, se determinó la citotoxicidad tanto de DOX libre y como de los complejos que la contienen en células HER2+ o HER2-.

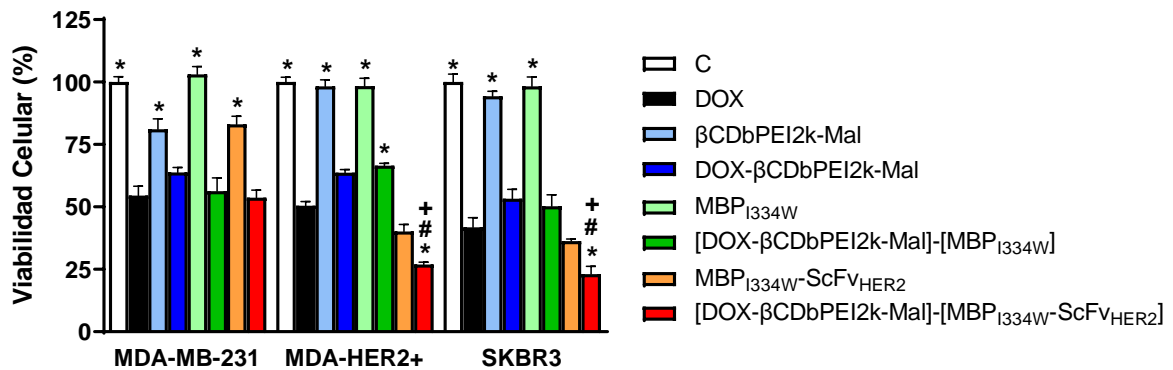


Figura 5.26 Citotoxicidad de la DOX vehiculada en MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}. Células MDA-MB-231 (HER2-) y HER2+ (SKBR3 y MDA-HER2+) se incubaron con 1μM de DOX libre y concentraciones equivalentes de DOX-βCDbPEI2k-Mal, [DOX-βCDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}], o [DOX-βCDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}] durante 48 horas. Se representa la viabilidad fluorescencia de los lisados respecto a la concentración de proteínas. Se midió la viabilidad celular utilizando el método MTT. A las células no tratadas se le asignó el valor de 100% de viabilidad. Los resultados se expresaron como media ± SEM (n=8) *:p<0.05 vs células tratadas con DOX; #: p<0.05 vs células tratadas con [DOX-βCDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}]; +: p<0.05 vs células tratadas únicamente con MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}.

Para realizar este estudio de citotoxicidad, células MDA-MB-231, SKBR3 y MDA-HER2+ se incubaron con concentraciones equimoleculares a 1 μ M DOX de DOX- β CDBPEI2k-Mal, [DOX- β CDBPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}] o [DOX- β CDBPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}] durante 48 horas. β CDBPEI2k-Mal, MBP_{1334W} y MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}, se utilizaron también para analizar el posible efecto que estas moléculas individuales pudieran tener sobre la viabilidad celular. A la viabilidad de las células incubadas en ausencia de efectores se le asignó un valor del 100%. La incubación con β CDBPEI2k-Mal o MBP_{1334W} no ha afectado a la viabilidad celular. Sin embargo, la viabilidad celular disminuyó un 50% cuando las células se incubaron en presencia de DOX libre, o incluida en el módulo de transporte β CDBPEI2k-Mal solo o unido a MBP_{1334W}.

La MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} aislada produjo una disminución en la viabilidad en aquellas células que expresan receptores HER2 (SKBR3 y MDA-HER2+), incluso mayor que la producida por la DOX. Sin embargo, cuando las células se incuban con el módulo de transporte más la molécula directora [DOX- β CDBPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}], la citotoxicidad es significativamente mayor que la molécula directora sola en las células SKBR3 y MDA-HER2+, mientras que en las células que carecen de receptores HER2 la toxicidad de este último complejo es inferior y similar a la de DOX libre. Este incremento del rango terapéutico de DOX cuando se asocia al sistema director podría en cierta medida ayudar a disminuir los efectos secundarios del fármaco al aumentar su eficacia sobre las células tumorales HER2+.

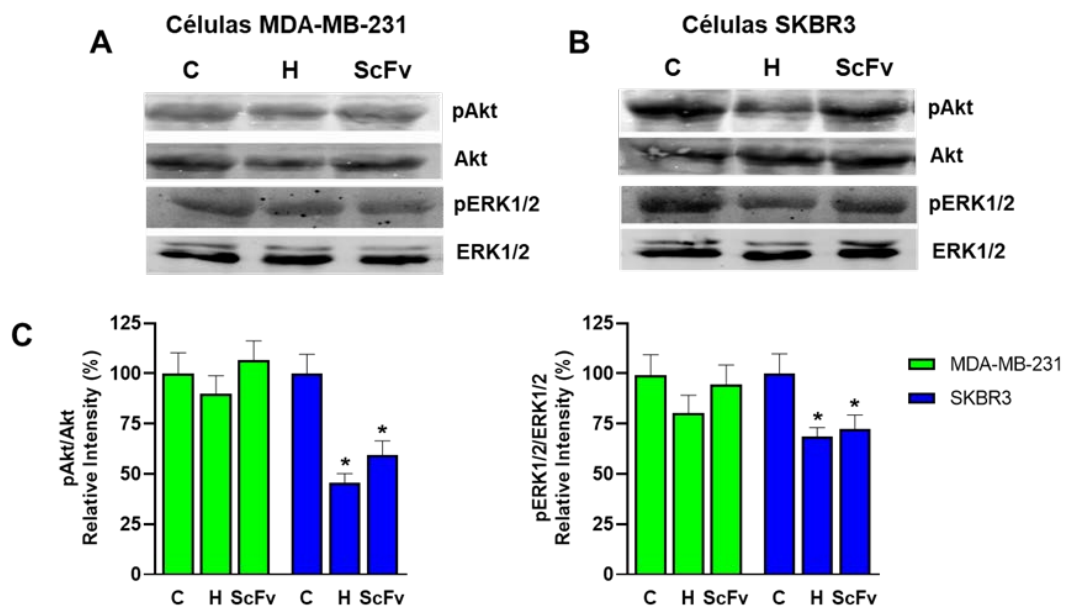


Figura 5.27 Activación de las rutas de señalización dependientes de AKT y ERK1/2 mediada por MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}. Células MDA-MB-231 o SKBR3 **A** fueron incubadas en ausencia **B** o presencia de Herceptin® (H) o MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} (ScFv) durante 24 horas. La activación de AKT y ERK1/2 se midió por Western Blot usando anticuerpos específicos. **C** Cuantificación de la activación de las dos quinasas. Los resultados se representa como medias \pm SEM (n=4). * p<0.05 respecto a las células control.

El Herceptin® cuando se une al receptor HER2 produce una disminución en el crecimiento celular, ya que disminuye la señalización dependiente de PI3K/AKT y MAPKs [207]. Sin la presencia de DOX, MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} mantiene una alta citotoxicidad en las células que expresan receptores HER2. Para establecer las bases moleculares de este efecto citotóxico, se incubaron células MDA-MB-231 y SKBR3 en ausencia o presencia de 50 µg/mL de Herceptin® o de la proteína de fusión MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} durante 48 horas y se analizó el estado de fosforilación de AKT y ERK1/2 por Western Blot. En el caso de las células MDA-MB-231, la incubación con las dos proteínas no ha alterado la fosforilación de ninguna de las quinasas, mientras que en las células SKBR3 que sí presentan receptores HER2. Tanto Herceptin® como MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} producen una disminución significativa de la fosforilación de AKT y de ERK1/2. Esto validaría que la propia molécula directora, MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} constituiría una alternativa al Herceptin® para el tratamiento de cánceres HER2+, con la ventaja adicional de poderse usarse en diagnóstico, y complementar el tratamiento con fármacos antineoplásicos que se incluirían en el módulo de transporte (**Figura 5.27**).

5.5.1 Uso *in vivo* de MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} para el transporte de fármacos

Se ha establecido que el complejo [DOX-βCdbPEI2k-Mal]-[MBP_{I334W}-ScFv_{HER2}] entra de forma específica en células que expresan el receptor HER2, tal y como se ha demostrado midiendo su entrada por fluorescencia, citometría de flujo y microscopia confocal de fluorescencia. Además, presenta una mayor citotoxicidad que MBP_{I334W}-ScFv_{HER2}, al potenciar la toxicidad producida por el anticuerpo con la de DOX. Estos efectos son específicos y están dirigidos exclusivamente a células que expresan los receptores HER2. Por tanto, el siguiente paso fue analizar su capacidad como agente de diagnóstico *in vivo*.

Los espectros de excitación y emisión de DOX, debido a su relativa baja longitud de onda de excitación y de emisión, no son adecuados para la visualización del compuesto en modelos animales debido a la baja capacidad de penetración de la señal de fluorescencia a estas longitudes de onda. Por el contrario, se ha descrito que las propiedades espectrales de la indocianina green (ICG) permiten su detección en modelos animales [208]. Alternativamente a DOX, se ocluyó ICG en βCdbPEI2k-Mal y se comprobó la viabilidad de su uso como sustituto de DOX primero *in vitro*, en células SKBR3 que se incubaron en presencia de [ICG-βCdbPEI2k-Mal]-[MBP_{I334W}], y de [ICG-βCdbPEI2k-Mal]-[MBP_{I334W}-ScFv_{HER2}]. En la **Figura 5.28 A**, se observa que la captación de la ICG por las células es mayor cuando es vehiculizada en MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} que en MBP_{I334W}, y que los patrones de distribución subcelular son similares a los que se producen cuando DOX se ocluye en los complejos directores.

Una vez validado el uso de ICG como sustituto de DOX, los dos complejos [ICG- β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}] y [ICG- β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}] se han inyectado en la vena de la cola de ratones hembra NGS portadores de xenografts de células SKBR3, y se ha observado la emisión de fluorescencia de la ICG a los 30 minutos de su administración (**Figura 5.28 B**). La fluorescencia debida a ICG se encuentra localizada en los xenografts de los animales que recibieron [ICG- β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}], y no en los tumores que fueron inyectados con [ICG- β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}]. En los dos animales se observa fluorescencia compatible con una localización hepática, tal y como también sucedía en el caso del uso de NIR-Mal como agente de imagen. Los resultados obtenidos confirman que la proteína [MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}] convenientemente unida a derivados de β CDbPEI2k-Mal que presenten ocluidos fármacos, es una herramienta útil para el tratamiento de células tumorales que expresan receptores HER2, tanto *in vitro* como *in vivo*.

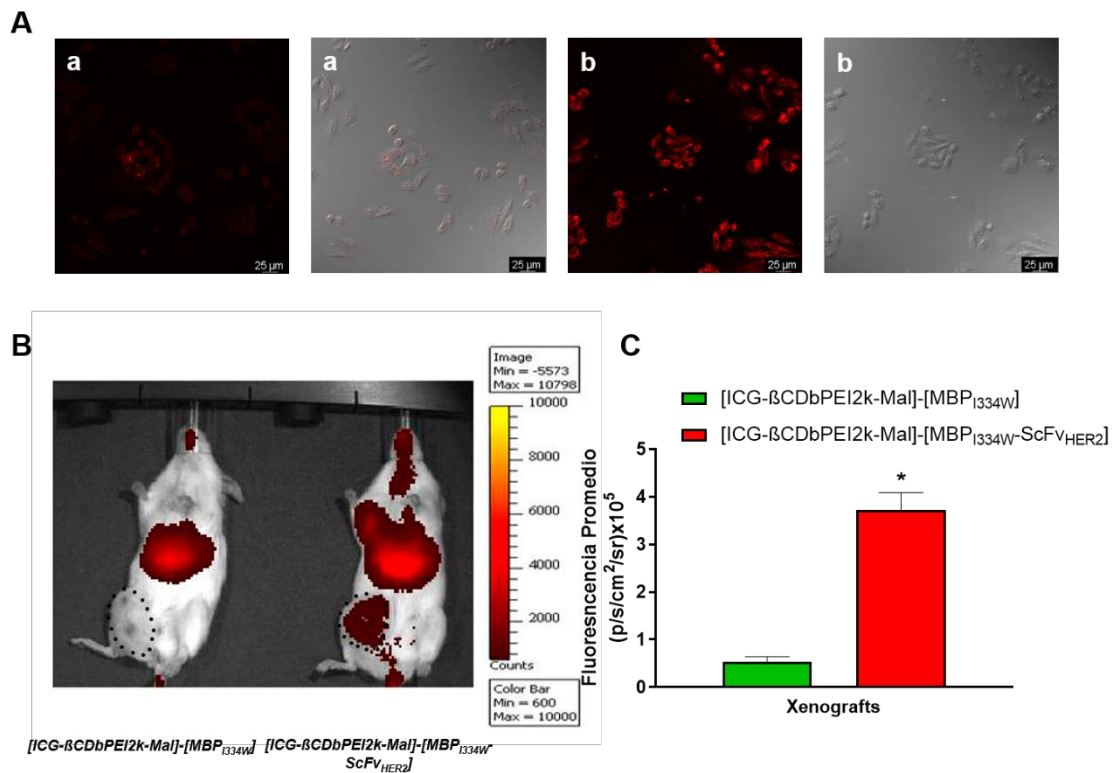


Figura 5.28 Distribución *in vitro* e *in vivo* de [ICG- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}]. **A** Células SKBR3 se incubaron en presencia de [ICG- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}] **a**, y de [ICG- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}] **b**. La señal de la ICG se detectó por microscopía confocal de fluorescencia. Se muestran imágenes de fluorescencia y de contraste de interferencia diferencial (Nomarski). **B** [ICG- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}] y [ICG- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}] se inyectaron por vía intravenosa en la cola a ratones NSG con xenografts de células SKBR3. **C** Cuantificación de la fluorescencia en xenografts de los ratones inyectados con [ICG- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}] y [ICG- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}]. Los datos representan la media \pm SEM (n = 4). *p < 0.05 vs [ICG- β CdbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}].

5.6 Ensayos de transfección mediados por MBP_{I334W}-ScFv_{HER2}

Una ventaja adicional empleando compuesto teragnósticos es que además de poder utilizarse en diagnóstico de imagen y transporte de fármacos, pueda presentar la capacidad de transportar genes y poder ser utilizado en terapia génica. Ya hemos demostrado que MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} puede ser usado tanto *in vitro* como *in vivo* para la visualización y transporte. Basándonos en que la MBP es capaz de unir maltosa y derivados maltosilados, se ha diseñado una última molécula en la que 5 maltosas se han unido covalentemente a bPEI25kDa. La síntesis de la misma se realizó por el grupo de investigación del Profesor Francisco Santoyo del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada.

Se ha elegido PEI de alto peso molecular puesto que es conocida su capacidad como agente de transfección [209] para introducir el material genético de interés (DNA, siRNA) en las células diana. Así, el PEI presenta en su estructura aminas primarias, secundarias y terciarias que pueden formar complejos con las cargas negativas de los ácidos nucleicos mediante interacciones electrostáticas.

En ensayos anteriores a esta Tesis Doctoral, se evaluó la eficiencia de transfección del PEI funcionalizado con 1, 2.5 y 5 Maltosas y su capacidad para transfectar de forma específica células que expresan HER2. En este caso, los derivados de PEI-Maltosa se incubaron con MBP_{I334W}-ScFv_{HER2} y se ensayó la eficiencia de transfección del complejo en células SKBR3. El compuesto con el que se obtuvieron mejores resultados fue aquel en que PEI está unido covalentemente a 5 moléculas de maltosa por enlaces vinilsulfona (bPEI25k-Mal).

5.6.1 Ensayos *in vitro*

Para que un reactivo de transfección sea eficiente es necesario que se una DNA, lo compacte y lo proteja de la acción de las DNAsas que se encuentran tanto en el medio extracelular como intracelular. Antes de analizar la eficacia de un compuesto de transfección, es necesario comprobar si nuestros sistemas directores basados en el PEI maltosilado reúnen las características óptimas para proteger y transportar el DNA hasta el interior de la célula.

5.6.1.1 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética

La capacidad de un reactivo de transfección para retener DNA se puede analizar mediante un ensayo de cambio en la movilidad electroforética del DNA en geles de agarosa. El DNA se incubó con diferentes cantidades del reactivo de transfección, lo que produce distintas relaciones nitrógeno/fósforo (N/P) y los complejos formados se resuelven por electroforesis en un gel de agarosa. Se ha calculado el porcentaje relativo de unión a partir de la intensidad de las bandas correspondientes al plásmido pEGFP-N2 en ausencia de PEI, comparada con la intensidad en la presencia del polímero (Figura 5.29).

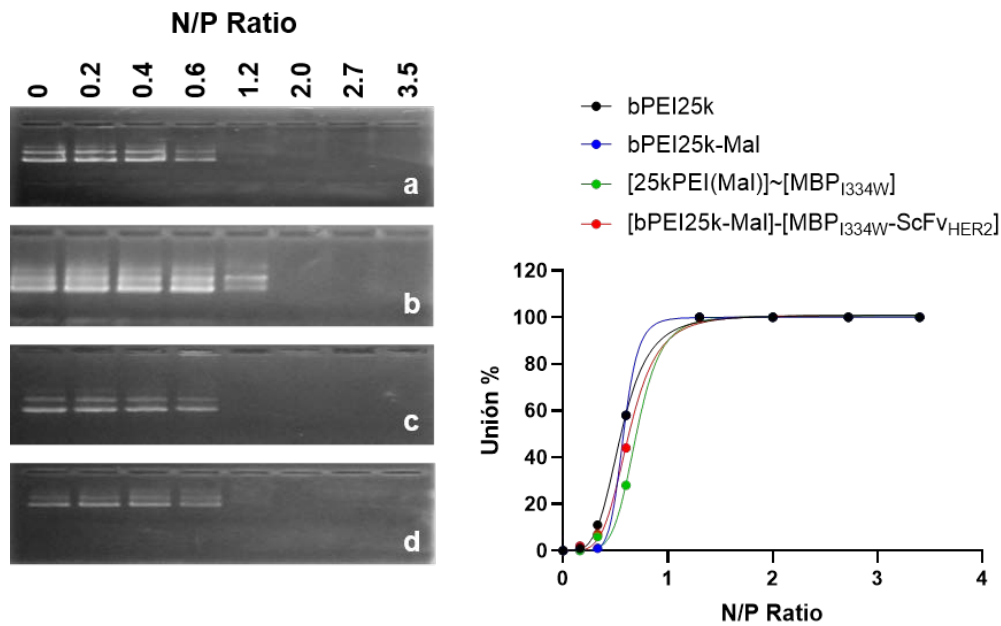


Figura 5.29 Cambio en la movilidad electroforética de los complejos entre los diferentes compuestos y el DNA. Incubamos los compuestos de transfección con el pDNA a un ratio N/P determinado, a concentración constante de pDNA (5µg) **a** bPEI25kDa, **b** bPEI25kDa-Mal, **c** [bPEI25k-Mal]-[MBP_{I334W}], **d** [bPEI25k-Mal]-[MBP_{I334W}-ScFV_{HER2}]. Después en caso necesario se incubaron con la proteína a ensayar y se resolvieron en un gel de agarosa. El porcentaje relativo de unión se calculó cuantificando la intensidad de las bandas de plásmidos independientemente de los otros compuestos.

Los resultados de retención del DNA en los gels, como indicación de la formación de los complejos de transfección indican que la adición de maltosas al bPEI25kDa no modifica su capacidad de retener y compactar el pDNA; y más importante que la incubación posterior con MBP_{I334W} o MBP_{I334W}-ScFV_{HER2} tampoco supone una variación importante en la capacidad de retención, como se observa en la gráfica (**Figura 5.29**).

5.6.1.2 Ensayos de protección frente a DNAsas

A continuación, para comprobar la capacidad del PEI para proteger el material genético de la degradación por DNAsas, y evitar su rotura precoz durante el transporte hacia el núcleo celular; bPEI25kDa y bPEI25kDa-Mal se han incubado durante 30 minutos con el plásmido pEGFP-N2 en ratios N/P= 1, 2 y 5. Una vez formados los complejos PEI-DNA, se añadieron MBP_{I334W} y MBP_{I334W}-ScFV_{HER2} en cantidades equimoleculares. Tras su unión fueron incubados en presencia de DNAsa I. Se han utilizado como controles, el plásmido pEGFP-N2 en presencia (+) y en ausencia (-) de DNAsa I y el grado de protección se ha determinado mediante electroforesis en gels de agarosa.

Las imágenes de la electroforesis muestran que ni la adición de 5 maltosas al PEI, ni la formación de complejos con MBP_{1334W} o MBP_{1334W}-ScFV_{HER2} suponen una disminución de la capacidad de protección del DNA por el PEI. (**Figura 5.30**). Por tanto, los ensayos in vitro de unión y protección del DNA validan la hipótesis de partida del uso de estos sistemas para mediar la transfección de células eucariotas.

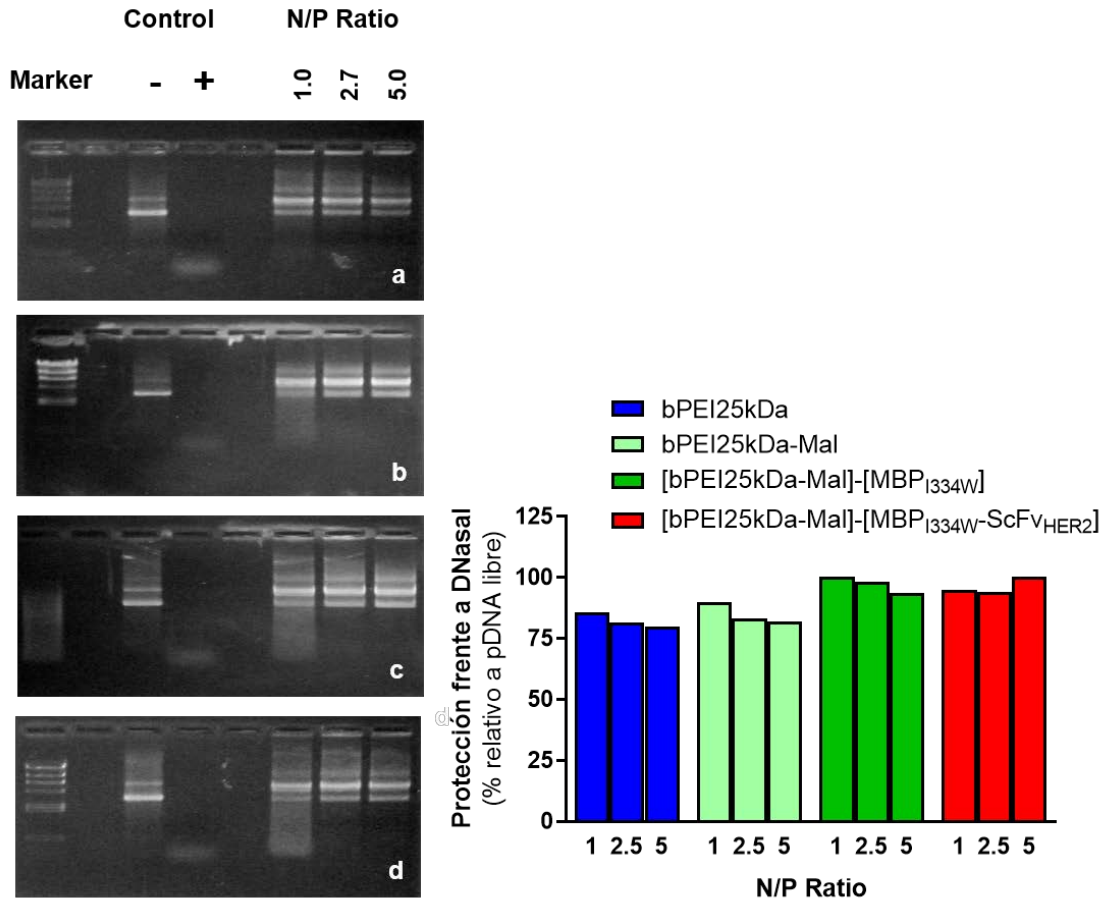


Figura 5.30 Ensayo de protección del DNA frente a DNasaI. Se incuban los compuestos de transfección con el pDNA a diferentes ratios N/P para una concentración constante de pDNA (10µg), y se incubaron con la DNasaI: **a** bPEI25kDa, **b** bPEI25kDa-Mal, **c** [bPEI25k-Mal]-[MBP_{1334W}], **d** [bPEI25k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFV_{HER2}]. La cuantificación se realiza a partir de la intensidad relativa de la suma de las bandas relajada y sobreenrollada tratada con DNasa I. La banda de pDNA sin tratar ha recibido un valor de 100.

5.6.1.3 Ensayos de eficiencia de transfección en cultivos celulares

Los complejos [bPEI25k-Mal]-[MBP_{1334W}] y [bPEI25k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}] son capaces de compactar y proteger al DNA de la acción de DNasas. A continuación se ensayaron sus capacidades de transfección en células que expresan o no el receptor HER2. Se realizaron ensayos empleando los reactivos de transfección en las líneas celulares que han sido utilizadas en esta Tesis Doctoral. Como DNA se utilizó pEGFP, que al codificar para la proteína fluorescente verde permite comprobar visualmente en un microscopio de fluorescencia la eficiencia de transfección, y su cuantificación midiendo la intensidad de fluorescencia con un fluorímetro en los lisados celulares. Se ha utilizado una relación N/P de 7 para bPEI25k y bPEI25k-Mal, ya que es la relación a la que se ha observado la mejor transfección en los tres tipos celulares.

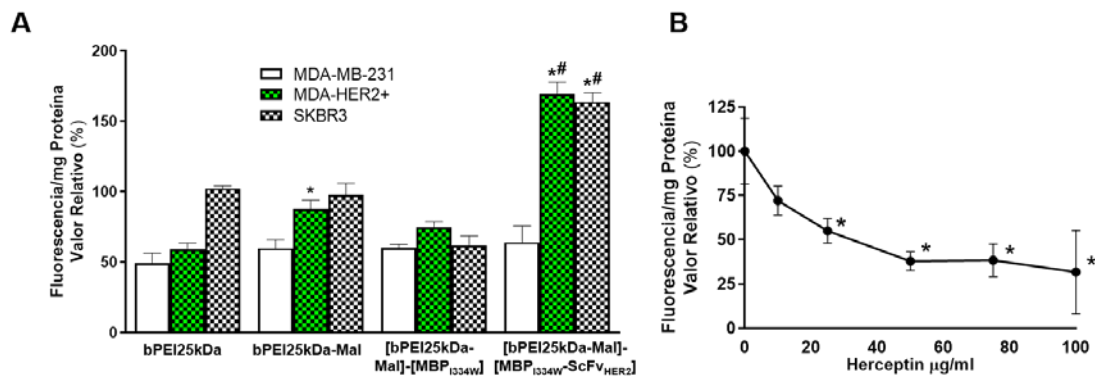


Figura 5.31 A Transfección *in vitro* con el plásmido pEGFP-N3 incubado con bPEI25k, bPEI25k-Mal, [bPEI25k-Mal]-[MBP_{1334W}] y [bPEI25k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}] en células que expresan HER2 (SKBR3 y MDA-HER2+) y en células que carecen del receptor (MDA-MB-231). Se midió fluorescencia tras 24 horas y se representó en porcentajes relativos a los resultados obtenidos con Lipofectamine™2000. Los resultados representan la media ± SEM (n = 8). * p < 0.5 comparado con bPEI25k; # p < 0.5 comparado con [bPEI25k-Mal]-[MBP_{1334W}]. B Transfección *in vitro* con el plásmido pEGFP-N3 incubado con [bPEI25k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}] en células SKBR3 (HER2+), incubadas con concentraciones crecientes de Herceptin® por 30 minutos antes de la adición de los complejos. Se midió fluorescencia tras 24 horas y se representó en porcentajes relativos a los resultados obtenidos en ausencia de Herceptin®. Los resultados representan la media ± SEM (n = 4). * p < 0.5 comparado con las células control.

En la **Figura 5.31 A** la eficiencia de los diferentes reactivos de transfección es similar en las células MDA-MB-231 que no expresan HER2. En las células SKBR3 y MDA-HER2 (HER2+), el empleo de DNA-bPEI25k-Mal unido a la proteína de fusión MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} produjo un aumento significativo en la transfección, con respecto a los PEIs sin la proteína de fusión. Los resultados obtenidos confirman la posibilidad de utilizar la proteína de fusión como herramienta para el transporte dirigido de genes hacia células que presenten receptores frente al ScFv en cuestión.

Para comprobar el papel de MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} en el aumento de la eficiencia de transfección y la especificidad de la misma, células SKBR3 se pre-incubaron en presencia de concentraciones crecientes de Herceptin® para bloquear el receptor HER2. A continuación, se añadieron los complejos [bPEI25k-Mal/pDNA]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}] y como se observa en la **Figura 5.31 B**, la eficiencia de transfección disminuyó de forma dosis dependiente por la preincubación con Herceptin®, demostrando por tanto que el aumento de la transfección depende de la unión de los complejos PEI-DNA con la proteína de fusión.

5.6.2 Ensayos *in vivo*

Finalmente y teniendo en cuenta las mejores condiciones de transfección *in cellula*, se ha realizado un ensayo de transfección utilizando como DNA el plásmido pGL3-control que codifica para la luciferasa de luciérnaga. Como vector de transfección se ha utilizado bPEI25k-Mal (N/P 7) unido a la proteína de fusión MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}. Como control negativo se ha empleado el reactivo comercial Lipofectamina 2000. Los complejos se han inyectado por vía intravenosa en la cola de ratones hembra NSG, en los que se había inducido el crecimiento de xenografts con células SKBR3. La bioluminiscencia, como reportero de la transfección, se midió de manera no invasiva 24 horas después, tras inyectar D-luciferina como sustrato de la luciferasa por vía intraperitoneal (**Figura 5.32**).

Al igual que en los ensayos en células se ha observado una transfección específica en los xenografts de los animales cuando se utilizó PEI-DNA unido a la molécula directora. Por el contrario, los ratones que recibieron el DNA vehiculizado con Lipofectamina no presentaron luminiscencia en los tumores. Por tanto, la proteína de fusión actúa como un agente de transporte de genes de forma específica hacia células tumorales con receptores HER2. Esta especificidad se debe al ScFv que funciona como molécula directora hacia estos receptores.

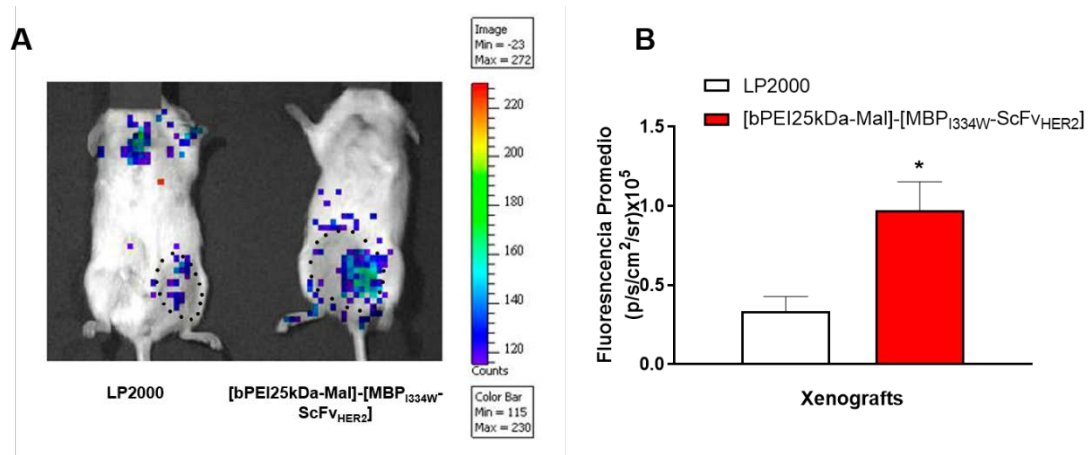


Figura 5.32 Transfección dirigida hacia células HER2+ *in vivo*. **A** Transfección realizada en Ratones NSG con xenografts tumorales SKBR3. Se inyectó Lipofectamine™2000-pGL3 o [bPEI25k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}]-pGL3 por vía intravenosamente en la vena de la cola, se tomaron imágenes 24 horas más tarde. El tamaño de las xenografías se indica en la imagen con una línea de puntos. **B** Resplandor promedio de las xenografías de los ratones inyectados con LP2000-pGL3 o [bPEI25k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}]-pGL3. Los datos se muestran como medias ± SEM (n = 4). * p < 0.05 vs LP2000-pGL3.

6. Discusión

El cáncer supone desde un punto de vista personal, social y económico un gran desafío para la sociedad y los sistemas de salud pública. La carencia de tratamientos eficaces en algunos casos, la dificultad de encontrar tratamientos específicos para cada tipo tumoral y la necesidad de mantener un seguimiento de los pacientes durante el transcurso de la enfermedad (que además usualmente se extiende a toda la vida de los pacientes), hace que el desarrollo de sistemas de tratamiento específicos, eficaces y con escasos efectos secundarios sea una necesidad. Además, no es un aspecto menor el seguimiento diagnóstico de los pacientes, por lo que disponer de métodos de diagnóstico no invasivos y basados en las características moleculares de los tumores mejoraría el diagnóstico, y por tanto no sólo la orientación terapéutica sino también la calidad de vida de los pacientes.

En la actualidad se están diseñando sistemas denominados teragnósticos, en los que a una partícula se le añaden moléculas que permiten un diagnóstico y también moléculas que actúan como fármacos para el tratamiento de la patología. Estos sistemas suelen presentar una estructura modular, en la que sobre una partícula inicial (liposomas, diversos polímeros, carbon dots, proteínas, carbohidratos complejos, etc...) se disponen diferentes grupos funcionales que permiten el diagnóstico y el tratamiento. Además, usualmente en estos sistemas teragnósticos se incluye una molécula directora, que es la que confiere especificidad al sistema al reconocer y unirse específicamente a dianas moleculares sobre-expresadas en las células, frente a las que va dirigido el tratamiento.

La elección de la diana molecular y la molécula directora por lo tanto es clave para el éxito de estos nuevos agentes terapéuticos. Con frecuencia se utilizan con la finalidad de dirección anticuerpos frente a proteína expresadas en la superficie de las células diana. Dentro de las diferentes familias de anticuerpos existentes, los anticuerpos de cadena sencilla (ScFv) son usados con frecuencia. Por una parte, debido a su especificidad son ideales para el desarrollo de técnicas de radioinmunoimagen e inmunoterapia. Por otra parte, su tamaño reducido (capaz de entrar de manera rápida y uniforme en tejidos) los hacen atractivos como moléculas directoras. Para su empleo como sistema de direccionamiento en agentes teragnósticos, las nanopartículas que constituyen la base del sistema se funcionalizan con estos anticuerpos mediante adsorción pasiva o el establecimiento de enlaces covalentes, aunque la unión covalente parece ser una técnica más ventajosa. Una unión más fuerte permite controlar la orientación de las moléculas de anticuerpo en la superficie de la partícula, garantizando así la unión en el tiempo del anticuerpo y las características funcionales de la partícula.

En esta Tesis Doctoral se abordan los primeros pasos para el desarrollo futuro de agentes teragnósticos. Puesto que estos agentes se han desarrollado mayoritariamente como agentes antitumorales, en este trabajo se ha seleccionada cáncer de mama como modelo para el desarrollo de estos agentes. El cáncer de mama es la segunda causa de muerte en mujeres de entre 40-59 años en países desarrollados. Aunque la mortalidad se ha ido reduciendo con la implantación de tratamientos cada vez más eficaces, cada año se diagnostican miles de casos [210]. Un diagnóstico temprano y preciso permite actuar rápidamente frente a la enfermedad, aumentando así la probabilidad de éxito. Al mismo tiempo, una terapia dirigida aseguraría una disminución de los efectos secundarios de dos maneras: la especificidad evita daños colaterales por parte del tratamiento en células no cancerosas, y la cantidad de fármaco a administrar disminuiría por lo que el riesgo de efectos secundarios también.

No existe un único tipo de cáncer de mama, sino que a lo largo de los años se han ido descubriendo diferentes perfiles moleculares en este tipo de tumores, lo que ha permitido su clasificación, pronóstico y tratamiento preferente. Dentro de los marcadores moleculares que permiten clasificar este tipo de tumores se encuentra el receptor para el factor crecimiento humano 2 o también conocido como HER2/neu o ERBB2. Su expresión está relacionada con un aumento de la malignidad, ya que la vía de señalización mediada por este receptor genera señales proliferativas en las células tumorales lo que facilita su crecimiento y diseminación en el organismo. Sin embargo, este receptor HER2 también constituye una diana terapéutica a la hora del diagnóstico y tratamiento. Así, uno de los primeros tratamientos específicos contra el cáncer de mama HER2+ fue el empleo de anticuerpos monoclonales con la capacidad de bloquear el receptor al unirse al mismo en la región correspondiente al dominio extracelular del receptor. De hecho, un anticuerpo monoclonal de este tipo, el trastuzumab o Herceptin® fue el primer anticuerpo aprobado para uso humano [211]. El anticuerpo funciona uniéndose al receptor HER2 en la membrana celular comportándose como un antagonista al prevenir la homodimerización y la heterodimerización del receptor. El bloqueo de la dimerización del receptor evita que se transmita la cascada de señalización proliferativa dependiente de este receptor al mismo tiempo que favorece la destrucción endocítica del receptor. Ambos procesos inhiben la proliferación de células que sobreexpresan el receptor [212]. Este tratamiento, además de seguir utilizándose en la actualidad, abrió la puerta al desarrollo de nuevos anticuerpos anti-HER2 [213].

Se han desarrollado sistemas dirigidos para la obtención de imágenes y la administración de fármacos contra el cáncer de mama HER2+ basados en la Herceptin®. En estos sistemas se han empleado distintas nanopartículas como dendrímeros de poli(amido)amina G4, poli(ácido láctico-co-glicólico), quitosan y albúmina que se han conjugado a grupos $-NH_2$ y $-COOH$, ubicados en la superficie del anticuerpo estableciendo así la unión entre nanoportador y anticuerpo [18, 214-218]. Sin embargo establecer este tipo de uniones covalentes resulta un proceso tedioso y difícilmente reproducible, ya que se basa en el número, naturaleza y reactividad de los aminoácidos expuestos en la superficie del anticuerpo monoclonal utilizado, y por tanto la metodología de conjugación requiere su optimización para cada anticuerpo específico

empleado. Estas limitaciones podrían conducir a un mal marcaje del anticuerpo monoclonal y una multivalencia variable del número de moléculas unidas covalentemente necesarios para el diagnóstico o el transporte. En el peor de los casos la unión covalente de los restos puede conducir a la pérdida total de la función que posee el anticuerpo monoclonal. Si adicionalmente se ha de unir covalentemente las moléculas responsables del diagnóstico por imagen y los fármacos necesarios para el tratamiento, el desarrollo de estos agentes teragnósticos basados en uniones covalentes se hace sumamente complejo y poco reproducible.

En esta Tesis Doctoral se ha iniciado el trabajo de desarrollar agentes teragnósticos que sean versátiles, reproducibles y que no precisen una síntesis química individualizada para el desarrollo de cada uno de ellos en función de la diana molecular a la que se dirijan. Como base de este tipo de teragnósticos se ha desarrollado un sistema de expresión recombinante heterólogo en bacterias de una proteína de fusión entre la proteína de unión a maltosa (MBP) y un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla (ScFv). Como sistema modelo para la validación de este sistema teragnóstico se ha seleccionado células tumorales de cáncer de mama HER2+.

La MBP con una afinidad frente a la maltosa, ha demostrado ser una proteína de fusión ideal ya que confiere un aumento de la solubilidad a la proteína de fusión, actúa como una chaperona molecular y permite la fácil purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad [166]. En nuestra proteína de fusión se ha empleado ScFv, en vez de un anticuerpo monoclonal como molécula directora. El anticuerpo ScFv está compuesto por regiones variables de las cadenas ligeras (V_L) y pesadas (H_L) de inmunoglobulinas, unidas por un péptido conector flexible [219, 220]. Los fragmentos de anticuerpos (ScFv) se han aislado con éxito, y se han empleado principalmente en insectos o en células eucariotas [91] y más escasamente en bacterias [219, 221]. Se ha seleccionado para este estudio un anticuerpo ScFv dirigido hacia el receptor HER2. Este ScFv se ha desarrollado mediante la diversificación de las regiones determinantes de la complementariedad del sitio de unión de un ScFv humano para mejorar su afinidad [222], y se ha utilizado fusionado con protamina para administrar RNAi a las células cancerosas HER2 +.

Para que la plataforma teragnóstica esté completa el grupo de investigación de Profesor Francisco Santoyo ha diseñado y sintetizado distintos compuestos unidos covalentemente a maltosa para posibilitar su unión al dominio MBP de la proteína de fusión. Así se ha unido maltosa a un compuesto que emite en el infrarrojo cercano (NIR-Mal) para el diagnóstico; a ciclodextrinas unidas a polietilenimina de bajo peso molecular (β CD-bPEI2k-mal) para el transporte de fármacos; y a un compuesto de transfección basado en polietilenimina de alto peso molecular (bPEI25k-mal) para la transfección dirigida. De esta manera se pretendía que cada una de estos compuestos unidos a la proteína de fusión MBP-ScFv, adquieran la capacidad de actuar específicamente sobre las células que presentan el receptor HER2 (HER2+).

Varios estudios muestran que el empleo de la MBP como proteína de fusión aumenta la solubilidad y favorece el plegamiento de la proteína fusionada [165, 223, 224]. Además estructuralmente la MBP es una proteína muy interesante ya que aunque se trata de una proteína monomérica, la cadena peptídica que la forma se encuentra plegada de tal manera que se pueden distinguir dos dominios, que cuando se pliegan sobre una bisagra central forma el sitio de unión para los ligandos de la proteína. Este centro de unión a ligandos está formado por una amplia hendidura que le permite unir no sólo maltosa sino también sustituyentes más voluminosos unidos a maltosa, lo cual ha sido una de las razones para seleccionar esta proteína en el diseño de los agentes teragnósticos.

En biología, el uso de sistema de reconocimiento por proteínas de ligandos es una de las técnicas más empleadas y estudiadas. Existen proteínas que presentan una fuerte afinidad por sus ligando, siendo el caso más destacado el constituido por la avidina o la estreptavidina y la biotina [225]. Si se marca covalentemente un ligando con biotina, ese ligando se unirá fuertemente a la estreptavidina en el momento en el que interactúen. Frente a la alta afinidad que la estreptavidina presenta por la biotina, existen una serie de inconvenientes. Así, estreptavidina, avidina y sus derivados monoméricos son muy poco solubles y la generación de proteínas de fusión a partir de ellos es cuanto menos difícil. Otro inconveniente se encuentra en el sistema biotina-estreptavidina, es que tanto la avidina como la estreptavidina presentan una estructura tetramérica con 4 sitios de unión para la biotina, lo que puede provocar problemas de multivalencia al desarrollar sistemas basados en estas proteína. Además la interacción entre la biotina y la estreptavidina es tan fuerte que es difícil de revertir, imposibilitando la liberación del ligando unido y dificultando su posterior función. Aun así se han realizado esfuerzos en el diseño de mutaciones específicas de avidina que presentasen una menor afinidad hacia la biotina, pero por el momento siguen presentando inconvenientes para su uso.

Aunque el modelo estreptavidina-biotina presente numerosos inconvenientes, la idea de base es atractiva. Empleando la proteína de unión a Maltosa se puede solventar los problemas de solubilidad y multivalencia mencionados previamente al ser la MBP es una proteína monomérica altamente soluble con un solo sitio de unión para los ligandos. No obstante, la afinidad de la MBP por la maltosa y derivados maltosilados es moderada. Si fuese posible el incremento de la misma sin detrimento del resto de sus propiedades constituiría una mejor base para el desarrollo del sistema teragnóstico propuesto.

La MBP se une con una afinidad moderada-alta tanto a maltosa como a sus derivados. Como se ha indicado la proteína presenta una región central flexible que permite que la proteína se cierre sobre sí misma para formar el sitio de unión a sus ligandos. Esto permite distinguir en la estructura de la proteína dos conformaciones, una de ellas que denominaremos abierta con baja afinidad por los ligandos y una que denominaremos cerrada que tiene una afinidad alta por los mismos. La unión de la maltosa a la proteína es capaz de desplazar el equilibrio entre formas abiertas y cerradas hacia la forma cerrada de la proteína. Estudiando el equilibrio de la conformación abierto-cerrado que se produce cuando la MBP se une a su ligando, se descubrió que pequeñas mutaciones en la proximidad del centro activo mejoraban la afinidad [172, 173]. Estos mutantes son el resultado de pequeños cambios en la zona de bisagra que se encuentra en el sitio activo.

La sustitución de un residuo por uno de mayor volumen puede llegar a desestabilizar la estructura desplazando el equilibrio de la conformación abierta a cerrada favoreciendo la afinidad de unión de los ligandos [196]. La principal sustitución descrita siguiendo esta estrategia afecta a la posición 330 en la que la sustitución de la isoleucina (Ile) por triptófano (Trp) incrementa la afinidad de la proteína por la maltosa [196].

En esta Tesis y basándonos en la estructura tridimensional de la MBP y programas informáticos que permiten simular la conformación tridimensional de una proteína tras una mutación puntual como *Dynamut* [200], hemos propuesto una mutación adicional en la posición 334, en la que es posible introducir también un cambio de Ile por Trp. Así, una sustitución en las regiones 330 y 334 de una Ile por un Trp supondrá un aumento del volumen de los residuos de la zona, mientras que los programas de modelización predicen un incremento de la estabilidad de las proteínas mutadas a nivel macromolecular.

Basados en estas predicciones se realizaron mutagénesis sitio específicas y se generaron a partir de la MBP_{wt} los mutantes MBP_{I330W}, MBP_{I334W} y el doble mutante MBP_{I330W-I334W}. Estos mutantes se clonaron en un vector de expresión pMAL-TEV-His. Este vector de expresión permite generar la MBP fusionada a una cola de poliHis, lo que facilita su purificación sin utilizar el sitio de unión a maltosa de la MBP. Esto es importante ya la MBP presenta la propiedad de que una vez unida la maltosa a la misma, es relativamente lenta la salida del ligando del sitio de unión de la proteína y por tanto, permanecería bloqueado en el caso de haber utilizado una estrategia de purificación mediante cromatografía en columnas de amilosa y posterior elución con un exceso de maltosa libre.

Por tanto, los vectores que expresan MBP_{wt} y sus mutantes se transformaron en *E. coli*, se indujo la expresión y se purificaron las proteínas recombinantes mediante cromatografía IMAC aprovechando la presencia de las colas de poliHis. Un análisis de los niveles de expresión y de solubilidad de estas proteínas nos indicó que tanto MBP_{I330W} como MBP_{I334W} eran expresados a altos niveles y de manera soluble, mientras que la introducción de la doble mutación disminuía la solubilidad de la proteína.

La determinación de la afinidad de la MBP por la maltosa ha sido clásicamente un proceso complejo. Clásicamente se han utilizado dos posibles métodos, en uno de ellos se aprovecha los cambios de fluorescencia que la unión de maltosa produce en una cadena lateral de Trp que se localiza en el sitio de unión del ligando. Monitorizando estos cambios de fluorescencia es posible determinar la afinidad. No obstante es un método poco sensible que requiere concentraciones elevadas de proteína y ligando para ser fiable. Alternativamente se ha propuesto la modificación química de la MBP mediante la unión covalente de grupos fluorescentes puedan monitorizar los cambios conformacionales que la unión del ligando induce. El inconveniente de este método es la introducción de modificaciones covalentes en la proteína que en definitiva alteran su estructura y la validez de las medidas.

En esta Tesis hemos desarrollado un método alternativo que soslaya los inconvenientes de los métodos anteriores. Los fluoróforos basados en cianinas como es el caso de IR-780 e IR-783 debido a su estructura con múltiples anillos planos hidrofóbicos tienden en medio acuoso a sufrir un apilamiento de manera que quedan menos expuestos hacia un entorno hidrofílico. Este apilamiento hace que la emisión de fluorescencia se encuentre disminuida. La unión de estos fluoróforos por ejemplo a proteína permite su solubilización, desapilamiento e incremento de la intensidad de fluorescencia [201]. En el caso del NIR unido a maltosa (NIR-Mal), se presenta este mismo comportamiento. En este caso, la unión del NIR-Mal a la MBP se traduce en un incremento de la intensidad de fluorescencia y por a partir de esta medida monitorizar la afinidad de la MBP por este ligando. Del análisis de estos cambios de intensidad de fluorescencia se deduce que la mutación MBP_{1334W} es la que presenta una mayor afinidad por NIR-Mal, mientras que mantiene elevados niveles de expresión y solubilidad. Además mediante ensayos de competencia entre maltosa libre y NIR-Mal es posible intuir que este mutante es el que presenta un menor ratio de salida del ligando una vez que se ha unido a la proteína (K_{off}). Esta propiedad es importante para el diseño de nuestra plataforma teragnóstica, la combinación de una mayor afinidad por los ligandos maltosilados así como una menor tendencia de los mismos de salida del centro de unión de la proteína, permiten garantizar el transporte de los mismos *in vivo* hasta su lugar de acción. La proteína MBP_{1334W} ha sido el candidato elegido para el desarrollo de nuestro sistema teragnóstico.

Una ventaja adicional del uso del NIR-Mal es que permite su uso para la determinación en extractos celulares y en electroforesis no desnaturalizante de la presencia y los niveles de expresión de MBP. La generación de proteína de fusión basadas en la MBP para la expresión de proteínas recombinantes es una de la técnicas más empleadas actualmente, el disponer de un sistema basado en NIR-Mal y la medida de fluorescencia que permita medir rápidamente los niveles de expresión de estos sistemas recombinantes es de utilidad biotecnológica.

Aunque el uso de NIR-Mal para la determinación de la afinidad de los diferentes mutantes de la MBP por la maltosa es un método muy ventajoso, se debe tener una cierta prudencia. En este caso se está determinando la afinidad por un derivado de la maltosa más que por la propia maltosa. Por ello y para validar el uso de NIR-Mal como sistema de medida de la afinidad, hemos utilizado una segunda técnica alternativa, el *Thermal Shift Scan*. Mediante esta técnica se determina la estabilidad térmica de una proteína. Se mide la emisión de fluorescencia de la proteína en presencia de un fluoróforo fluorescente de naturaleza hidrofóbica. La desnaturalización de la proteína debido a un incremento de temperatura produce que la proteína parcialmente desplegada exponga hacia el exterior restos hidrofóbicos a los que el fluoróforo puede unirse incrementando la emisión de fluorescencia. Incrementos adicionales de la temperatura conducen a la desnaturalización total de la proteína y la liberación del fluoróforo por lo que la fluorescencia disminuye.

De las curvas de fluorescencia en función de los cambios de temperatura se deduce la estabilidad de la proteína. El análisis de esta estabilidad en el caso de los mutantes de MBP, nos indica de nuevo que la mutación I334W produce pocos cambios en la estabilidad estructural de la proteína. Más interesante, la unión de ligandos a una proteína permite el establecimiento de nuevas interacciones que se traduce en un incremento en la temperatura de desnaturalización de la proteína. Monitorizando esos cambios en presencia de concentraciones crecientes de ligando, maltosa en nuestro caso, es posible determinar la afinidad de los distintos mutantes de MBP por la maltosa. Los resultados obtenidos por esta técnica corroboran los datos obtenidos usando NIR-Mal como ligando, validan su uso para la medida de la afinidad de MBP por maltosa y reafirman la validez del uso del mutante MBP_{I334W} para el desarrollo de la plataforma teragnóstica.

A continuación, se diseñó un sistema de expresión para la proteína de fusión MBP_{I334W}-ScFv_{HER2}. La secuencia codificante para el anticuerpo ScFv_{HER2} se había descrito y utilizado previamente [91], para el desarrollo de un sistema de expresión basado en baculovirus en células de insectos. Aunque este sistema de expresión ofrecía niveles de expresión adecuados, nosotros hemos optado por un sistema de expresión heterólogo en bacterias ya que la expresión bacteriana presenta grandes ventajas desde el punto de vista de rapidez, rendimiento y economía. Para el desarrollo del sistema es preciso que ScFv sea expresado en un vector adecuado que debe garantizar un plegamiento proteico correcto, mantenga la funcionalidad y una solubilidad adecuada. Para ello la MBP, o en este caso su mutante MBP_{I334W} es un compañero de expresión adecuado. Además, durante el diseño del vector de expresión de la proteína de fusión, se ha añadido una cola de poli histidina a la secuencia que codifica para ScFv_{HER2}. Esta cola de seis histidinas unidas a la proteína de fusión va a ser necesaria a la hora de purificar la proteína una vez expresada, empleando una columna de cromatografía de afinidad metálica (IMAC). De esta forma preservamos libre el sitio de unión a maltósidos de la MBP como ya hemos indicado anteriormente. El vector de expresión final desarrollado fue denominado pMAL_{I334W}-TEV-ScFv_{HER2}-His y debe considerarse la base general de la plataforma para el desarrollo de agentes teragnósticos ya que la sustitución, mediante técnicas de clonación rutinarias, de la secuencia codificante de ScFv_{HER2} por la secuencia correspondiente a otro anticuerpo dirigido a un epítipo diferente permitiría utilizar este sistema sobre células que expresasen otras proteínas de superficie. En definitiva este carácter modular de cada región de la proteína de fusión otorga la verdadera versatilidad: su amplio espectro de actuación y su variedad en aplicaciones.

A partir de este vector de expresión se ha puesto a punto la producción de la proteína de fusión. Se han optimizado una serie de parámetros relevantes que incluyen la selección de la cepa bacteriana para la expresión, la selección de la temperatura y protocolos de inducción y finalmente el establecimiento de un protocolo de purificación. Para la expresión se ha seleccionado la cepa *Rosetta Gami B*, esto es debido a que en la secuencia codificante ScFv_{HER2} se incluyen numerosos codones no frecuentes en bacterias, por lo que el uso de esta cepa que codifica para tRNA correspondientes a estos codones produjo un incremento significativo de los niveles de expresión. La

temperatura de inducción se seleccionó a 30°C, ya que la inducción a esta temperatura produce los mayores niveles de proteína soluble y finalmente el protocolo de purificación basado principalmente en una cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC), permitió la obtención de una proteína de fusión soluble, purificada y con niveles de endonucleasas no detectables lo que posibilitaba su uso posterior.

Antes de proceder al uso de la proteína recombinante en el desarrollo de la plataforma teragnóstica era necesario confirmar que la proteína de fusión mantenía por una parte la capacidad de unir derivados maltosilados; y por otra parte el ScFv_{HER2} era capaz de reconocer a HER2, tanto en extractos celulares como en la superficie de células tumorales. La capacidad de unir derivados maltosilados fue establecida fácilmente mediante el uso de NIR-Mal y un análisis de los espectros de emisión de fluorescencia en presencia y ausencia de la proteína de fusión. El análisis del mantenimiento de la capacidad de reconocimiento de HER2 implicó el marcaje de la proteína de fusión mediante el uso de un agente de marcaje doble (fluorescenina y biotina) basado en vinil sulfona y desarrollado por el grupo del Profesor Santoyo. Estos reactivos basados en vinil sulfonas reaccionan covalentemente con colas de poliHis y por tanto permiten la modificación covalente de la proteína sin alterar la secuencia del ScFv. Experimentos de proteólisis de la proteína de fusión con proteasa TEV, nos permitieron confirmar este extremo. El uso de esta proteína de fusión marcada nos permitió mediante técnicas de Western blot confirmar el mantenimiento de la capacidad de unión al epítipo HER2 en extractos celulares.

Una vez obtenidas y validadas las funciones de la proteína de fusión (unir ligandos maltosilados y reconocer específicamente lisados de células que expresan HER2), era necesario confirmar la hipótesis de trabajo y determinar si la plataforma era capaz de poder ser utilizada como agente de diagnóstico por imagen. Si era capaz de unir y transportar fármacos y si podía ser utilizada en transfección de células eucariotas. Todas estas capacidades de la nanopartícula debían ser específicas y dirigidas hacia una diana concreta, el receptor HER2.

Una de las aplicaciones mencionadas al inicio de la discusión y fundamental en un teragnóstico es la de presentar capacidad de diagnóstico por imagen [203]. Para analizar esta funcionalidad se han utilizado dos aproximaciones. Por un lado, se ha usado NIR-Mal que se une como acabamos de demostrar al centro activo de la MBP, dando lugar a una nanopartícula fluorescente. La fluorescencia emitida por NIR, un derivado de cianina, es una radiación de baja frecuencia que no produce un daño ionizante como otras técnicas de diagnóstico por imagen como es el caso de los Rayos X; tiene baja autofluorescencia y una capacidad para penetrar en los tejidos, que hace que sea un fluoróforo atractivo para la obtención de imágenes de forma no invasiva. Además, su espectro de emisión se encuentra alejado de la longitud de onda de otros cromóforos como la hemoglobina o la mioglobina, por lo que no se presentarán interferencias en la obtención de imágenes [46]. La fluorescencia de NIR-Mal en un medio acuoso es muy pequeña, debido a la agregación de las cianinas. Sin embargo, cuando se une el NIR-Mal a la MBP se observa un aumento significativo de la fluorescencia producida por el

desapilamiento de las moléculas de NIR [201]. Además, como ya se ha descrito y como control positivo, la proteína de fusión se marcó fluorescentemente utilizándose un agente de marcado doble [185], que se une a la cola de histidinas sin alterar la funcionalidad del ScFv.

La detección de células HER2+ se realizó por microscopía confocal de fluorescencia utilizando NIR-Mal-MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} y FL-MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}. Ambas moléculas se detectaron en la membrana plasmática de las células tumorales que sobre-expresan receptores HER2, y no en las células HER2-. La localización en la membrana es compatible con la localización celular del receptor, el hecho que sea específico hacia células HER2+ nos permite afirmar que la plataforma MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} se puede utilizar para el diagnóstico *in vitro* de células tumorales HER2+.

Si se pretende utilizar esta nanopartícula en diagnóstico, ésta debe ser capaz de poderse utilizar *in vivo*. Para ello, se usaron ratones NSG que presentaban xenografts de células SKBR3 (HER2+). NIR-Mal-MBP_{1334W}-ScFv_{HER2}, que se usó como agente de diagnóstico, se detectó específicamente en el tumor y en las metástasis hepáticas que presentaban los animales (**Figura 5.22**). Los animales que fueron inyectados con NIR-Mal presentaban una fluorescencia menor en los tumores, lo que corrobora nuestros estudios previos [203], ya que el colorante NIR presenta una afinidad hacia células tumorales.

En la actualidad la tomografía por emisión de positrones es la técnica más utilizada como biomarcador para pacientes con cáncer de mama que presentan el receptor HER2. Esta técnica es sensible y de precisión, sin embargo presenta la desventaja del uso de radionúclidos: tienen una vida media baja en la circulación sanguínea, son poco penetrantes y se observan señales en otros tejidos como el hígado y médula ósea, dificultando la discriminación del tejido tumoral [226]. Los resultados obtenidos experimentalmente en esta tesis demuestran que el empleo de NIR-Mal-MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} puede sustituir los radionúclidos como reactivos de diagnóstico.

Estos resultados nos permiten concluir que la molécula NIR-Mal-MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} puede utilizarse en el diagnóstico por imagen de células tumorales HER2+ tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, y por tanto, cumple con una de las premisas para ser un teragnóstico, que es la de permitir el diagnóstico o el seguimiento de la eficacia en el tratamiento del cáncer, porque permitiría visualizar la remisión del tumor o de las metástasis.

Además, de permitir el diagnóstico y seguimiento de cánceres, un teragnóstico tiene otra característica principal que es su capacidad de transportar fármacos. Por tanto, el estudio de la capacidad de MBP_{1334W}-ScFv_{HER2} para el transporte dirigido tanto de fármacos como de ácidos nucleicos constituyó la segunda parte de la caracterización de una nanopartícula.

Para el análisis de la capacidad para transportar fármacos, se utilizó un derivado maltosilado en el que la maltosa se unió a polietilenimina (PEI) de 2kDa y a este PEI se le unieron 4 moléculas de β CD por enlaces vinilsulfona. Este compuesto, denominado β CDbPEI2k-Mal, puede utilizarse para el transporte de fármacos, ya que las β CD pueden incluir moléculas en la cavidad hidrofóbica que presentan. La principal ventaja de vehiculizar fármacos, generalmente hidrofóbicos y de pequeño tamaño, es la de conseguir una mayor biodisponibilidad y estabilidad, además de evitar las interacciones entre los fármacos o con otras moléculas.

En los experimentos presentados en esta Tesis Doctoral se ha vehiculizado doxorubicina (DOX) por ser un medicamento frecuentemente empleado en el tratamiento del cáncer, y en concreto junto con la epirubicina para el tratamiento de tumores HER2+. No obstante, al basarse el transporte en el uso de ciclodextrinas en nuestro sistema, cualquier fármaco de naturaleza hidrofóbica, por ejemplo paxitacel, que se acomode en la cavidad central de estas moléculas podría ser empleado, lo que aumenta la versatilidad de la plataforma que aquí presentamos.

La DOX es un compuesto citotóxico que actúa bloqueando la replicación del DNA al tratarse de un agente intercalante formando aductos con el DNA al establecer puentes de hidrógeno con la guanina en los sitios con numerosas guaninas-citosinas adyacentes, causando daño en el material genético [206]. Al mismo tiempo, la citotoxicidad de la DOX también se debe a que estabiliza el complejo que forma la topoisomerasa II con el material genético durante la replicación, evitando así la separación del DNA de la enzima y produciendo su rotura. Una limitación de la doxorubicina es el desarrollo de las resistencias debido a la sobre-expresión de los transportadores ABC (glicoproteínas Pgp/ABCB1), las proteínas MRPs (*multidrug resistance-associated proteins*) y la BCRP (*breast cancer resistance protein*) [204]. La resistencia a la doxorubicina forma parte de una resistencia combinada a varios agentes quimioterapéuticos conocida como resistencia MDR (*multidrug resistance*) que afecta a más del 70% de los tumores y favorece la progresión tumoral, la formación de las metástasis y las recidivas [227]. Por el contrario, la inhibición por parte de la DOX sobre la topoisomerasa II- β presente en los cardiomiocitos va a ocasionar la cardiotoxicidad de este fármaco como efecto secundario más importante [228].

La DOX carece de especificidad hacia las células tumorales, pero al ocluir la en las β -CD [229] y vehiculizarla específicamente hacia células que expresen HER2, aumentaría su eficacia y disminuiría sus efectos secundarios al minimizarse sus efectos sobre células sanas. La unión de [DOX- β CDbPEI2k-Mal] a la plataforma teragnóstica dio lugar a un compuesto [DOX- β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{I334W}-ScFV_{HER2}] que se utilizó para comprobar que la entrada del mismo era mayor en las células que expresaban receptores HER2 mediante experimentos de captación y microscopia confocal aprovechando que DOX es una molécula fluorescente que emite en el espectro visible.

Este mismo complejo se utilizó para estudiar la citotoxicidad de la DOX vehiculizada en el vector teragnóstico. Los resultados del ensayo de viabilidad celular respaldan los datos obtenidos de captación y microscopía confocal. Se ha observado un incremento en la muerte celular de las células HER2+ incubadas con [DOX- β CD β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{I334W}-ScFV_{HER2}] con respecto a las incubadas con DOX libre. Esta mayor citotoxicidad con respecto a DOX libre no aparece cuando células MDA-MB-231, que carecen del receptor, se incuban con [DOX- β CD β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{I334W}-ScFV_{HER2}].

Los datos de viabilidad celular mostraron que la molécula teragnóstica MBP_{I334W}-ScFV_{HER2} per se, produce una mayor citotoxicidad incluso que la DOX libre. Esto es debido a que el ScFV_{HER2} debe tener un mecanismo de acción parecido al del propio Herceptin®. Cuando el Herceptin® se une a su receptor HER2 se produce una disminución en el crecimiento celular, ya que se reduce la señalización dependiente de PI3K/AKT y MAPKs [230]. Para establecer las bases moleculares del efecto citotóxico de ScFV_{HER2}, se incubaron células HER2+ y HER2- en ausencia o presencia de Herceptin® o de la proteína de fusión MBP_{I334W}-ScFV_{HER2} durante 48 horas. El análisis del estado de fosforilación de AKT y ERK1/2 permitió concluir que la proteína de fusión era citotóxica porque disminuía la señalización dependiente de estas dos quinasas solo en las células HER2+. Por ello, se podría sugerir que la propia molécula directora, MBP_{I334W}-ScFV_{HER2} se considerase como una alternativa a la Herceptin® para el tratamiento de cánceres HER2+, con la ventaja adicional de poderse usar en diagnóstico. Por último, el complejo [DOX- β CD β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{I334W}-ScFV_{HER2}] producía una reducción adicional en la viabilidad celular en células que expresan receptores HER2, por lo que se produce un efecto sinérgico entre los mecanismos de muerte celular dependientes de ScFV_{HER2} y la DOX específicamente vehiculizada a este tipo de células.

Se puede concluir que se dispone de una nanopartícula con capacidad de transportar fármacos de forma específica hacia células HER2. Es citotóxica *per se* debido a la capacidad de inhibir la señalización de rutas que conducen al crecimiento y división celular. Además, al poder transportar fármacos antineoplásicos vehiculizados en las β CD su capacidad citotóxica es aún mayor [231].

Un paso importante en la caracterización biológica de la plataforma teragnóstica fue la de confirmar que es posible su uso para dirigir fármacos específicamente a xenografts de células HER2+ en un modelo animal. En este caso y puesto que el espectro de la DOX coincide con el de otros cromóforos biológicos como la hemoglobina o hemoglobina, se ha utilizado como sustituto de DOX el fluoróforo indocianina Green (ICG) que presenta un espectro de emisión en el infrarojo cercano [208].

Los ratones inyectados con [ICG- β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFV_{HER2}] mostraron una fluorescencia localizada en el tumor y en el hígado, mientras que los ratones inyectados con [ICG- β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}] solo localizaron la señal en el hígado. La aparición de señal en el hígado puede deberse en parte a la disociación de la Maltosa de la proteína MBP_{1334W}. Este dato nos muestra probablemente la necesidad de incorporar mutaciones adicionales en MBP para aumentar la afinidad por sus ligandos y evitar esta disociación, con lo que se incrementaría la especificidad del tratamiento. Por tanto, el complejo [ICG- β CDbPEI2k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFV_{HER2}] se dirige específicamente a las células tumorales, lo que podría traducirse en una disminución de la dosis de fármaco a emplear que junto a la selectividad provocarían una disminución los efectos secundarios derivados del tratamiento, y un aumento de la calidad de vida de los pacientes.

Por último, y una vez demostrada la capacidad de [MBP_{1334W}-ScFV_{HER2}] como transportador de fármacos de forma dirigida hacia células HER2, se ha evaluado si esta plataforma podría utilizarse como vector de transfección. En este caso, el derivado maltosilado utilizado como ligando consistió en PEI25kDa ramificado, un polímero catiónico con capacidad demostrada como vector de transfección [232, 233] al que se le han unido cinco moléculas de maltosa por enlaces vinilsulfona (bPEI25k-Mal). Esta molécula presenta capacidad para formar complejos con DNA y protegerlo de la acción de las DNAsas [203, 234] y los primeros experimentos realizados demostraron que la decoración del complejo bPEI25k-Mal/DNA con la MBP o la proteína de fusión tampoco afectó su capacidad de unión y protección del DNA. Así, mientras que el PEI, a través de las cargas positivas de los grupos amino se une por fuerzas electrostáticas al DNA, las maltosas se unen a la MBP_{1334W} o MBP_{1334W}-ScFV_{HER2} a través del centro activo de la MBP.

Primero, la viabilidad de usar este sistema como un agente de transfección dirigido se ensayó en cultivos celulares, usando como DNA el plásmido pEGFP-N3. Este plásmido codifica para la proteína fluorescente verde y por tanto permite determinar la eficiencia de la transfección mediante la medida de la fluorescencia debida a esta proteína en los extractos celulares de las células transfectadas. Nuestros resultados muestran que la unión [bPEI25k-Mal]-[MBP_{1334W}-ScFV_{HER2}] y el DNA pEGFP-N3, ha demostrado un aumento significativo de la eficiencia de transfección en las células que presentan el receptor HER2 (**Figura 5.31 A**). Se demuestra que la proteína de fusión cumple la función de entrega específica del material genético. Para asegurarse de esta especificidad y de que la entrada se produce vía receptor HER2 dependiente, incubamos previamente las células con concentraciones crecientes de Herceptin® (**Figura 5.31 B**), para bloquear el receptor HER2. En este caso, la preincubación con el anticuerpo produjo una disminución dosis dependiente de la eficiencia de transfección, lo que nos permite concluir que la entrada del plásmido es dependiente del receptor HER2 y por tanto es específica para este tipo de células.

El último ensayo pretende demostrar la implementación de un sistema de transporte de genes. Se realizó *in vivo* ya que muchos agentes de transfección de ácidos nucleicos eficientes para la transfección celular *in vitro*, no son capaces de replicar su efecto *in vivo*. En nuestro caso de [bPEI25k-Mal]-[MBP_{I334W}-ScFV_{HER2}], se ha demostrado su capacidad para transfectar un plásmido (luciferasa) de manera selectiva en ratones con xenografts de células de cáncer de mama HER2+ (SKBR3) (**Figura 5.32**), confirmándose que la proteína de fusión tiene potencial de mediar la transfección *in vivo* de una manera específica.

La plataforma teragnóstica que se propone, al menos en estos estudios iniciales parece que es válida para el diagnóstico, transporte de medicamentos y transfección génica. La especificidad del sistema basada en su capacidad de direccionar los agentes terapéuticos y de diagnóstico es uno de sus puntos fuertes. La versatilidad del sistema es el otro punto a valorar. La posibilidad de cambiar la secuencia codificante del anticuerpo empleado hacia otras dianas moleculares y la capacidad de usar diferentes ligandos maltosilados para cada una de las funciones de nuestra plataforma son los dos pilares fundamentales de la versatilidad.

Es importante destacar que se trata de una aproximación experimental, en células y en ratones, muy lejana aún de la posibilidad de su aplicación en tratamientos reales a pacientes y que por tanto es más una prueba de concepto que el desarrollo real de un medicamento, pero consideramos que al menos los resultados iniciales son prometedores. Quedan bastantes aspectos por mejorar. Por ejemplo incrementar la afinidad de la MBP por los derivados maltosilados para evitar la disociación prematura de los complejos formados. Otro aspecto a contemplar es la posible inmunogenicidad del uso de la MBP administrada por vía parenteral. Tal y como hoy es factible la humanización de anticuerpos para evitar la respuesta inmune del organismo, sería posible realizar mutaciones de la MBP que disminuyeran la presencia en la misma de epítomos potencialmente inmunógenos. Finalmente, la validación usando otros anticuerpos o proteínas directoras del sistema así como otros agentes terapéuticos diferentes de la DOX será necesaria.

7. Conclusiones

Se ha generado un novedoso agente teragnóstico dirigido basado en una proteína de fusión que incluye una versión mutada de la proteína de unión a maltosa, que presenta la capacidad de unir derivados maltosilados y un anticuerpo ScFv que actúa como molécula directora hacia una diana molecular. Es un sistema versátil ya que la modificación de la secuencia codificante del anticuerpo permite dirigir el vector hacia diferentes dianas moleculares, mientras el uso de diferentes ligandos maltosilados permite su empleo en técnicas de diagnóstico, transporte de fármacos o transfección de ácidos nucleicos.

El sistema se ha validado experimentalmente generando un vector dirigido a células de cáncer de mama HER2+. Los resultados obtenidos en este sistema modelo permiten concluir:

1. Es posible diseñar un sistema de expresión heterólogo para una proteína de fusión que contiene una versión mutada de la proteína de unión a maltosa, MBP_{1334W}, con mayor afinidad de unión para derivados maltosilados y un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla frente a HER2 que retiene la capacidad de reconocer a su diana molecular.
2. A través del uso de derivados maltosilados fluorescentes, NIR-Mal, esta plataforma permite la visualización selectiva de células HER2+ tanto *in vitro* como *in vivo*.
3. La proteína de fusión es capaz de transportar selectivamente a células que expresen el receptor HER2 tanto *in vitro* como *in vivo* DOX o fármacos que puedan ser ocluidos en ciclodextrinas.
4. La plataforma, utilizando polímeros catiónicos maltosilados como ligando es capaz de mediar una transfección específica de material genético a células HER2+ *in vitro* e *in vivo*.

8. Bibliografía

1. Observatory, G.C. *Cancer Statistics*. 2020; Available from: <https://gco.iarc.fr/>.
2. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018. **68**(6): p. 394-424.
3. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2019. **69**(1): p. 7-34.
4. Surveillance, E., and End Results. *Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer*. 2021; Available from: <https://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>.
5. Society, A.C. *Economic Impact of Cancer*. 2020; Available from: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/economic-impact-of-cancer.html>.
6. OMS. *Datos y cifras sobre el cáncer*. 2018; Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
7. Coleman, M.P., et al., *Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD)*. The Lancet Oncology, 2008. **9**(8): p. 730-756.
8. Stingl, J., et al., *Epithelial progenitors in the normal human mammary gland*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005. **10**(1): p. 49-59.
9. Graña, X. and E.P. Reddy, *Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)*. Oncogene, 1995. **11**(2): p. 211-9.
10. Hartwell, L.H. and M.B. Kastan, *Cell cycle control and cancer*. Science, 1994. **266**(5192): p. 1821-8.
11. Reddy, K.B., *Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options*. Current oncology (Toronto, Ont.), 2011. **18**(4): p. e173-e179.
12. Akram, M., et al., *Awareness and current knowledge of breast cancer*. Biological research, 2017. **50**(1): p. 33-33.
13. Cavalieri, E., et al., *Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1766**(1): p. 63-78.
14. Riese II, D.J. and D.F. Stern, *Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network*. BioEssays, 1998. **20**(1): p. 41-48.
15. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(2): p. 127-137.
16. Hynes, N.E. and H.A. Lane, *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(5): p. 341-354.
17. Goutsouliak, K., et al., *Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2020. **17**(4): p. 233-250.
18. Parakh, S., et al., *Evolution of anti-HER2 therapies for cancer treatment*. Cancer Treatment Reviews, 2017. **59**: p. 1-21.
19. Normanno N1, B.C., De Luca A, Maiello MR, Salomon DS, *Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment*. Endocrine-Related Cancer, 2003. **10**(1): p. 1-21.
20. Rabindran, S.K., *Antitumor activity of HER-2 inhibitors*. Cancer Letters, 2005. **227**(1): p. 9-23.
21. Zhang, D., et al., *Evaluation of HER-2/neu oncogene status in breast tumors on tissue microarrays*. Human Pathology, 2003. **34**(4): p. 362-368.
22. Oh, D.-Y. and Y.-J. Bang, *HER2-targeted therapies — a role beyond breast cancer*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2020. **17**(1): p. 33-48.
23. Normanno, N., et al., *The ErbB Receptors and their Ligands in Cancer: An Overview*. Current Drug Targets, 2005. **6**(3): p. 243-257.

24. Hynes, N.E. and G. MacDonald, *ErbB receptors and signaling pathways in cancer*. Current Opinion in Cell Biology, 2009. **21**(2): p. 177-184.
25. Gonciar, D., et al., *Cardiotoxicity in HER2-positive breast cancer patients*. Heart Failure Reviews, 2021.
26. Slamon, D., et al., *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. Science, 1989. **244**(4905): p. 707-712.
27. Deeley, T.J., *A brief history of cancer*. Clinical Radiology, 1983. **34**(6): p. 597-608.
28. Morton, L.T. and R.J. Moore, *A Chronology of Medicine and Related Sciences*. 1997: Scolar Press.
29. Health, N.I.o.; Available from: <https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/tomograf%C3%ADa-computarizada-tc>.
30. Shampo, M.A. and R.A. Kyle, *Karl Theodore Dussik—Pioneer in Ultrasound*. Mayo Clinic Proceedings, 1995. **70**(12): p. 1136.
31. Bagheri, M.H., et al., *Advances in medical imaging for the diagnosis and management of common genitourinary cancers*. Urol Oncol, 2017. **35**(7): p. 473-491.
32. Riederer, S.J., *MR Imaging: Its Development and the Recent Nobel Prize*. Radiology, 2004. **231**(3): p. 628-631.
33. Shah, K., et al., *Molecular imaging of gene therapy for cancer*. Gene Therapy, 2004. **11**(15): p. 1175-1187.
34. Cimini, A., et al., *Theragnostic Aspects and Radioimmunotherapy in Pediatric Tumors*. International journal of molecular sciences, 2020. **21**(11): p. 3849.
35. Medicine, U.S.N.L.o. *Tomography, Emission-Computed, Single-Photon*. 2019; Available from: <https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?name=SPECT>.
36. Walker, R.C., et al., *Introduction to PET Imaging with Emphasis on Biomedical Research*. NeuroToxicology, 2004. **25**(4): p. 533-542.
37. Phelps, M.E., *PET: The Merging of Biology and Imaging into Molecular Imaging*. Journal of Nuclear Medicine, 2000. **41**(4): p. 661-681.
38. Choy G, C.P., Libutti SK, *Current Advances in Molecular Imaging: Noninvasive in Vivo Bioluminescent and Fluorescent Optical Imaging in Cancer Research*. Mol Imaging, 2003. **2**(4).
39. Gerdes, H.-H. and C. Kaether, *Green fluorescent protein: applications in cell biology*. FEBS Letters, 1996. **389**(1): p. 44-47.
40. Ellenberg, J., J. Lippincott-Schwartz, and J.F. Presley, *Dual-colour imaging with GFP variants*. Trends in Cell Biology, 1999. **9**(2): p. 52-56.
41. Ntziachristos, V., C. Bremer, and R. Weissleder, *Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging*. European Radiology, 2003. **13**(1): p. 195-208.
42. Ntziachristos, V., et al., *Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo*. Nature Medicine, 2002. **8**(7): p. 757-761.
43. Ntziachristos, V., *FLUORESCENCE MOLECULAR IMAGING*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2006. **8**(1): p. 1-33.
44. Martí-Bonmatí, L., et al., *Multimodality imaging techniques*. Contrast Media & Molecular Imaging, 2010. **5**(4): p. 180-189.
45. Zeineldin, R., *Nanotechnology for cancer screening and diagnosis*, in *Biomaterials for Cancer Therapeutics*, K. Park, Editor. 2013, Woodhead Publishing. p. 137-164.
46. Zhu, S., et al., *Near-Infrared-II (NIR-II) Bioimaging via Off-Peak NIR-I Fluorescence Emission*. Theranostics, 2018. **8**(15): p. 4141-4151.
47. Luo, S., et al., *A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging*. Biomaterials, 2011. **32**(29): p. 7127-7138.
48. Li, H., et al., *Folate-receptor-targeted NIR-sensitive polydopamine nanoparticles for chemo-photothermal cancer therapy*. Nanotechnology, 2017. **28**(42): p. 425101.

49. Zhang, X., et al., *Tumor microenvironment-activated NIR-II reagents for tumor imaging and therapy*. Journal of Materials Chemistry B, 2020. **8**(22): p. 4738-4747.
50. Beć, K.B., J. Grabska, and C.W. Huck, *NIR spectroscopy of natural medicines supported by novel instrumentation and methods for data analysis and interpretation*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021. **193**: p. 113686.
51. Shi, S.-W., et al., *Targeted and NIR light-controlled delivery of nitric oxide combined with a platinum(iv) prodrug for enhanced anticancer therapy*. Journal of Materials Chemistry B, 2019. **7**(11): p. 1867-1874.
52. Cong, W., X. Intes, and G. Wang, *Optical tomographic imaging for breast cancer detection*. Journal of biomedical optics, 2017. **22**(9): p. 1-6.
53. Tummers, Q.R.J.G., et al., *Real-time intraoperative detection of breast cancer using near-infrared fluorescence imaging and Methylene Blue*. European journal of surgical oncology, 2014. **40**(7): p. 850-858.
54. Shao, X., W. Zheng, and Z. Huang, *Polarized near-infrared autofluorescence imaging combined with near-infrared diffuse reflectance imaging for improving colonic cancer detection*. Optics Express, 2010. **18**(23): p. 24293-24300.
55. Cao, J., et al., *Recent Progress in NIR-II Contrast Agent for Biological Imaging*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2020. **7**: p. 487-487.
56. Zhang, X., et al., *Near-infrared molecular probes for in vivo imaging*. Current protocols in cytometry, 2012. **Chapter 12**: p. Unit12.27-Unit12.27.
57. Wang, Y. and L. Chen, *Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2011. **7**(4): p. 385-402.
58. Nurunnabi, M., et al., *Targeted near-IR QDs-loaded micelles for cancer therapy and imaging*. Biomaterials, 2010. **31**(20): p. 5436-5444.
59. Nel, A., et al., *Toxic Potential of Materials at the Nanolevel*. Science, 2006. **311**(5761): p. 622.
60. Nikoobakht, B. and M.A. El-Sayed, *Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method*. Chemistry of Materials, 2003. **15**(10): p. 1957-1962.
61. Resch-Genger, U., et al., *Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels*. Nature Methods, 2008. **5**: p. 763.
62. Cancer.gov. *Breast cancer treatment*. 2021; Available from: <https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq>.
63. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2015. **65**(2): p. 87-108.
64. Slamon, D.J., et al., *Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2*. New England Journal of Medicine, 2001. **344**(11): p. 783-792.
65. Carneiro, B.A. and W.S. El-Deiry, *Targeting apoptosis in cancer therapy*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2020. **17**(7): p. 395-417.
66. Sørli, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(19): p. 10869-10874.
67. Chen, W., Z. Sun, and L. Lu, *Targeted Engineering of Medicinal Chemistry for Cancer Therapy: Recent Advances and Perspectives*. Angewandte Chemie International Edition. **n/a**(n/a).
68. Fisher, B., et al., *Twenty-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Total Mastectomy, Lumpectomy, and Lumpectomy plus Irradiation for the Treatment of Invasive Breast Cancer*. New England Journal of Medicine, 2002. **347**(16): p. 1233-1241.

69. Vicini, F.A., et al., *Optimizing breast cancer treatment efficacy with intensity-modulated radiotherapy*. International Journal of Radiation Oncology*Biophysics, 2002. **54**(5): p. 1336-1344.
70. AECC. *Quimioterapia*. 2019; Available from: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tratamientos/quimioterapia/que-es-quimioterapia>.
71. Reichman, B.S., et al., *Paclitaxel and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor as initial chemotherapy for metastatic breast cancer*. Journal of Clinical Oncology, 1993. **11**(10): p. 1943-1951.
72. Seidman, A.D., et al., *Phase II trial of paclitaxel by 3-hour infusion as initial and salvage chemotherapy for metastatic breast cancer*. Journal of Clinical Oncology, 1995. **13**(10): p. 2575-2581.
73. Vademecum. *Principios activos*. 2019; Available from: <https://www.vademecum.es/>.
74. Hassan, M.S., Ansari, J., Spooner, D., & Hussain, S.A., *Chemotherapy for breast cancer (Review)*. Oncology Reports, 2010. **24**: p. 1121-1131.
75. Su, H., et al., *Noninvasive molecular imaging of apoptosis in a mouse model of anthracycline-induced cardiotoxicity*. Circ Cardiovasc Imaging, 2015. **8**(2): p. e001952.
76. Wallace, K.B., V.A. Sardão, and P.J. Oliveira, *Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy*. Circulation research, 2020. **126**(7): p. 926-941.
77. Database, N.C.f.B.I.P. *Doxorubicin*, CID=31703. 2019; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin>.
78. Kwok, K.K., E.C. Vincent, and J.N. Gibson, *36 - Antineoplastic Drugs*, in *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry (Seventh Edition)*, F.J. Dowd, B.S. Johnson, and A.J. Mariotti, Editors. 2017, Mosby. p. 530-562.
79. Jordan, V.C., *Tamoxifen as the first targeted long-term adjuvant therapy for breast cancer*. 2014. **21**(3): p. R235.
80. Chesney, T.R., et al., *Tamoxifen with radiotherapy compared with Tamoxifen alone in elderly women with early-stage breast cancer treated with breast conserving surgery: A systematic review and meta-analysis*. Radiotherapy and Oncology, 2017. **123**(1): p. 1-9.
81. Shagufta and I. Ahmad, *Tamoxifen a pioneering drug: An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018. **143**: p. 515-531.
82. Henricks, L.M., et al., *The use of combinations of monoclonal antibodies in clinical oncology*. Cancer Treatment Reviews, 2015. **41**(10): p. 859-867.
83. Vu, T. and F.X. Claret, *Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer*. Frontiers in oncology, 2012. **2**: p. 62-62.
84. Hudis, C.A., *Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(1): p. 39-51.
85. Sekhon, N., R.A. Kumbhkar, and M. Mita, *Chapter 1 - Current Trends in Cancer Therapy*, in *Cardio-Oncology*, R.A. Gottlieb and P.K. Mehta, Editors. 2017, Academic Press: Boston. p. 1-24.
86. Kunte, S., J. Abraham, and A.J. Montero, *Novel HER2-targeted therapies for HER2-positive metastatic breast cancer*. Cancer, 2020. **126**(19): p. 4278-4288.
87. Watkins, N.A. and W.H. Ouwehand, *Introduction to Antibody Engineering and Phage Display*. Vox Sanguinis, 2000. **78**(2): p. 72-79.
88. Skerra, A. and A. Pluckthun, *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli*. Science, 1988. **240**(4855): p. 1038-1041.
89. Akbari, V., C.P. Chou, and D. Abedi, *New insights into affinity proteins for HER2-targeted therapy: Beyond trastuzumab*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2020. **1874**(2): p. 188448.
90. Cheong, W.S., et al., *Diagnostic and therapeutic potential of shark variable new antigen receptor (VNAR) single domain antibody*. International journal of biological macromolecules, 2020. **147**: p. 369-375.

91. Ahmad, Z.A., et al., *scFv antibody: principles and clinical application*. Clinical & developmental immunology, 2012. **2012**: p. 980250-980250.
92. Tiller, K.E. and P.M. Tessier, *Advances in Antibody Design*. Annual review of biomedical engineering, 2015. **17**: p. 191-216.
93. Ahangarzadeh, S., et al., *An update on antiviral antibody-based biopharmaceuticals*. International immunopharmacology, 2020. **86**: p. 106760-106760.
94. Bannas, P., J. Hambach, and F. Koch-Nolte, *Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics*. Frontiers in immunology, 2017. **8**: p. 1603-1603.
95. Jain, M., N. Kamal, and S.K. Batra, *Engineering antibodies for clinical applications*. Trends in Biotechnology, 2007. **25**(7): p. 307-316.
96. Marques, A.C., et al., *Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies*. J Control Release, 2020. **320**: p. 180-200.
97. Thanindratarn, P., et al., *Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell immunotherapy for sarcomas: From mechanisms to potential clinical applications*. Cancer Treatment Reviews, 2020. **82**: p. 101934.
98. Emanuel, P.A., et al., *Recombinant antibodies: a new reagent for biological agent detection*. Biosensors and Bioelectronics, 2000. **14**(10): p. 751-759.
99. Yazaki, P.J., et al., *Mammalian expression and hollow fiber bioreactor production of recombinant anti-CEA diabody and minibody for clinical applications*. Journal of Immunological Methods, 2001. **253**(1): p. 195-208.
100. Husain, S.R., et al., *Gene therapy for cancer: regulatory considerations for approval*. Cancer gene therapy, 2015. **22**(12): p. 554-563.
101. Mirzaei, H., et al., *PiggyBac as a novel vector in cancer gene therapy: current perspective*. Cancer Gene Therapy, 2016. **23**: p. 45.
102. Mirzaei, H., et al., *Boron neutron capture therapy: Moving toward targeted cancer therapy*. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 2016. **12**(2): p. 520-525.
103. Bartel, D.P., *MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-297.
104. Ryther, R.C.C., et al., *siRNA therapeutics: big potential from small RNAs*. Gene Therapy, 2005. **12**(1): p. 5-11.
105. Makoto Miyagishi, K.T., *Strategies for Generation of an siRNA Expression Library Directed Against the Human Genome*. Oligonucleotides, 2003. **13**(5): p. 325-333.
106. Gaj, T., C.A. Gersbach, and C.F. Barbas, 3rd, *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering*. Trends in biotechnology, 2013. **31**(7): p. 397-405.
107. Hensel, G. and J. Kumlehn, *Genome Engineering Using TALENs*, in *Barley: Methods and Protocols*, W.A. Harwood, Editor. 2019, Springer New York: New York, NY. p. 195-215.
108. Kantor, A., M.E. McClements, and R.E. MaClaren, *CRISPR-Cas9 DNA Base-Editing and Prime-Editing*. International journal of molecular sciences, 2020. **21**(17): p. 6240.
109. Zhang, X., et al., *Engineering T Cells Using CRISPR/Cas9 for Cancer Therapy*, in *RNA Interference and CRISPR Technologies: Technical Advances and New Therapeutic Opportunities*, M. Sioud, Editor. 2020, Springer US: New York, NY. p. 419-433.
110. Ran, F.A., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. Nature Protocols, 2013. **8**: p. 2281.
111. Vermersch, E., C. Jouve, and J.-S. Hulot, *CRISPR/Cas9 gene-editing strategies in cardiovascular cells*. Cardiovascular Research, 2019. **116**(5): p. 894-907.
112. Recillas-Targa, F., *Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals*. Mol Biotechnol, 2006. **34**(3): p. 337-54.
113. Kim, T.K. and J.H. Eberwine, *Mammalian cell transfection: the present and the future*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2010. **397**(8): p. 3173-3178.

114. Pfeifer, A. and I.M. Verma, *Gene therapy: promises and problems*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001. **2**: p. 177-211.
115. Douglas, K.L., *Toward Development of Artificial Viruses for Gene Therapy: A Comparative Evaluation of Viral and Non-viral Transfection*. Biotechnology Progress, 2008. **24**(4): p. 871-883.
116. Shen, C., et al., *Polyethylenimine-based micro/nanoparticles as vaccine adjuvants*. International journal of nanomedicine, 2017. **12**: p. 5443-5460.
117. Zhupanyan, P., et al., *Extracellular vesicle (ECV)-modified polyethylenimine (PEI) complexes for enhanced siRNA delivery in vitro and in vivo*. Journal of Controlled Release, 2020. **319**: p. 63-76.
118. Zhang, Y., Z. Wang, and R.A. Gemeinhart, *Progress in microRNA delivery*. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2013. **172**(3): p. 962-974.
119. Rohiwal, S.S., et al., *Polyethylenimine based magnetic nanoparticles mediated non-viral CRISPR/Cas9 system for genome editing*. Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 4619-4619.
120. Patnaik, S. and K.C. Gupta, *Novel polyethylenimine-derived nanoparticles for in vivo gene delivery*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2013. **10**(2): p. 215-228.
121. Gosselin, M.A., W. Guo, and R.J. Lee, *Efficient Gene Transfer Using Reversibly Cross-Linked Low Molecular Weight Polyethylenimine*. Bioconjugate Chemistry, 2001. **12**(6): p. 989-994.
122. Bieber, T. and H.-P. Elsässer, *Preparation of a Low Molecular Weight Polyethylenimine for Efficient Cell Transfection*. BioTechniques, 2001. **30**(1): p. 74-81.
123. Hall, A., et al., *Polyplex Evolution: Understanding Biology, Optimizing Performance*. Molecular Therapy, 2017. **25**(7): p. 1476-1490.
124. Clara, J.A., et al., *Targeting signalling pathways and the immune microenvironment of cancer stem cells — a clinical update*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2020. **17**(4): p. 204-232.
125. Rizvi, S.A.A. and A.M. Saleh, *Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology*. Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society, 2018. **26**(1): p. 64-70.
126. Lee, J.J., L. Saiful Yazan, and C.A. Che Abdullah, *A review on current nanomaterials and their drug conjugate for targeted breast cancer treatment*. International journal of nanomedicine, 2017. **12**: p. 2373-2384.
127. Tran, S., et al., *Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery*. Clinical and Translational Medicine, 2017. **6**(1): p. e44.
128. Carvalho, A., A.R. Fernandes, and P.V. Baptista, *Chapter 10 - Nanoparticles as Delivery Systems in Cancer Therapy: Focus on Gold Nanoparticles and Drugs*, in *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*, S.S. Mohapatra, et al., Editors. 2019, Elsevier. p. 257-295.
129. McMillan, J., E. Batrakova, and H.E. Gendelman, *Cell delivery of therapeutic nanoparticles*. Progress in molecular biology and translational science, 2011. **104**: p. 563-601.
130. Prokop, A. and J.M. Davidson, *Nanovehicular Intracellular Delivery Systems*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **97**(9): p. 3518-3590.
131. Rizvi, S.A.A. and A.M. Saleh, *Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2018. **26**(1): p. 64-70.
132. Couvreur, P., *Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(1): p. 21-23.
133. Wicki, A., et al., *Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications*. Journal of Controlled Release, 2015. **200**: p. 138-157.
134. Che-Ming Jack, H. and Z. Liangfang, *Therapeutic Nanoparticles to Combat Cancer Drug Resistance*. Current Drug Metabolism, 2009. **10**(8): p. 836-841.

135. Illum, L., et al., *Tissue distribution of poly(hexyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles coated with monoclonal antibodies in mice bearing human tumor xenografts*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1984. **230**(3): p. 733-736.
136. Zong, Y., J. Wu, and K. Shen, *Nanoparticle albumin-bound paclitaxel as neoadjuvant chemotherapy of breast cancer: a systematic review and meta-analysis*. Oncotarget, 2017. **8**(10): p. 17360-17372.
137. Vivek, K.C., et al., *Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy*. Current Drug Metabolism, 2019. **20**(6): p. 416-429.
138. Funkhouser, J., *Reinventing pharma: The theranostic revolution*. 2002. 17-19.
139. Filippov, A., et al., *Role of theranostics in thoracic oncology*. Journal of thoracic disease, 2020. **12**(9): p. 5140-5146.
140. Vafaei, S., et al., *Potential theranostics of circulating tumor cells and tumor-derived exosomes application in colorectal cancer*. Cancer cell international, 2020. **20**: p. 288-288.
141. Fass, L., *Imaging and cancer: A review*. Molecular Oncology, 2008. **2**(2): p. 115-152.
142. Warenus, H.M., *Technological challenges of theranostics in oncology*. Expert Opinion on Medical Diagnostics, 2009. **3**(4): p. 381-393.
143. Beketic-Oreskovic, L.M., P. Ozretic, P.c, Oreskovic, D. Ajdukovic, M. Levanat, S., *Assessing the clinical significance of tumor markers in common neoplasms*. Frontiers in Bioscience, 2012. **4**(7): p. 2558-2578.
144. von Maltzahn, G., et al., *SERS-Coded Gold Nanorods as a Multifunctional Platform for Densely Multiplexed Near-Infrared Imaging and Photothermal Heating*. Advanced Materials, 2009. **21**(31): p. 3175-3180.
145. Park, J.-H., et al., *Cooperative Nanoparticles for Tumor Detection and Photothermally Triggered Drug Delivery*. Advanced Materials, 2010. **22**(8): p. 880-885.
146. Kang, C. and D. Kim, *Nanoconfinement-mediated cancer theranostics*. Archives of Pharmacal Research, 2020. **43**(1): p. 110-117.
147. Villiers, A., *Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique*. C. R. Acad. Sci., 1891. **112** p. 536 - 538.
148. Schardinger, F., *Bildung kristallisierter Polysaccharide (Dextrine) aus Stärkekleister durch Microben*. Zentrebl. Bakteriol. Parasitenkd., 1911. **29**(29): p. 188-197.
149. Rivero-Barbarroja, G., et al., *Cyclodextrin-Based Functional Glyconanomaterials*. Nanomaterials (Basel, Switzerland), 2020. **10**(12): p. 2517.
150. Crini, G., et al., *Fundamentals and Applications of Cyclodextrins*, in *Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis*, S. Fourmentin, G. Crini, and E. Lichtfouse, Editors. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 1-55.
151. Calixto, G.M.F., et al., *Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review*. Molecules (Basel, Switzerland), 2016. **21**(3): p. 342-342.
152. Tian, B., S. Hua, and J. Liu, *Cyclodextrin-based delivery systems for chemotherapeutic anticancer drugs: A review*. Carbohydrate Polymers, 2020. **232**: p. 115805.
153. Jansook, P., N. Ogawa, and T. Loftsson, *Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications*. International Journal of Pharmaceutics, 2018. **535**(1): p. 272-284.
154. Kurkov, S.V. and T. Loftsson, *Cyclodextrins*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. **453**(1): p. 167-180.
155. Brewster, M.E. and T. Loftsson, *Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(7): p. 645-666.
156. Loftsson, T. and M.E. Brewster, *Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996. **85**(10): p. 1017-1025.
157. Gadade, D.D. and S.S. Pekamwar, *Cyclodextrin Based Nanoparticles for Drug Delivery and Theranostics*. Advanced pharmaceutical bulletin, 2020. **10**(2): p. 166-183.

158. Duchêne, D. and A. Bochot, *Thirty years with cyclodextrins*. International Journal of Pharmaceutics, 2016. **514**(1): p. 58-72.
159. Fernández, M.A., et al., *Complex systems that incorporate cyclodextrins to get materials for some specific applications*. Carbohydrate Research, 2019. **480**: p. 12-34.
160. Hobbs, C., P. Řezanka, and M. Řezanka, *Cyclodextrin-Functionalised Nanomaterials for Enantiomeric Recognition*. ChemPlusChem, 2020. **85**(5): p. 876-888.
161. Aroul-Selvam, R., T. Hubbard, and R. Sasidharan, *Domain Insertions in Protein Structures*. Journal of Molecular Biology, 2004. **338**(4): p. 633-641.
162. Li, X., et al., *Different Anomeric Sugar Bound States of Maltose Binding Protein Resolved by a Cytolysin A Nanopore Tweezer*. ACS nano, 2020. **14**(2): p. 1727-1737.
163. Uniprot. *Maltose Binding Protein*. 2021; Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/POAEX9>.
164. Mächtel, R., et al., *An integrated transport mechanism of the maltose ABC importer*. Research in microbiology, 2019. **170**(8): p. 321-337.
165. Reuten, R., et al., *Maltose-Binding Protein (MBP), a Secretion-Enhancing Tag for Mammalian Protein Expression Systems*. PloS one, 2016. **11**(3): p. e0152386-e0152386.
166. Nallamsetty, S. and D.S. Waugh, *Mutations that alter the equilibrium between open and closed conformations of Escherichia coli maltose-binding protein impede its ability to enhance the solubility of passenger proteins*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **364**(3): p. 639-644.
167. Lebendiker, M. and T. Danieli, *Purification of Proteins Fused to Maltose-Binding Protein*, in *Protein Chromatography: Methods and Protocols*, D. Walls and S.T. Loughran, Editors. 2011, Humana Press: Totowa, NJ. p. 281-293.
168. Nguyen, M.T., et al., *Bacterial overexpression and purification of soluble recombinant human serum albumin using maltose-binding protein and protein disulphide isomerase*. Protein Expression and Purification, 2020. **167**: p. 105530.
169. Medintz, I.L. and J.R. Deschamps, *Maltose-binding protein: a versatile platform for prototyping biosensing*. Current Opinion in Biotechnology, 2006. **17**(1): p. 17-27.
170. Nickolaus, C., et al., *The Molten Globule State of Maltose-Binding Protein: Structural and Thermodynamic Characterization by EPR Spectroscopy and Isothermal Titration Calorimetry*. Applied Magnetic Resonance, 2020. **51**(9): p. 877-886.
171. Riggs, P., *Engineered Derivatives of Maltose-Binding Protein*. 2012.
172. Telmer, P.G. and B.H. Shilton, *Insights into the Conformational Equilibria of Maltose-binding Protein by Analysis of High Affinity Mutants*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(36): p. 34555-34567.
173. Walker, I.H., P.-c. Hsieh, and P.D. Riggs, *Mutations in maltose-binding protein that alter affinity and solubility properties*. Applied microbiology and biotechnology, 2010. **88**(1): p. 187-197.
174. Dwyer, M.A. and H.W. Hellings, *Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering*. Current Opinion in Structural Biology, 2004. **14**(4): p. 495-504.
175. Syamila, N., et al., *Interaction study of peptide-PAMAM as potential bio-nanogate for detecting anti-hepatitis B surface antigen*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020. **185**: p. 110623.
176. Younger, A.K.D., et al., *Engineering Modular Biosensors to Confer Metabolite-Responsive Regulation of Transcription*. ACS Synthetic Biology, 2017. **6**(2): p. 311-325.
177. Cailleau, R., et al., *Breast tumor cell lines from pleural effusions*. Journal of the National Cancer Institute, 1974. **53**(3): p. 661-674.
178. BATES, S.E., et al., *Expression of the Transforming Growth Factor- α /Epidermal Growth Factor Receptor Pathway in Normal Human Breast Epithelial Cells*. Endocrinology, 1990. **126**(1): p. 596-607.

179. Fogh, J., J.M. Fogh, and T. Orfeo, *One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 1977. **59**(1): p. 221-226.
180. Swift, S., et al., *Rapid Production of Retroviruses for Efficient Gene Delivery to Mammalian Cells Using 293T Cell-Based Systems*. Current Protocols in Immunology, 1999. **31**(1): p. 10.17.14-10.17.29.
181. Coughlan, A.M., et al., *Myeloid Engraftment in Humanized Mice: Impact of Granulocyte-Colony Stimulating Factor Treatment and Transgenic Mouse Strain*. Stem Cells Dev, 2016. **25**(7): p. 530-41.
182. Reid, G.A., *Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edn: by J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. \$115.00 (3 vols; 1659 pages) ISBN 0 87969 309 6*. Trends in Biotechnology, 1991. **9**(1): p. 213-214.
183. Song, E., et al., *Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(6): p. 709-17.
184. Greulich, H., et al., *Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(36): p. 14476-81.
185. Morales-Sanfrutos, J., et al., *Vinyl Sulfone Bifunctional Tag Reagents for Single-Point Modification of Proteins*. The Journal of Organic Chemistry, 2010. **75**(12): p. 4039-4047.
186. Nishimura, A., et al., *A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells*. Nucleic acids research, 1990. **18**(20): p. 6169-6169.
187. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. Journal of Molecular Biology, 1983. **166**(4): p. 557-580.
188. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical Biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
189. Mruk, D.D. and C.Y. Cheng, *Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits*. Spermatogenesis, 2011. **1**(2): p. 121-122.
190. Girón, M.D. and R. Salto, *From green to blue: Site-directed mutagenesis of the green fluorescent protein to teach protein structure–function relationships*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2011. **39**(4): p. 309-315.
191. Au - Laible, M. and K. Au - Boonrod, *Homemade Site Directed Mutagenesis of Whole Plasmids*. JoVE, 2009(27): p. e1135.
192. Torres, M., et al., *HqiA, a novel quorum-quenching enzyme which expands the AHL lactonase family*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 943-943.
193. Kucinska, M., et al., *Novel Promising Estrogenic Receptor Modulators: Cytotoxic and Estrogenic Activity of Benzanilides and Dithiobenzanilides*. PLOS ONE, 2016. **11**(1): p. e0145615.
194. Ortega-Muñoz, M., et al., *Polyethyleneimine-Coated Gold Nanoparticles: Straightforward Preparation of Efficient DNA Delivery Nanocarriers*. Chemistry – An Asian Journal, 2016. **11**(23): p. 3365-3375.
195. Nahta, R., M.-C. Hung, and F.J. Esteva, *The HER-2-Targeting Antibodies Trastuzumab and Pertuzumab Synergistically Inhibit the Survival of Breast Cancer Cells*. Cancer Research, 2004. **64**(7): p. 2343-2346.
196. Marvin, J.S. and H.W. Hellinga, *Manipulation of ligand binding affinity by exploitation of conformational coupling*. Nature Structural Biology, 2001. **8**(9): p. 795-798.
197. Sharff, A.J., et al., *Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis*. Biochemistry, 1992. **31**(44): p. 10657-10663.
198. van den Noort, M., M. de Boer, and B. Poolman, *Stability of ligand-induced protein conformation influences affinity in maltose-binding protein*. bioRxiv, 2021: p. 2021.02.26.433038.

199. Schrodinger, L. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0*. 2015; Available from: <https://www.pymol.org/2/>.
200. Rodrigues, C.H., D.E. Pires, and D.B. Ascher, *DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability*. *Nucleic Acids Research*, 2018. **46**(W1): p. W350-W355.
201. Hou, T.-C., et al., *Near-infrared fluorescence activation probes based on disassembly-induced emission cyanine dye*. *Chemical Science*, 2015. **6**(8): p. 4643-4649.
202. Morales-Sanfrutos, J., et al., *Vinyl sulfone: a versatile function for simple bioconjugation and immobilization*. *Org Biomol Chem*, 2010. **8**(3): p. 667-75.
203. De los Reyes-Berbel, E., et al., *PEI-NIR Heptamethine Cyanine Nanotheranostics for Tumor Targeted Gene Delivery*. *Bioconjugate Chemistry*, 2018. **29**(8): p. 2561-2575.
204. Edmondson, R., et al., *Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors*. *Assay Drug Dev Technol*, 2014. **12**(4): p. 207-18.
205. Vademecum. *Monografía de la Doxorubicina*. 2016; Available from: <https://www.vademecum.es/principios-activos-doxorubicina-l01db01>.
206. Yang, F., et al., *Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2014. **1845**(1): p. 84-89.
207. Nahta, R. and F.J. Esteva, *HER2 therapy: Molecular mechanisms of trastuzumab resistance*. *Breast Cancer Research*, 2006. **8**(6): p. 215.
208. Marshall, M.V., et al., *Near-Infrared Fluorescence Imaging in Humans with Indocyanine Green: A Review and Update*. *Open surgical oncology journal (Online)*, 2010. **2**(2): p. 12-25.
209. Godbey, W.T., K.K. Wu, and A.G. Mikos, *Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999. **45**(3): p. 268-275.
210. institute, N.c. *Cancer Stat Facts*. 2019; Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>.
211. Albanell, J. and J. Baselga, *Trastuzumab, a humanized anti-HER2 monoclonal antibody, for the treatment of breast cancer*. *Drugs of Today*, 1999. **35**: p. 931-946.
212. Figueroa-Magalhães, M.C., et al., *Treatment of HER2-positive breast cancer*. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 2014. **23**(2): p. 128-136.
213. Manijeh Mahdavi, M.K., Abbas Jafarian, Hassan Mohabatkar, Mohammad Rabbani, *Production and Characterization of New Anti-HER2 Monoclonal Antibodies*. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 2015. **34**(3): p. 213-221.
214. Taheri, A., et al., *Trastuzumab decorated methotrexate-human serum albumin conjugated nanoparticles for targeted delivery to HER2 positive tumor cells*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012. **47**(2): p. 331-340.
215. Ma, P., et al., *Targeted delivery of polyamidoamine-paclitaxel conjugate functionalized with anti-human epidermal growth factor receptor 2 trastuzumab*. *International journal of nanomedicine*, 2015. **10**: p. 2173-90.
216. Sun, B., B. Ranganathan, and S.-S. Feng, *Multifunctional Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide)/Montmorillonite (PLGA/MMT) Nanoparticles Decorated by Trastuzumab for Targeted Chemotherapy of Breast Cancer*. *Biomaterials*, 2008. **29**: p. 475-86.
217. Arya, G., et al., *Enhanced antiproliferative activity of Herceptin (HER2)-conjugated gemcitabine-loaded chitosan nanoparticle in pancreatic cancer therapy*. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 2011. **7**: p. 859-70.
218. Steinhauser, I.M., et al., *Effect of trastuzumab-modified antisense oligonucleotide-loaded human serum albumin nanoparticles prepared by heat denaturation*. *Biomaterials*, 2008. **29**(29): p. 4022-4028.
219. Huston, J.S., et al., *Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli*.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988. **85**(16): p. 5879-5883.
220. Satheeshkumar, P.K., *Expression of Single Chain Variable Fragment (scFv) Molecules in Plants: A Comprehensive Update*. Molecular biotechnology, 2020. **62**(3): p. 151-167.
 221. Bach, H., et al., *Escherichia coli maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies*. Journal of Molecular Biology, 2001. **312**: p. 79-93.
 222. Schier, R., et al., *Isolation of Picomolar Affinity Anti-c-erbB-2 Single-chain Fv by Molecular Evolution of the Complementarity Determining Regions in the Center of the Antibody Binding Site*. Journal of Molecular Biology, 1996. **263**(4): p. 551-567.
 223. Waugh, D., *The remarkable solubility-enhancing power of Escherichia coli maltose-binding protein*. Postepy biochemii, 2016. **62**: p. 377.
 224. Sun, P., J. Tropea, and D. Waugh, *Enhancing the Solubility of Recombinant Proteins in Escherichia coli by Using Hexahistidine-Tagged Maltose-Binding Protein as a Fusion Partner*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2011. **705**: p. 259-74.
 225. Kuntz, I.D., et al., *The maximal affinity of ligands*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(18): p. 9997-10002.
 226. Chen, F., et al., *Ultrasmall targeted nanoparticles with engineered antibody fragments for imaging detection of HER2-overexpressing breast cancer*. Nature Communications, 2018. **9**(1): p. 4141.
 227. Riganti, C., et al., *Mitochondrial-targeting nitrooxy-doxorubicin: a new approach to overcome drug resistance*. Mol Pharm, 2013. **10**(1): p. 161-74.
 228. Nebigil, C.G. and L. Désaubry, *Updates in Anthracycline-Mediated Cardiotoxicity*. Frontiers in Pharmacology, 2018. **9**(1262).
 229. Zhang, L., et al., *Folate-conjugated beta-cyclodextrin-based polymeric micelles with enhanced doxorubicin antitumor efficacy*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014. **122**: p. 260-269.
 230. Nahta, R. and F.J. Esteva, *HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(6): p. 215.
 231. Ivanova, J.L., et al., *Application of fusion protein 4D5 scFv-dibarnase:barstar-gold complex for studying P185HER2 receptor distribution in human cancer cells*. Biochimie, 2012. **94**(8): p. 1833-1836.
 232. Godbey, W.T., K.K. Wu, and A.G. Mikos, *Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery*. Journal of Controlled Release, 1999. **60**(2): p. 149-160.
 233. Godbey, W.T., K.K. Wu, and A.G. Mikos, *Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability*. Biomaterials, 2001. **22**(5): p. 471-480.
 234. Girón, M., et al., *Polyelectrolyte Complexes of Low Molecular Weight PEI and Citric Acid as Efficient and Nontoxic Vectors for in Vitro and in Vivo Gene Delivery*. Bioconjugate chemistry, 2016. **27**.