



Facultad de Ciencias Experimentales  
Departamento de Sistemas Físicos, Químicos y  
Naturales  
Área de Química Física  
Universidad Pablo de Olavide

Programa de Doctorado en  
Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química

# Direccionamiento de nanovectores a receptores del factor de crecimiento epidérmico para la terapia antitumoral

Memoria que presenta

Isabel de Lavera Calderón

Directores de Tesis:

Dra. Ana Paula Zaderenko Partida

Dr. David Cotán Marín







Facultad de Ciencias Experimentales  
Departamento de Sistemas Físicos, Químicos y  
Naturales  
Área de Química Física  
Universidad Pablo de Olavide

Dra. Ana Paula Zaderenko Partida

Dr. David Cotán Marín

CERTIFICAN:

Que Isabel de Lavera Calderón ha trabajado bajo su dirección en el trabajo titulado: **“Direccionamiento de nanovectores a receptores del factor de crecimiento epidérmico para terapia antitumoral”** que presenta para optar al grado de Doctora en la Universidad Pablo de Olavide.

En Sevilla, diciembre de 2021.



# Agradecimientos

*«La educación es el arma más poderosa para cambiar el mundo»  
Nelson Mandela*

*Nadie mejor que vosotros sabéis lo que ha costado llegar hasta aquí, os estaré eternamente agradecida.*

*A David Cotán, gracias por darme una oportunidad, por todo lo que me has enseñado, gracias por creer en mí y por estar siempre ahí.*

*A Paula Zaderenko, gracias por brindarme la oportunidad de trabajar contigo, por enseñarme cosas que me parecían de ciencia ficción y por hacer el trabajo tan divertido.*

*A José Antonio Sánchez, gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio, por darme la oportunidad de aprender tantísimo y por tener siempre unas palabras de ánimo.*

*A mis supernenas, Ana y Marina, con vosotras aprendí lo que es el trabajo en equipo. Gracias por todos momentos que hemos compartido juntas.*

*A Chema y Ángela, compañeros de batalla, se hizo más llevadera a vuestro lado.*

*A los “normales de sur”, Poni, Mariola, Julio, Jess, Ángela y Chema. No os hacéis una idea de cuánto echo de menos nuestros viernes en el ruta, y a vosotros también.*

*A Ceci, mi hermano, mi otra mitad, mi apoyo incondicional. Gracias por estar ahí siempre. Me ayudas más de lo crees y yo te necesito más de lo que pienso.*

*A Jose, mi mejor amigo, mi compañero de vida. No tengo espacio suficiente para poder agradecerte todo lo que me has apoyado. Gracias por hacerme sonreír cada día. Y gracias por darme el mejor regalo de todos, Cecilia.*

*«No hay barrera, cerradura, ni cerrojo que puedas imponer a la libertad de mi mente.»*  
*Virginia Woolf*

*Gracias mamá.*



# Resumen

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo según la organización mundial de la salud, y se estima que cada año se producen unos 10 millones de fallecimientos debido a esta enfermedad. Existen numerosos tipos de cáncer dependiendo del tipo celular y del órgano o la zona del cuerpo afectada, siendo unos pocos de ellos muy comunes. El cáncer de mama es el tipo de cáncer más diagnosticado (2,2 millones de casos al año), seguido del cáncer de pulmón y el colorrectal (alrededor de 2 millones de casos cada tipo). Estos tipos de neoplasias se asocian con una mayor expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR, y su papel en la patogénesis y progresión de los tumores ha convertido a este receptor en un objetivo fundamental en el desarrollo de terapias antitumorales.

Aunque en los últimos años las terapias dirigidas a EGFR han permitido que se mejore la eficacia de los tratamientos aumentando la esperanza de vida, los tumores con EGFR hiperexpresados aún presentan una peor clínica y, además, tienden a adquirir resistencia a dichos tratamientos debido a mutaciones o polimorfismos de un solo nucleótido y la expresión de los ligandos del receptor.

En este trabajo desarrollamos una terapia dirigida a EGFR, consistente en la conjugación de un ligando y/o un anticuerpo “bienespecífico” dirigido al receptor con un nanosistema de administración de fármacos. Como fármaco modelo hemos elegido el agente antitumoral camptotecina, debido a los problemas de administración que esta presenta, y como material constituyente del vector nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas, debido a las ventajas que estas ofrecen tanto en la propia síntesis de los nanovectores como en su posterior uso en diagnóstico y tratamiento antitumoral.

Nuestros resultados demuestran que la doble conjugación ligando/anticuerpo resulta en un efecto de sinergia, por lo que es más efectiva que la ejercida por ambos agentes de direccionamiento por separado, y la elección que hemos hecho de los ligandos de direccionamiento nos permite tratar tanto tumores triple negativos, como HER2+ y HER2- que sobreexpresen HER1. Además, la translocación del ligando al núcleo favorece la actividad antitumoral de la camptotecina. Por otra parte, la elevada capacidad de carga y eficiencia que presentan nuestros nanovectores los convierten en una muy buena alternativa para la administración de camptotecina, fármaco cuyo uso está severamente limitado por su inestabilidad química y escasa solubilidad.

# Índice



<b>Abreviaturas .....</b>	<b>1</b>
<b>Índice de figuras y tablas.....</b>	<b>5</b>
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1. Receptor del Factor del crecimiento epidérmico.....	3
2. Los receptores EGF y cáncer.....	9
3. Nanotecnología y nanomedicina .....	14
• <i>Nanopartículas magnéticas</i> .....	18
• <i>Nanopartículas Magnéticas en nanomedicina y cáncer</i> .....	21
4. Sistema expresión de vectores baculovíricos (BEVS) .....	24
<b>Capítulo 2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>29</b>
1. Materiales .....	31
2. Obtención de los ligandos de direccionamiento.....	33
• <i>Diseño de las secuencias</i> .....	33
• <i>Preparaciones de Vectores</i> .....	33
• <i>Obtención Working Viral Bank (WVB)</i> .....	34
• <i>Infección de células y Producción de Proteínas</i> .....	36
3. Análisis de proteínas por Western Blotting.....	39
• <i>Cuantificación de proteínas por el método de Lowry</i> .....	39
• <i>SDS-Page y Western-Blotting</i> .....	39
• <i>Dot-Blotting</i> .....	40
• <i>Inmunotinción con anticuerpos y revelado con líquido de electroquimioluminiscencia (ECL)</i> .....	40
4. Cultivos celulares .....	41
• <i>El ensayo de reconocimiento ligando-receptor.</i> .....	41
5. Análisis de la expresión y localización proteica por inmunofluorescencia .....	41
6. Análisis celular por Citometría de flujo .....	42

7.	Análisis de viabilidad celular .....	43
8.	Análisis estadístico y programas utilizados.....	43
9.	Síntesis de nanoconjugados .....	44
	• <i>Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro</i> .....	44
	• <i>Funcionalización en superficie con un polímero PEG Bis Amino terminado</i> 45	
	• <i>Encapsulación de CPT</i> .....	45
	• <i>Estudio de liberación de CPT</i> .....	46
10.	Caracterización Físico-Química de los nanoconjugados .....	47
	• <i>Espectroscopia Infrarroja (IR)</i> .....	47
	• <i>Dispersión Dinámica de Luz (DLS)</i> .....	47
	• <i>Espectroscopia UV-vis</i> .....	47
	• <i>Difracción de Rayos X (DRX)</i> .....	48
	• <i>Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)</i> .....	48
<b>Capítulo 3. Resultados y discusión .....</b>		<b>51</b>
1.	Ligandos de direccionamiento.....	53
	• <i>Diseño de las secuencias</i> .....	53
	• <i>Obtención de los vectores de transfección</i> .....	60
	• <i>Obtención Working Viral Bank</i> .....	64
	• <i>Obtención proteínas de interés</i> .....	67
2.	Líneas celulares y ensayo de reconocimiento .....	71
	• <i>Análisis de expresión de EGFR en diferentes líneas celulares</i> .....	71
	• <i>Internalización celular de los ligandos de direccionamiento</i> .....	72
3.	Síntesis y caracterización de nanoconjugados.....	74
4.	Efectividad de nanoconjugados .....	83
	• <i>Citotoxicidad Celular</i> .....	83
	• <i>Internalización celular</i> .....	87
	• <i>Apoptosis</i> .....	93
<b>Capítulo 4. Conclusiones .....</b>		<b>99</b>
<b>Capítulo 5. Bibliografía .....</b>		<b>105</b>





# Abreviaturas



<b>A431</b>	Línea celular de carcinoma epidermoide.
<b>AcMNPV</b>	Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AREG</b>	Anfirregulina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosin Trifostato
<b>BEVS</b>	Sistema expresión de vectores baculovíricos
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>BTC</b>	Betacelulina
<b>BV</b>	Budded Virus
<b>CHAPS</b>	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
<b>CPT</b>	Camptotecina
<b>CTCF</b>	Fluorescencia celular total corregida
<b>DAPI</b>	(4',6-diamidino-2-fenilindol)
<b>DL50</b>	Dosis Letal 50
<b>DLS</b>	Dispersión dinámica de luz
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMF</b>	N,N-Dimetilformamida
<b>DRX</b>	Difracción de Rayos X
<b>DVD</b>	Dominio Variable Dual
<b>EDC</b>	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>EMA</b>	Agencia Europea de Medicamentos
<b>EPR</b>	Efecto mejorado de permeabilidad y retención
<b>ER</b>	Receptor de estrógenos
<b>EREG</b>	Epiregulina
<b>FAB</b>	Fracción de unión a antígeno
<b>FBS</b>	Suero Fetal Bovino
<b>FDA</b>	Administración de Medicamentos y Alimentos
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FPCL</b>	Fast protein liquid chromatography
<b>FTIR</b>	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier
<b>GV</b>	Granulovirus
<b>HBEGF</b>	Factor de crecimiento semejante a EGF que une heparina
<b>HDF</b>	Línea celular de fibroblasto dérmico.
<b>HepG2</b>	Línea celular de cáncer de hígado.
<b>IR</b>	Espectros de Infrarrojo
<b>ITK</b>	Inhibidor del dominio tirosina quinasa
<b>LC</b>	Capacidad de carga
<b>LE</b>	Eficiencia de encapsulación
<b>Lef-2</b>	Late expression factor 2 gene

<b>MES</b>	Ácido 2 morfolinoetanolsulfónico
<b>MNPV</b>	Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>NC</b>	Nucleocápsida
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccinimida
<b>NPMs</b>	Nanopartículas magnéticas
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>NPV</b>	Nucleopoliedrovirus
<b>NRG</b>	Neuregulinas o heregulinas
<b>OB</b>	Occlusion Bodies
<b>ODV</b>	Oclusion-Derived Virus
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura de un gen
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction
<b>PDGFR</b>	Receptor del Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PI</b>	Yoduro de propidio
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3 Quinasa
<b>PR</b>	Receptor de prostaglandinas
<b>PS</b>	Fosfatidil serina
<b>PVDF</b>	Polivinildifluoruro
<b>RMA</b>	Red de microtúbulos apoptóticos
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RTK</b>	Receptores Tirosina quinasa
<b>RT-qPCR</b>	PCR cuantitativa a tiempo real
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>SNPV</b>	Single Nuclear Polyhedrosis Virus
<b>SPIONs</b>	Nanopartículas Superparamagnéticas de óxidos de hierro
<b>TEM</b>	Microscopía Electrónica de Transmisión
<b>TGF- <math>\alpha</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\alpha$
<b>TGS</b>	Tampón Tris/Glicina/SDS
<b>TopI</b>	Toposimerasa I
<b>TRIS</b>	Trisaminometano
<b>USM</b>	Nanopartículas de magnetita ultra pequeñas
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopía de Ultravioleta-visible
<b>WVB</b>	Working Viral Bank

# Índice de figuras y tablas

**Figura 1.** Principales vías de señalización de los receptores RTK <sup>5</sup>

**Figura 2.** Receptores de la familia Tirosina quinasa<sup>6</sup>.

**Figura 3.** Ligandos que se unen al dominio extracelular de los receptores EGF: Factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF-  $\alpha$ ), anfirregulina (AREG), factor de crecimiento semejante a EGF que une heparina (HB-EGF), betacelulina (BTC), y epiregulina (EREG), epigen (EPG) y neuregulinas (Nrg-1 a 4), también conocidas como heregulinas. Ninguno de los ligandos se une a ErbB2 (símbolo tachado), dos se unen a ErbB3 y siete se unen ErbB4 y EGFR. DTK indica el dominio intracelular tirosina quinasa. La transducción de la señal del homodímero de receptores ErbB3 está alterada (símbolo tachado).

**Figura 4.** Vías de señalización intracelular de la familia de EGFR <sup>15</sup>

**Figura 5.** Esquema del concepto de los procesos *top-down* y *bottom-up* y algunos ejemplos de síntesis. Adaptado de Bayda et al. (2019)

**Figura 6.** Ilustración esquemática de las diferencias del direccionamiento pasivo y activo de los nanodispositivos y la liberación del fármaco.

**Figura 7.** Comportamiento superparamagnético de las SPIONS en agua, en ausencia de campo magnético (izquierda) y en presencia de un campo magnético (derecha).

**Figura 8.** Morfología de los baculovirus ocluidos subfamilia *Eubaculovirinae* <sup>72</sup>

**Figura 9.** Representación esquemática de los ligando de direccionamiento. A) Fracción de unión a antígeno del anticuerpo (Fab) con dos dominios variables dispuestos en tándem (DVD) y la fracción constante CH1 unidos al tag de Estreptavidina para facilitar su purificación. B) Ligando Neuregulina 2 $\beta$  con el tag. Bss es la secuencia del péptido de secreción Bombixina. ST es la secuencia del Tag de Streptavidina, compuesta por 8 aminoácidos que se unen a la estreptavidina y facilita los procesos de purificación de las proteínas.

**Figura 10.** Representación esquemática de las secuencias de los vectores de transfección empleados para obtener los Virus de trabajo. El vector pBAC4x-1 y los

sitios de inserción de las secuencias del anticuerpo, cadena pesada (EGFR\_P) y ligera (EGFR\_L). El pVL1393 y el sitio de clonación de la secuencia de la neuregulina (NRG)

**Figura 11.** Digestión con enzima de restricción XhoI las colonias de pVL1392 para comprobar cuales habían incorporado la secuencia correcta. Los carriles impares corresponden al vector circular y los carriles pares el vector linearizado después de la digestión con XhoI. El carril L15 es el marcador.

**Figura 12.** Productos PCR resultantes de los controles de calidad de los vectores de transfección. La banda del carril L2 corresponde a la secuencia de NRG (2600 pares de bases). Los carriles L3-L8 corresponden con la secuencia EGFR\_L, (1000 pares de bases). Los carriles L9-L14 son las secuencias EGFR\_P (1200 pares de bases).

**Figura 13.** Proceso de Recombinación Homóloga que formará el virus de trabajo. El ADN del virus de la polihedrosis de *Autographa californica* (AcMNPV) posee el locus del gen de la polihedrina (PolH) flanqueado por el promotor del gen (ORF) y el gen del factor 2 de expresión tardía (late expression factor 2 gene lef-2), una proteína de la cápsida necesaria para la amplificación del virus <sup>71</sup>. El vector de transfección que porta las secuencias de interés también posee el promotor del gen de la polihedrina y el gen lef2. Por recombinación homóloga las secuencias de las proteínas de interés se incorporan al ADN del baculovirus AcMNPV y creando así un baculovirus recombinante capaz de infectar células de *Spodoptera frugiperda* y producir la proteína de interés.

**Figura 14.** Células Sf21: izda. Control. Drcha. Células infectadas

**Figura 15.** Producto de PCR resultante de la amplificación de ADN del virus. L1, marcador; L2, control negativo; L3, NRG (2600bp) ; L4, EGFR\_L (1000bp) , L5, EGFR\_P(1200bp).

**Figura 16.** Captura de pantalla de un fragmento de secuenciación en el programa Chromas.

**Figura 17.** SDS-WesternBlot (izda.) y SDS-Coomassie (drcha.) de los extractos celulares y sobrenadantes recogidos tras la infección.: L1 marcador; L2 pellet células control; L3 sobrenadante células control; L4 pellet NRG; L5 sobrenadante NRG; L6

pellet EGFR; L7 sobrenadante EGFR. La Flecha roja indica la banda de rNRG y la flecha Verde indica las bandas de EGFR.

**Figura 18.** Imágenes de Dot Blot de las distintas fracciones del proceso de solubilización de pellets celulares.

**Figura 19.** Imágenes de las eluciones de purificación después de concentrarlos con el Amicon. Las flechas verdes indican la fracción de anticuerpo rFab y las rojas el ligando Neuregulina.

**Figura 20.** Niveles de expresión de EGFR en las diferentes líneas celulares Western Blotting Nativo (A), y desnaturalizante (B).

**Figura 21.** Imágenes de microscopia confocal de fluorescencia de un cultivo de la línea A431 inoculado con 25  $\mu$ g de rFab (A) o rNRG (B) a diferentes tiempos. Cuantificación de la fluorescencia frente al tiempo (C) \*\*\* Se refiere a diferencias significativas entre rFab y rNRG. c Se refiere a diferencias significativas con respecto al punto de tiempo anterior con el mismo ligando. n=6; p=0.001.

**Figura 22.** Representación esquemática de la síntesis de los nanoconjugados. Síntesis de nanopartículas de magnetita (Paso A), seguida de la modificación de la superficie con ácido succínico (SA) y polietilenglicol (PEG) mediante reacciones de acoplamiento mediadas por una carbodiimida (EDC) (Paso B), encapsulación de Camptotecina (Paso C) y conjugación de los ligandos de direccionamiento (LD; r-Nrg y/o rFab) (Paso D).

**Figura 23.** Difractograma de Rayos X (A); imagen de microscopia electrónica de transmisión (TEM) imagen de alta resolución (Inserto) (B); imagen de microscopia electrónica de barrido (STEM) de campo oscuro (C) y de campo claro (D) de nanopartículas MagOH.

**Figura 24.** Formación de enlaces éster o amida por reacción de acoplamiento mediada por carbodiimidias con NHS como estabilizador.

**Figura 25.** Citotoxicidad dependiente de dosis de las nanopartículas pegiladas (Mag-PEG) en las líneas celulares HDF, A431 y HepG2 tras 48 horas de incubación con diferentes dosis de nanopartículas.

**Figura 26.** Forma activa de la CPT (izquierda) y forma inactiva (derecha) a través de la hidrólisis del anillo de lactona a pH fisiológico.

**Figura 27.** Espectros de infrarrojos (FTIR) de PEG (arriba) y de Mag-PEG[CPT] (abajo, línea sólida) y de CPT (línea puntuada). El espectro ha sido normalizado con respecto a la señal a  $1739\text{ cm}^{-1}$ .

**Figura 28.** Perfil de liberación *In vitro* de Mag-PEG[CPT] en PBS (pH 7.5) a  $37^{\circ}\text{C}$  (línea azul). Datos representados como media  $\pm$  SD ( $n=3$ ) Los errores son más pequeños que el punto de la gráfica. Los datos de ajuste (línea naranja) obedecen a la ley de potencia descrita en la ecuación. 3.

**Figura 29.** Ensayo de toxicidad dependiente de dosis de Mag-PEG[CPT]-rFab (verde), Mag-PEG[CPT]-rNrg (azul) and Mag-PEG[CPT]-rNrg/rFab (amarillo) en la línea A431 incubadas durante 24 y 48 horas. La dosis se refiere a la concentración de CPT en el nanoconjugado.  $n=6$ ;  $p=0.001$  (\*\*\*) ;  $p=0.01$  (\*\*).

**Figura 30.** Ensayo de toxicidad dependiente de dosis de Mag-PEG[CPT]-rFab (verde), Mag-PEG[CPT]-rNrg (azul) and Mag-PEG[CPT]-rNrg/rFab (amarillo) en la línea HDF incubadas durante 24 y 48 horas. La dosis se refiere a la concentración de CPT en el nanoconjugado.  $n=6$ ;  $p=0.001$  (\*\*\*) ;  $p=0.01$  (\*\*).

**Figura 31.** Ensayo de toxicidad dependiente de dosis de Mag-PEG[CPT]-rFab (verde), Mag-PEG[CPT]-rNrg (azul) and Mag-PEG[CPT]-rNrg/rFab (amarillo) en la línea HepG2 incubadas durante 24 y 48 horas. La dosis se refiere a la concentración de CPT en el nanoconjugado.  $n=6$ ;  $p=0.001$  (\*\*\*) ;  $p=0.01$  (\*\*).

**Figura 32.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de la entrada de los nanosistemas de direccionamiento en la línea celular HDF. Se incubaron las células  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  de los nanosistemas durante 6 horas y se tiñeron con LysoTracker (marcador endosomas y lisosomas) y el anticuerpo Anti-Strep para los ligandos de direccionamiento.

**Figura 33.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de la entrada de los nanosistemas de direccionamiento en la línea celular A431. Se incubaron las células  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  de los nanosistemas durante 6 horas y se tiñeron con LysoTracker (marcador endosomas y lisosomas) y el anticuerpo Anti-Strep para los ligandos de direccionamiento.

**Figura 34.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de la entrada de los nanosistemas de direccionamiento en la línea celular HepG2. Se incubaron las células 100 µg/ml de los nanosistemas durante 6 horas y se tiñeron con LysoTracker (marcador endosomas y lisosomas) y el anticuerpo Anti-Strep para los ligandos de direccionamiento.

**Figura 35.** Para la determinación de la entrada de los nanosistemas se cuantificaron los puntos de colocalización en las imágenes de microscopía de fluorescencia entre los ligandos (verdes) y los endosomas (rojos) de las células y se analizaron las diferencias entre los tres tipos de nanosistemas por línea celular. El análisis estadístico se realizó comparando los nanosistemas entre sí. n=6; p=0.05 (\*); p=0.01 (\*\*).

**Figura 36.** Niveles de apoptosis detectados por citometría de flujo con los marcadores Annexina V y yoduro de propidio. Los datos que se muestran son los que corresponden a la población celular marcada con Annexina (Ann +) pero no con yoduro de propidio (PI -) del total de la muestra analizada. n≥10.000.

**Figura 37.** Determinación de la existencia de apoptosis causada por los tratamientos con nanosistemas de direccionamiento en las tres líneas celulares. Las células se incubaron con nanosistemas cargados con CPT (5 µM) durante 24 horas. Los núcleos se marcaron con DAPI y los nanosistemas se marcaron con anticuerpo anti-strep. La apoptosis se puede determinar por la presencia de núcleos condensados y fragmentados.

**Tabla 1.** Clasificación de los tumores de mama en base a su fenotipo molecular. Adaptada del Consenso Internacional de Expertos de St. Gallen 2013 <sup>26</sup>.

**Tabla 2.** Cálculo de PFU. El dato de cycle threshold (CT) corresponde a una concentración de ADN del virus por µl que hemos validado con una curva standard previamente. Las unidades formadoras de colonias por mililitro (pfu/ml) se calculan sabiendo que hay 1.61E+04 pfu por nanogramos de DNA del virus.

**Tabla 3.** Eficiencia de encapsulación (LE) y capacidad de carga (LC) de las nanopartículas Mag-PEG[CPT] en comparación con otras nanopartículas magnéticas descritas

**Tabla 4.** Calculo de la Dosis Letal 50 de las diferentes formulaciones expresadas como concentración de CPT ( $\mu\text{M}$ ) en la línea celular A431.



# Capítulo 1. Introducción



## 1. Receptor del Factor del crecimiento epidérmico

El receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*, de sus siglas en inglés: *Epidermal Growth Factor Receptor*) es uno de los receptores de señalización más versátiles que regula procesos clave en la biología de la célula tales como proliferación, supervivencia y diferenciación celular y tisular durante el desarrollo embrionario <sup>1-3</sup>.

Los receptores Tirosina quinasa (RTK), a los que pertenecen la familia EGFR, son los principales mediadores de la red de señalización que transmite señales extracelulares a la célula, y controlan la diferenciación celular y la proliferación. Las vías de señalización celular clásicas de estos receptores son las que activan las rutas RAS / MAPK y PI3 quinasa/akt (Figura 1). Además, han sido descritas nuevas vías de señalización <sup>4</sup>. Se ha visto que EGFR estimula directamente la fosforilación y la translocación nuclear de proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STATS). Los receptores tirosina quinasa o sus fragmentos proteolíticos también pueden estar activos dentro de las células, y, además, en el núcleo donde podían actuar directamente como factores de transcripción <sup>5</sup>.

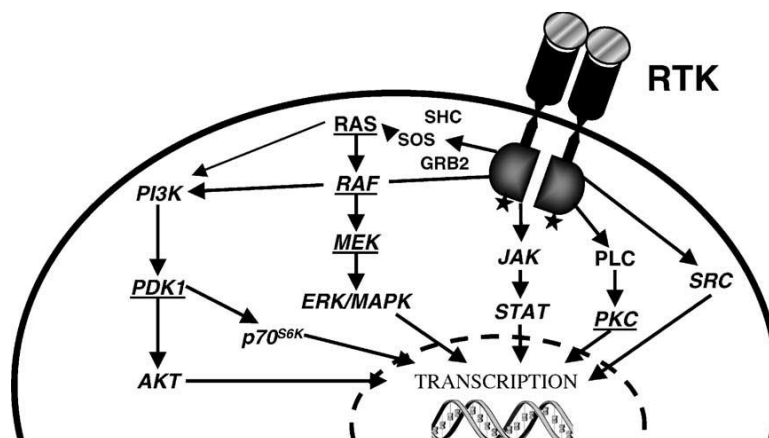


Figura 1. Principales vías de señalización de los receptores RTK <sup>5</sup>

Los recientes avances en la comprensión de la señalización celular de los receptores de tirosina quinasa, tanto en las células normales y cancerígenas, han sacado a la luz el potencial de los RTK como dianas selectivas contra el cáncer. Su actividad normalmente está estrechamente controlada y regulada. La sobreexpresión de proteínas RTK o las alteraciones funcionales causadas por mutaciones en los genes correspondientes, o por estimulación anormal causada por bucles de factor de crecimiento autocrino, contribuyen a la señalización adicional de receptores tirosina quinasa RTK. Esta señalización anormal provoca un crecimiento celular desregulado y cáncer. Los mecanismos de señalización de estos receptores tirosina quinasa RTK incontrolados que conducen al cáncer han proporcionado los fundamentos para el desarrollo de fármacos anti-RTK <sup>5</sup>.

Todos los receptores tirosina quinasa contienen un dominio extracelular glicosilado de unión a ligandos, una única región transmembrana y una porción citoplasmática con un dominio proteína tirosina quinasa conservado. Además, posee una región yuxtamembrana y una cola carboxi-terminal como parte del dominio intracelular (Figura 2).

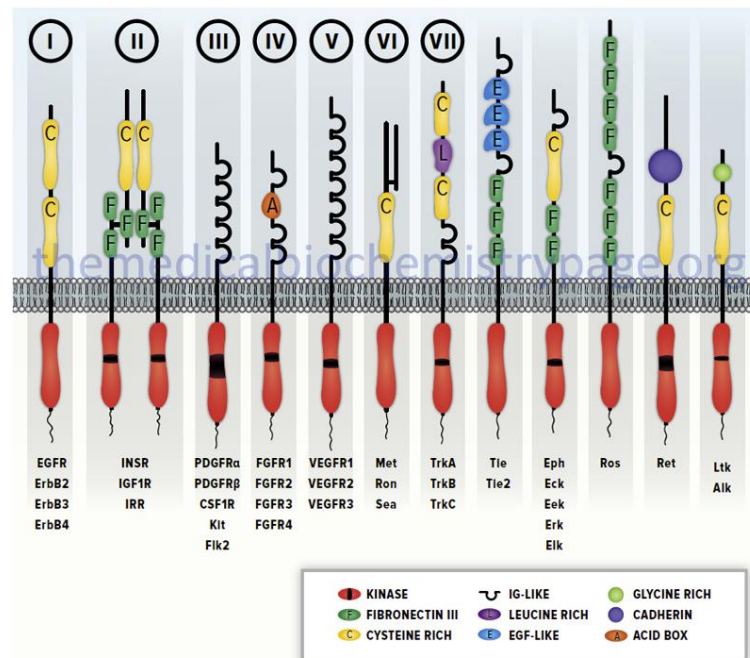


Figura 2. Receptores de la familia Tirosina quinasa<sup>6</sup>.

El dominio tirosina quinasa es el mejor conservado entre estos receptores tirosina quinasa, y es necesario un dominio intacto para la correcta señalización del receptor. Por ejemplo, la mutación de una sola lisina en el sitio de unión a ATP bloquea la capacidad del receptor para fosforilar residuos de tirosina e inactiva completamente la función biológica del receptor <sup>7</sup>. El dominio tirosina quinasa de algunos RTK (por ejemplo, receptores de PDGF y FGF) están divididos por inserciones de hasta 100 residuos de aminoácidos. Estas secuencias de inserción están altamente conservadas entre las especies, y contienen sitios de autofosforilación que tienen la función de acoplamiento con moléculas de transducción de señales.

Sobre la base de similitud de secuencia, es posible clasificar estos receptores en grupos relacionados: los rasgos estructurales característicos de los dominios extracelulares de estos grupos incluyen, entre otros, motivos ricos en cisteína, repeticiones de tipo inmunoglobulina, repeticiones fibronectina tipo III y motivos EGF que pueden estar presentes solos o en diferentes combinaciones. Estos dominios determinan especificidad para la unión ligando receptor.

Cada uno de estos dominios estructurales y sus funciones son objetivos potenciales para la evolución de futuros tratamientos eficaces dirigidos tanto a los propios receptores de membrana como a sus genes, también denominados oncogenes debido a sus altas tasas de mutaciones que provocan que las células se conviertan en tumorales.

La familia de Receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico está constituida por cuatro miembros (EGFR, ErbB2 o HER2, ErbB3 o HER3 y ErbB4 o HER4) (Figura 3), fue la primera familia de receptores de factores de crecimiento identificada en células tumorales y, actualmente, es la principal diana en la investigación de terapias contra el cáncer <sup>1,8</sup>.

El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), que da nombre a esta familia, es uno de los factores de crecimiento capaces de activar el EGFR, y forma parte de un complejo entramado de factores de crecimiento que, junto a sus receptores de membrana, modulan la proliferación celular. Las células tumorales a menudo adquieren la habilidad de sortear estos moduladores por lo que crecen y se dividen fuera de control <sup>1,9</sup>.

La figura 3 muestra los factores de crecimiento que se unen a cada uno de los receptores y promueven la dimerización y activación de los receptores, incrementando la actividad proteína quinasa de dominio intracelular de los receptores e iniciando la cascada de señalización celular. Aparte del EGF, existen otras moléculas activadoras tales como el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF-  $\alpha$ ), la anfirregulina (AREG), el factor de crecimiento semejante a EGF que une heparina (HBEGF), la betacelulina (BTC), y la epiregulina (EREG) <sup>2,10</sup>. Además, se han descrito nuevas familias de ligandos como las neuregulinas (NRG-1 y NRG-2) expresadas mayoritariamente en tejidos neurales y mesenquimales <sup>11</sup> o el epigen (EPGN), el ligando más reciente descubierto, que parece tener poca afinidad por el receptor EGFR <sup>2</sup>.

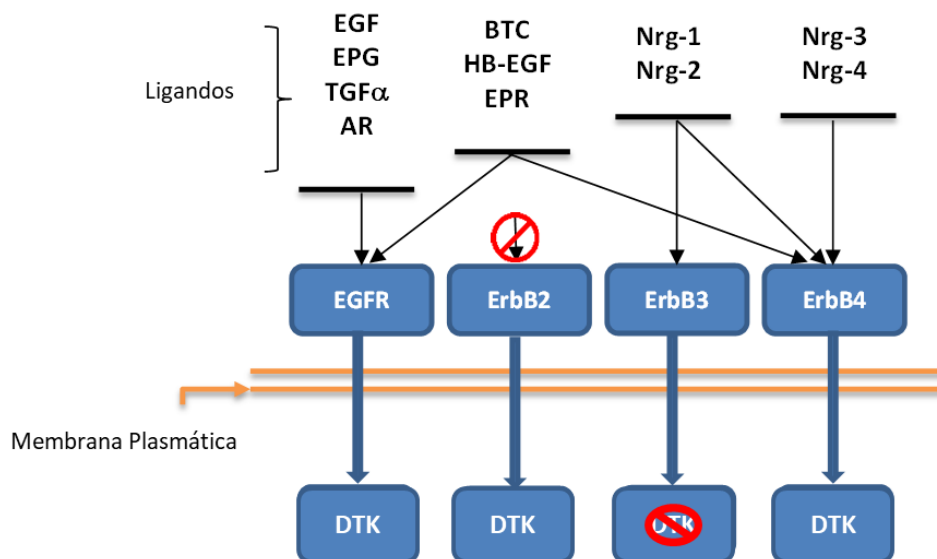


Figura 3. Ligandos que se unen al dominio extracelular de los receptores EGF: Factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF-  $\alpha$ ), anfirregulina (AREG), factor de crecimiento semejante a EGF que une heparina (HB-EGF), betacelulina (BTC), y epiregulina (EREG), epigen (EPG) y neuregulinas (Nrg-1 a 4), también conocidas como heregulinas. Ninguno de los ligandos se une a ErbB2 (símbolo tachado), dos se unen a ErbB3 y siete se unen ErbB4 y EGFR. DTK indica el dominio intracelular tirosina quinasa. La transducción de la señal del homodímero de receptores ErbB3 está alterada (símbolo tachado).

Aunque los cuatro miembros presentan una alta similitud, cada uno de los receptores posee características únicas. Por ejemplo, ErbB2 o HER2 no tiene ligando

conocido y ErbB3 o HER3 no tiene actividad quinasa. Se activan por heterodimerización con los otros HER y les permite regular la señalización celular a través de un mecanismo cooperativo<sup>12</sup>.

Los ligandos de EGFR son sintetizados como precursores en la superficie celular; contienen una extensión aminoterminal (pro-región), una porción estructural yuxtamembrana, un dominio hidrofóbico transmembrana y un fragmento carboxiterminal citoplasmático <sup>13</sup>. La solubilización de dichos ligandos requiere la acción de determinadas proteasas que escinden la proteína de dominios regulatorios anclados a la membrana. Normalmente son proteínas de la familia de desintegrina y metaloproteasas <sup>2</sup>. El papel de estas proteasas en la liberación de los ligandos de la familia EGFR parece ser crítico en el control de proteínas de la superficie celular.

La activación mediada por ligando no solo induce la formación de heterodímeros, sino que también provoca la internalización y/o degradación del receptor. El resultado es la autofosforilación de varios residuos de tirosina en el dominio C-terminal, el dominio citoplasmático, que pone en marcha una cascada de transducción de señales <sup>14-16</sup>. En condiciones normales se activan varias vías: *ras/Raf-1/MAPK*, *PI3Quinasa/Akt/mTOR*, *src/NFKb*, *catenin/cytoskeleton* y el sistema *PAK-1/rac*, que conducen a la síntesis de ADN y a la proliferación celular, así como a la migración y adhesión celular (Figura 4).

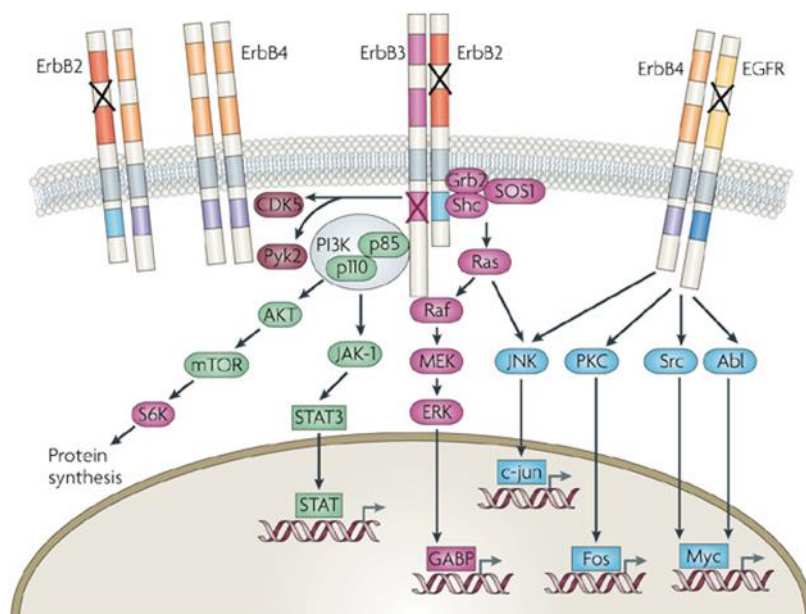


Figura 4. Vías de señalización intracelular de la familia de EGFR <sup>15</sup>

La secuencia genética que contiene la información para los receptores de EGF puede acumular mutaciones en células cancerígenas <sup>16</sup>. Algunas de estas mutaciones pueden provocar la activación de la señalización dependiente de EGFR sin necesidad de unión de ligandos específicos, aumentando de esta manera la tumorigenicidad de estas células. En algunos pacientes se han descrito mutaciones de EGFR que han afectado negativamente a la respuesta de éstos a quimioterapia basada en anticuerpos contra la versión normal de EGFR. Un anticuerpo monoclonal, desarrollado contra un epítipo de la versión normal de EGFR, no siempre interacciona con una versión mutante del receptor, y viceversa. Solo en la secuencia codificante de EGFR se han descrito al menos 43 mutaciones y polimorfismos nucleotídicos relacionados con variaciones en la respuesta a anticuerpos <sup>17</sup>. Si algunas de estas mutaciones afectan al epítipo reconocido por un anticuerpo específico contra EGFR, el paciente portador de la mutación tendrá receptores EGF que no podrán ser reconocidos por dicho anticuerpo. Por ello se recomienda como tratamiento el uso combinado de varios anticuerpos frente a EGFR o de anticuerpos y otros inhibidores de tirosina quinasa <sup>17-19</sup>.

## 2. Los receptores EGF y cáncer

La familia de receptores de EGF (HER) ha sido, durante las últimas décadas, una diana en la estrategia de tratamientos contra el cáncer. Se han descrito dos líneas principales de ataque frente a estos receptores que han demostrado ser eficaces: bloqueo del receptor en la superficie extracelular e inhibición de la actividad proteína quinasa. Algunos de estos tratamientos son anticuerpos monoclonales (*cetuximab*) que actúan bloqueando el dominio extracelular que se une a los ligandos del receptor. Otros fármacos, como *gefitinib*, son moléculas más pequeñas que inhiben la quinasa y que, por tanto, actúan en el dominio citoplasmático del receptor. En cualquier caso, se bloquean las cascadas de señalización necesarias para la proliferación celular, lo que permite disminuir la velocidad de crecimiento en varios tipos de tumores <sup>16,18,20</sup>.

La sobreexpresión de los miembros de la familia HER en tumores sólidos es una de las características más reconocidas de estos receptores. EGFR (HER1) fue el primero de la familia de los receptores que se descubrió que se presentaba desregulado o sobreexpresado en tumores epiteliales. Generalmente, este tipo de tumores con EGFR hiperexpresados presentan una peor clínica y tienden a adquirir resistencia a los tratamientos <sup>12</sup>. HER2 se sobreexpresa en multitud de tumores, incluyendo cáncer de mama, gástrico, esófago, pulmón, endometrio, colon, páncreas y vejiga. La sobreexpresión de EGFR y HER2 en células tumorales causa la hiperactivación de las vías de señalización celulares que controlan el crecimiento y supervivencia celular, provocando el riesgo de metástasis y recaídas en pacientes de múltiples tipos de cáncer <sup>21-23</sup>.

HER3 también se conoce como “pseudoquinasa”, ya que carece de actividad quinasa como resultado de una mutación en los residuos Asp813 y Glu738. No se conoce el papel exacto de HER3 en el cáncer, sin embargo, juega un papel significativo en la progresión de múltiples tipos de cáncer, tales como próstata, gástrico, mama, páncreas, ovarios, y su resistencia a quimioterápicos y otras terapias <sup>24</sup>.

HER4 es el menos sobreexpresado, amplificado y estudiado de todos los receptores de la familia. Se activa mediante ligandos específicos y la señalización de HER4 contribuye a la diferenciación y crecimiento del epitelio mamario, pero, además,

es capaz de desencadenar apoptosis en células cancerígenas de mama.<sup>12</sup> A diferencia de HER1-3, HER4 no se sobreexpresa en tumores de mama, sino que su dominio intracelular (4ICD) se localiza en el núcleo en células de tumores que presentan receptores de estrógenos (ER+) ya que tienden a ser más diferenciadas<sup>25</sup>.

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común (2.2 millones de casos diagnosticados en 2020) y la principal causa de mortalidad en las mujeres (685.000 muertes) según la Organización Mundial de la Salud. Es por esta razón que HER2 y su implicación en el cáncer de mama merecen una explicación más detallada para comprender la necesidad de tratamientos dirigidos a las células tumorales.

Los tumores de mama se han clasificado en 4 tipos de acuerdo con sus características moleculares. La descripción que se muestra en la tabla 1 corresponde a la dada en el Consenso Internacional de Expertos de St. Gallen 2013<sup>26</sup>, donde se incluyó el nivel de Ki-67 como marcador fenotípico en la clasificación. El Ki-67 es un marcador de proliferación celular y se ha comprobado que sus niveles de expresión en tumores mamarios influyen en la respuesta al tratamiento y la prognosis<sup>27</sup>. Los tumores de tipo Luminal A no expresan HER2, pero sí receptor de estrógenos (ER+) y de progesterona (PR+). Los Luminal B a su vez se subdividen en dos tipos que dependen de la presencia o no de HER2. Los Luminal B con HER2 negativo, presentan receptores de estrógenos (ER+), pero pocos niveles de receptores de progesterona (PR-) o Ki-67. El subtipo Luminal B con HER2 positivo presenta sobreexpresado este receptor junto con los receptores de estrógenos (ER+) y puede presentar o no receptores de progesterona (PR+ o -) y niveles altos de Ki-67. El tercer tipo de tumores según la clasificación de St. Gallen son los tumores que presentan HER2 sobreexpresado o amplificado y que no tienen receptores de estrógenos ni progesterona (ER- y PR-). Y, por último, los tumores conocidos como triple negativo (TNBC), que como su propio nombre indica no presentan ni HER2, ni receptores de estrógenos (ER-) ni de prostaglandinas (PR-).

Los tumores triple negativo (TNBC) no responden a terapias hormonales ni tratamientos dirigidos contra HER2 y, comparado con los otros tipos de tumores, son los que presentan peor prognosis, mayor riesgo de metástasis y de recidiva<sup>28</sup>.

Como se mencionó anteriormente, las terapias dirigidas contra receptores de la familia de EGFR en tumores incluyen anticuerpos monoclonales e inhibidores del dominio tirosina quinasa, inhibidores de PI3K.

Tabla1. Clasificación de los tumores de mama en base a su fenotipo molecular. Adaptada del Consenso Internacional de Expertos de St. Gallen 2013 <sup>26</sup>.

SUBTIPO	CARACTERISTICAS MOLECULARES
<b>Luminal A</b>	ER + PR + (≥20%) HER2 - Ki-67 - (<20%)
<b>Luminal B</b>	<b><i>Luminal B con HER negativo</i></b> ER + HER2 - al menos uno de: PR - (<20%) Ki-67 + (≥20%)  <b><i>Luminal B con HER positivo</i></b> ER + HER2 sobreexpresado o amplificado PR + o - Ki-67 + o -
<b>Sobreexpresión HER2</b>	HER2 sobreexpresado o amplificado ER - PR -
<b>Basal o Triple negativo</b>	HER2 - ER - PR -

Entre los anticuerpos dirigidos contra la familia de EGFR como terapias antitumorales para cáncer de mama podemos destacar el Trastuzumab; un anticuerpo recombinante humanizado frente a HER- 2. También se están desarrollando tratamientos para otros tipos de tumores como el Cetuximab, un anticuerpo

recombinante frente a EGFR, y es una terapia muy efectiva para pacientes con tumores colorrectales, de cabeza y cuello y de células no pequeñas de cáncer de pulmón, en cambio se ha visto que pacientes con activación de HER2 presentan resistencia a la terapia con este anticuerpo <sup>29</sup>. El Duligotuzumab es un anticuerpo de acción dual dirigido a EGFR y HER3. En un ensayo clínico donde se compara la eficacia del mismo frente al cetuximab en combinación con FOLFIRI (un quimioterápico basado en Irinotecan) se ha visto que no presenta una mejora considerablemente en pacientes con tumores colorrectales <sup>30</sup>.

Otro ejemplo de terapias dirigidas a la familia de EGFR son los inhibidores del dominio tirosina quinasa (ITK) de estos receptores. El Neratinib es un inhibidor irreversible del dominio tirosina quinasa de EGFR, HER2 y HER4 aprobado en 2017 por la FDA que inhibe la fosforilación y la posterior cascada de señalización que incluye a ERK y Akt <sup>31</sup>. El Lapatinib es otro ITK de administración oral que inhibe la activación de HER2 y EGFR y la señalización de Akt y Erk <sup>22</sup>. El Pyrotinib es un ITK de nueva generación frente a EGFR, HER2 y HER4 aprobado por la Administración Estatal de Medicamentos de China en 2018. Su mecanismo de acción reside en que inhibe la formación de los heterodímeros y autofosforilación de los receptores, bloqueando la activación de la cascada de señalización RAS/ RAF/MEK/MAPK, PI3K/AKT <sup>31</sup>.

Alpelisib es un inhibidor del fosfatidilinositol 3 Quinasa (PI3K) que ha demostrado ser eficaz en combinación con Fulvestrant, un antagonista de los receptores de estrógenos, para el tratamiento de tumores de mama positivos para receptor de estrógenos (ER+), negativos para HER2 y con mutaciones en la ruta PI3K. Fue aprobado por la FDA en mayo de 2019 <sup>32,33</sup>.

El desarrollo de estas terapias dirigidas ha permitido que se mejoren eficacia de los tratamientos y el aumento de ratio de supervivencia, pero sigue siendo necesario y urgente el desarrollo de terapias dirigidas a diferentes dianas moleculares y que prueben ser eficaces, ya que el uso de quimioterápicos citotóxicos como el cisplatino, o el paclitaxel presenta una gran variedad de efectos secundarios que van desde la pérdida del pelo y los vómitos, hasta las más graves como hepatotoxicidad, cardiotoxicidad o inmunodepresión y no siempre son un tratamiento eficaz.

Este trabajo desarrolla una terapia dirigida frente a células tumorales que presenten sobreexpresión o aumento de cualquiera de los cuatro tipos de receptores de la familia EGFR, demostrando ser eficaz en células tumorales y evitando los efectos secundarios devastadores de la quimioterapia en las células sanas.

### 3. Nanotecnología y nanomedicina

La Nanociencia es la convergencia de los conocimientos de la ciencia de materiales, la química, la física y la biología, que permite el estudio de materia y estructuras a escala nanométrica, es decir, cuando al menos una de sus dimensiones es inferior a una micra, y más en concreto se encuentra entre 1 y 100 nm. La tecnología que utiliza las aplicaciones prácticas de la nanociencia para observar, medir, manipular y sintetizar materiales a escala nanométrica es la llamada Nanotecnología <sup>34</sup>. Los materiales a escala nanométrica pueden tener propiedades y comportamientos completamente diferentes a los que poseen a escala macroscópica. Una de las principales ventajas que ofrecen estos nanomateriales es que la relación superficie/volumen aumenta de forma exponencial, de manera que a medida que disminuye el tamaño de la partícula, aumenta el área superficial del mismo <sup>35</sup>.

Richard Feynman, galardonado con el Premio Nobel de Física, introdujo el concepto de la nanotecnología en 1959 en el encuentro anual de la Sociedad Americana de Física, durante su discurso titulado “There is Plenty of Room at the Bottom” (Feynman, 1959). Feynman dijo “¿Por qué no podemos escribir los 24 tomos de la enciclopedia británica en la cabeza de un alfiler?” y esbozó la idea de construir pequeñas máquinas capaces de “organizar los átomos de la manera que queramos”. Quince años después, Norio Taniguchi, fue el primer científico en describir y definir el término “nanotecnología” en 1974 como el proceso de separación, consolidación y deformación de los materiales átomo por átomo <sup>37</sup>. Más tarde, Eric Drexler en su libro “Engines of Creation: The coming Era of Nanotechnology” publicado en 1986, describe la idea de crear máquinas a escala nanométrica que operen a escala molecular <sup>38</sup>. A partir de entonces la teoría de la “ingeniería molecular” comienza a captar el interés de los investigadores y se empiezan a desarrollar y describir diferentes posibilidades de síntesis de nanoestructuras, las cuales se pueden englobar en dos categorías: *top-down* y *bottom-up* <sup>39</sup>.

En la figura 5 se describen algunos de los métodos empleados en la síntesis de nanoestructuras y el concepto general de *top-down* y *bottom-up*. La técnica *top-down* (de arriba abajo) consiste en la reducción de materia prima para conseguir partículas a

nanoescala. Esto se consigue mediante procesos mecánicos, térmicos, ópticos, pulverización o grabado químico. Con técnicas como la litografía, que permite esculpir materiales a través de la exposición a la luz ultravioleta, iones o electrones, y por la deposición de otros materiales en la superficie del material a esculpir <sup>40</sup>. La técnica *bottom-up* (de abajo a arriba) se basa en el ensamblado de estructuras nanométricas a partir de precursores moleculares o atómicos. Los procesos más utilizados suelen ser la condensación atómica o molecular, la reducción biológica, deposición de vapor, síntesis química o electroquímica y la tecnología Sol-Gel.

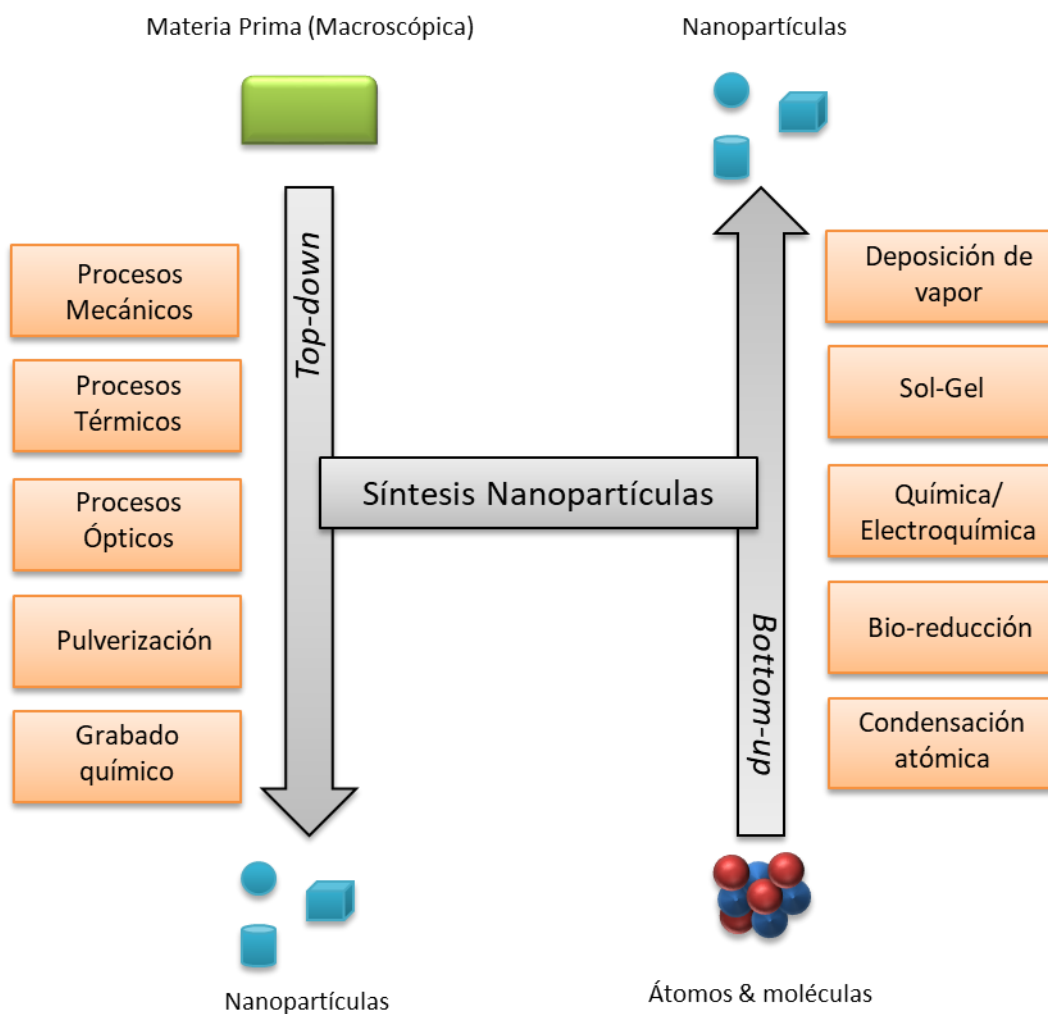


Figura 5. Esquema del concepto de los procesos *top-down* y *bottom-up* y algunos ejemplos de síntesis. Adaptado de Bayda et al. (2019)

La nanociencia ha permitido el desarrollo y el avance en multitud de campos diferentes como la electrónica, la industria de materiales, la energía o la medicina. La aplicación de los conocimientos de la nanociencia al campo de la medicina se conoce como nanomedicina <sup>41-43</sup> que es la aplicación de la nanotecnología en el campo de la salud, se utiliza para diagnóstico, monitorización, tratamientos, predicción y prevención de enfermedades <sup>44</sup>. Así, los nanomateriales se pueden usar como agentes de contraste, agentes terapéuticos, o como sistemas de entrega de fármacos o genes <sup>45</sup>. El pequeño tamaño de los nanomateriales hace que presenten una gran fracción de átomos en superficie, una alta energía superficial y gran confinamiento espacial, características que normalmente no existen en la correspondiente materia prima a escala macroscópica <sup>45</sup>. Pero para trasladar estas propiedades al uso clínico es necesario un conocimiento detallado de las propiedades químicas y físicas de estos nanomateriales, así como su farmacocinética y el comportamiento en el cuerpo, incluyendo su biodistribución, toxicidad y biocompatibilidad <sup>44</sup>.

El desarrollo de nuevos nanomateriales y su uso en biomedicina han recibido mucha atención estos últimos años y se han hecho avances significativos en la síntesis de nanomateriales con geometría controlada, las propiedades físico-químicas, carga superficial, y la transformación de superficie con polímeros bioactivos <sup>46</sup> que están permitiendo el desarrollo de a una nueva generación de vehículos de compuestos dirigidos, agentes de contraste y dispositivos de diagnóstico. Muchos de los cuales están en fase clínica o incluso ya aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de Estados Unidos o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para su uso en humanos <sup>47</sup>.

Una metodología emergente es el uso de nanodispositivos multifuncionales basados en nanopartículas para dirigir tratamientos antitumorales de forma selectiva hacia las células cancerígenas. Las características ideales de estos dispositivos deben incluir: una buena biocompatibilidad, vida media en circulación en el torrente sanguíneo prolongada, ser biodegradables, no tóxicos y altamente eficientes. Esto se consigue ajustando el tamaño de la nanopartícula, usando materiales biocompatibles y modificando la superficie de las mismas para dirigirlas específicamente a determinados tipos celulares o tejidos <sup>48</sup>. Estas terapias dirigidas suelen ser más eficaces que algunos tratamientos convencionales ya que la administración sistémica e inespecífica de fármacos quimioterapéuticos puede asociarse con el riesgo de toxicidad sistémica<sup>49</sup>.

Existen dos tipos de direccionamiento en el uso de nanodispositivos para terapias dirigidas: el direccionamiento activo y pasivo y sus mecanismos se muestran en la Figura 6. Las nanopartículas generalmente se pueden concentrar en el área del tumor debido a la hipervascularización del tejido tumoral. Las paredes de estos capilares no están completas o presentan poros por los que pueden penetrar moléculas de gran tamaño, esto se conoce como efecto mejorado de permeabilidad y retención (EPR) <sup>49,50</sup>. El efecto EPR facilita la llegada de nanovectores a los alrededores tejido tumoral, esto se denomina direccionamiento pasivo. <sup>44,48</sup>. Los nanovectores, cuando llegan al entorno tumoral, pueden liberar el fármaco en el exterior celular o entrar en la célula por endocitosis y liberarlo dentro. Esto hace muy atractivos a los nanosistemas dirigidos ya que aprovechan las anomalías vasculares provocadas por el tumor independientemente de si están dirigidos o no <sup>51</sup>.

El direccionamiento activo consiste en dirigir los nanodispositivos hacia el tumor y a las células tumorales, esto se consigue modificando su superficie para acoplarles ligandos de direccionamiento que pueden ser anticuerpos, factores de crecimiento, transferrina, citoquinas, folatos y lipo-proteínas de baja densidad (LDL) <sup>52</sup>. Las nanoformulaciones dirigidas específicamente al tumor, en comparación con los tratamientos convencionales, exhiben mejor control de la liberación del fármaco, lo que conlleva a una mejora de la biodisponibilidad y mayor acción del principio activo. Además, se ha visto que pueden inducir una mejor supresión del crecimiento del tumor, prolongando la supervivencia de los pacientes con cáncer, ya que maximiza los efectos citotóxicos en las células cancerígenas y evita los efectos secundarios en el resto del organismo.

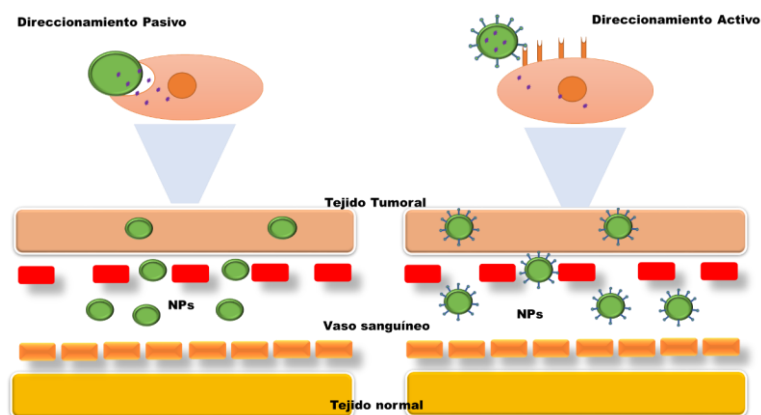


Figura 6. Ilustración esquemática de las diferencias del direccionamiento pasivo y activo de los nanodispositivos y la liberación del fármaco.

- *Nanopartículas magnéticas*

De los muchos tipos de nanopartículas que existen, en este trabajo nos vamos a centrar en las nanopartículas magnéticas (NPMs) pues poseen una característica especial: pueden ser manipuladas por un campo magnético externo. Debido a esta propiedad, y al enorme partido que se le puede sacar en aplicaciones de distinta índole, las NPMs han suscitado un gran interés en multitud de campos tales como, por ejemplo, la ingeniería, la biotecnología, la medicina o la protección del medio ambiente <sup>34,53-55</sup>.

Las NPMs están formadas por materiales tales como hierro, níquel, cobalto y sus óxidos. De entre ellas, las nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro (SPIONs de sus siglas en inglés), principalmente magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), la maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), tienen un especial interés debido a sus propiedades únicas tales como el superparamagnetismo, la elevada relación superficie/volumen, su fácil separación y purificación y su baja toxicidad <sup>56</sup>.

El magnetismo es el resultado de un movimiento de electrones y de las propiedades magnéticas de los materiales dependen, principalmente, del movimiento de esos electrones. Las sustancias se clasifican en tres categorías dependiendo de su comportamiento al ser sometidas a un campo magnético: paramagnéticas, diamagnéticas y ferromagnéticas. Las sustancias paramagnéticas son atraídas débilmente hacia la zona del campo magnético; las sustancias diamagnéticas son repelidas débilmente; y las sustancias ferromagnéticas son atraídas fuertemente hacia la zona del campo magnético más intenso.

Las sustancias ferromagnéticas como el Fe, Co y Ni, son capaces de convertirse en imanes permanentes cuando se las somete a un campo magnético externo, y su estado de magnetización perdura cuando este desaparece. Pero los materiales ferromagnéticos se vuelven inestables cuando sus dimensiones se reducen por debajo de cierto tamaño (alrededor de 15nm), ya que el aumento de la energía superficial proporciona a los dominios la energía suficiente como para invertir las direcciones de la polarización, transformando el material ferromagnético en paramagnético. Sin embargo, el comportamiento de los materiales ferromagnéticos llevados a escala nanométrica

difiere del de los materiales paramagnéticos convencionales, y, para diferenciarlos, se les da el nombre de superparamagnéticos. Las nanopartículas superparamagnéticas son atraídas por un campo magnético (Fig 7), pero no retienen el magnetismo residual después de retirarlo; es decir, en ausencia de un campo magnético externo, el comportamiento magnético desaparece rápidamente <sup>56,57</sup>. La magnetización nula o despreciable de las SPIONS es una de las propiedades interesantes que poseen, ya que evita su agregación <sup>58</sup>.

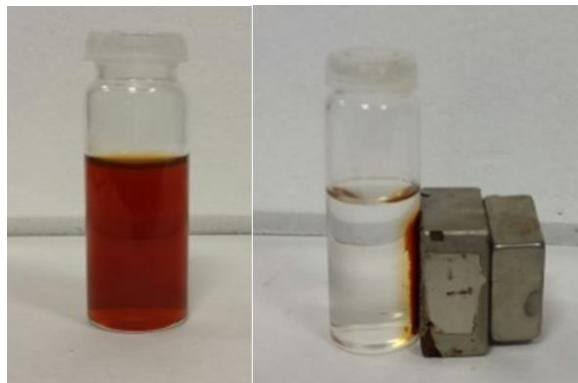


Figura 7. Comportamiento superparamagnético de las SPIONS en agua, en ausencia de campo magnético (izquierda) y en presencia de un campo magnético (derecha).

Un problema asociado a los materiales a escala nanométrica es su inestabilidad: tienden a formar agregados con el fin de reducir la energía asociada debido a la gran relación superficie/volumen que presentan estos materiales. Las nanopartículas no se usan en estado sólido, sino que están dispersas en un medio, formando lo que se denomina una suspensión coloidal, también llamado coloide, que es un sistema heterogéneo formado por dos fases, la fase que está en mayor cantidad se denomina fase o medio dispersante, y la que está en menor cantidad se denomina fase dispersa. Las nanopartículas en una suspensión coloidal están sometidas a fuerzas de atracción y repulsión entre sí y con el medio, existiendo un balance entre dichas fuerzas. En determinadas circunstancias este balance puede desequilibrarse y dar como resultado que las nanopartículas se acerquen y adhieran unas a otras, formando pequeños agregados, o flóculos, cuyo tamaño va aumentando progresivamente con el tiempo. Si se permite que los agregados aumenten mucho de tamaño y se hagan densos al final los agregados se separarán del medio dispersante por la acción de la gravedad y se producirá una separación de fases irreversible. Por este motivo, en la mayoría de

aplicaciones es crucial desarrollar estrategias de protección, ya sea durante o después de la síntesis, para estabilizar las NPMs y evitar su agregación. Estos enfoques pasan por la modificación de la superficie de la nanopartícula, ya que de esta forma no solo se aumenta la estabilidad de las NPMs, sino que se incrementa la dispersión y la biocompatibilidad en soluciones acuosas. Además, aumenta la eficacia del direccionamiento, ya que se evita la agregación causada por la unión de los nanosistemas a proteínas sanguíneas e incrementa el tiempo de circulación en sangre <sup>53,55,59</sup>

Las SPIONS son biocompatibles, biodegradables y no tóxicas <sup>60-62</sup>. Son capaces de unirse a la hemoglobina a través de las rutas metabólicas normales y evitar la acumulación en el cuerpo. Pueden usarse incluso en pacientes con las funciones renales y hepáticas mermadas <sup>55</sup>.

- *Síntesis de nanopartículas magnéticas*

Existen diferentes estrategias para obtener NPMs de tamaños definido, estables y biocompatibles dependiendo del tipo de método de síntesis empleado (físicos, químicos y biológicos) <sup>63</sup>.

1) Métodos Físicos:

- a) Método de molienda de bolas/ Método mecánico: Es un método con enfoque *top-down* para la síntesis de nanopartículas a partir de material a granel. Consiste en la molienda mecánica del material hasta conseguir partículas finas.
- b) Evaporación laser: es un enfoque Bottom-up en que las nanopartículas se forman por condensación de un líquido o un gas.
- c) Método de cable explosivo (EWM): Es una nueva técnica fisicoquímica y es un proceso seguro y limpio para sintetizar NPMs. Consiste en enviar un pulso de corriente eléctrica lo suficientemente fuerte a través de un cable delgado de algún material eléctricamente conductor.

2) Métodos Químicos

- a) Coprecipitación: Es el método más utilizado para producir nanopartículas de tamaño controlado.

- b) Descomposición Térmica: en este método se usan precursores organometálicos para producir nanopartículas monodispersas bajo temperaturas extremas.
  - c) Microemulsión son sistemas que usan fases hidrofílicas o lipofílicas y surfactantes para crear las microemulsiones.
  - d) Síntesis Hidrotermal: este método se usa para preparar nanopartículas en una solución acuosa bajo condiciones de alta presión y temperatura.
  - e) Sol-Gel: la química de este proceso implica la formación de gel en temperatura ambiente por reacciones de hidrólisis y condensación de alcóxidos metálicos.
- 3) Métodos biológicos: La síntesis biológica es un método bien conocido para sintetizar NPMs mediante el uso de organismos vivos como plantas y microorganismos (hongos, virus, bacterias y actinomicetos).

De entre todos ellos, el método más usado, y el que hemos seguido en este trabajo es el de coprecipitación de sales de hierro en condiciones alcalinas descrito inicialmente por Massart <sup>64</sup>. Este método, a diferencia de los otros, permite el uso de materiales y procedimientos más sencillos y es el más usado para aplicaciones biomédicas. La síntesis de NPMs mediante coprecipitación de sales de hierro es un método cómodo y barato y con unos rendimientos altos. Este método consiste en la mezcla de iones férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en una proporción molar 1:2 en disoluciones. Durante el proceso, la composición de las MNP, el tamaño y la forma de las partículas puede verse afectada por factores tales como el tipo de sal empleada (Cloruros, sulfatos, nitratos etc.), la proporción de iones férrico y ferroso, el pH o la temperatura de reacción. Una de las ventajas de este método es que las nanopartículas obtenidas son hidrofílicas, y, por tanto, estables en medios acuosos.

- *Nanopartículas Magnéticas en nanomedicina y cáncer*

El perfeccionamiento de los nuevos nanomateriales en general, y nanopartículas magnéticas en particular, está permitiendo el desarrollo de nuevas aplicaciones en nanomedicina. Las NPMs se han implementado para su utilización como agentes de contraste en imágenes de resonancia magnética (RMN) para el diagnóstico de enfermedades como esclerosis múltiple e infartos de miocardio <sup>65</sup>. Actualmente el

agente de contraste más utilizado en el mercado es ferumoxitol (Feraheme®) <sup>66,67</sup>, que además se usa para tratar la anemia por deficiencia de hierro en pacientes con enfermedad renal crónica. Este es buen ejemplo del uso de NPMs para la teragnosis, que consiste en la combinación entre terapia y diagnosis. En un proceso simultáneo se puede detectar y tratar una enfermedad. La nanoteragnosis es uno de los hitos más aclamados de la nanomedicina <sup>65</sup>. Se ha implementado su uso no solo en cáncer si no en otras muchas enfermedades como neurodegenerativas, autoinmunes y cardiovasculares. Hay varios tipos de NPMs que se pueden utilizar para la teragnosis del cáncer. Entre otras, están las nanopartículas recubiertas de sílice, las nanopartículas lipídicas o tipo vesícula, las revestidas con polímeros o las SPION <sup>55</sup>. Se pueden modificar para que sean capaces de transportar moléculas pequeñas tales como proteínas o ARN a determinadas regiones. Las SPIONS se han usado para diferenciar nódulos cancerígenos de los sanos mediante imagen de resonancia magnética y tratarlos mediante hipertermia para destruirlos. La terapia hipertérmica magnética usa un campo magnético alterno de alta frecuencia sobre las NPMs y las calienta para que a su vez eleven la temperatura del tejido en el que se encuentran (por encima de 42°C) para provocar la muerte celular y la destrucción del tumor <sup>55</sup>. Además, la terapia hipertérmica magnética no solo induce la apoptosis, si no que provoca que las células tumorales estén más susceptibles a la radioterapia o quimioterapia <sup>68</sup>.

Una de las aplicaciones más prometedoras de las nanopartículas magnéticas en biomedicina es el desarrollo de nanosistemas de direccionamiento de fármacos usando NPMs. Este tipo de sistemas presenta una serie de ventajas que incrementan su poder de acción:

- Se pueden manipular mediante un campo magnético externo, por lo que se pueden dirigir fácilmente a la zona del tumor.
- La superficie de las NPMs puede ser modificada para direccionar los nanosistemas mediante el uso de ligandos de direccionamiento, tales como anticuerpos frente a determinados receptores que estén sobreexpresados, o ligandos de receptores que sean específicos del tejido.
- Pueden recubrirse con diferentes moléculas para evitar la pérdida del fármaco y aumentar su vida media en sangre, evitar la agregación en el torrente sanguíneo por la unión a proteínas de la sangre y su posterior eliminación o pasar desapercibidas para el sistema inmunitario.

- Las NPMs pueden usarse para tratar las zonas tumorales mediante hipertermia magnética.

Gracias a estas ventajas se pueden solventar algunos de los grandes problemas en los tratamientos del cáncer como son la corta vida media en sangre, la poca solubilidad en soluciones acuosas, y los efectos secundarios adversos. Con la encapsulación de fármacos en nanosistemas dirigidos basados en NPMs se puede incrementar la duración de la vida media del fármaco, evitar las pérdidas del mismo antes de poder llegar al tumor, aumentando así su duración y efecto. Además, al estar dirigidos hacia células tumorales, se evitan los efectos secundarios o toxicidad inespecífica.

Este trabajo se centra en el desarrollo de nanosistemas de direccionamiento basados en SPIONs dirigidos hacia células tumorales con sobreexpresión de receptores de la familia de EGFR (HER) para tratarlos con Camptotecina (CPT), un agente quimioterápico que bajo las dosis adecuadas induce la muerte celular por apoptosis, un tipo de muerte celular menos agresiva e inflamatoria. A pesar de su gran potencial como agente quimioterapéutico, la CPT presenta una baja eficacia antitumoral debido a su baja solubilidad en agua y su inestabilidad química. Se han creado derivados de la CPT con una solubilidad y estabilidad mejorada, sin embargo han demostrado tener mucha menos actividad en comparación con la CPT <sup>69</sup>.

## 4. Sistema expresión de vectores baculovíricos (BEVS)

Los baculovirus (familia *Baculoviridae*) pertenecen a un grupo diverso de virus que infectan a muchas especies diferentes de insectos. Las cepas de estos virus son altamente específicas de las especies a las que infectan y no se conoce propagación a cualquier otro huésped no invertebrado, una característica que hace al sistema de expresión baculovírico la plataforma ideal para su uso en el desarrollo de nuevo fármacos <sup>70</sup>.

Los baculovirus que infectan lepidópteros son los más extensamente descritos. Presentan un genoma circular de ADN de doble cadena contenido en una nucleocápsida (NC) de forma de bastón. El nombre baculovirus hace referencia a la morfología de las partículas virales cuyo tamaño oscila entre los 30-60 nm de ancho por 250-360 nm de largo, dependiendo del tamaño del genoma.

La familia *Baculoviridae* a su vez se divide en dos subfamilias: *Eubaculovirinae* (baculovirus ocluidos) y *Nudibaculovirinae* (baculovirus no ocluidos). La primera subfamilia produce estructuras cristalinas llamadas “cuerpos de oclusión” (OB, del inglés *Occlusion Bodies*) y a su vez se puede subclasificar en dos géneros: virus de la granulosis (GV por Granulovirus) y virus de la poliedrosis nuclear (NPV por Nucleopoliedrovirus), que se distinguen según la proteína mayoritaria que conforma los cuerpos de oclusión. Los NPV presentan cuerpos de oclusión (OB) (Figura 8) de un tamaño aproximado de unas 3  $\mu\text{m}$  y cuya proteína mayoritaria es la poliedrina, y los del género GV se caracterizan por producir cuerpos de oclusión (OB) más pequeños, de geometría ovoide de unas 0,5  $\mu\text{m}$  que normalmente contienen un solo virión y cuya proteína mayoritaria es la granulina <sup>71</sup>.

Los Nucleopoliedrovirus (NPV) se subdividen según el número de nucleocápsidas que contienen: MNPV (del inglés *Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus*) para aquellos que contienen múltiples nucleocápsidas empaquetadas dentro de una membrana común y SNPV (del inglés *Single Nuclear Polyhedrosis Virus*) si contienen una sola.

La capacidad de los baculovirus de replicarse eficientemente dentro del hospedador y diseminar la infección dentro de una población de insectos se debe principalmente a la existencia de dos fenotipos de partículas infectivas dentro del ciclo

de vida del virus <sup>70</sup>: virus ocluidos (ODV del inglés *Oclusion-Derived Virus*) y virus brotantes (BV, del inglés *Budded Virus*) (Figura 8). Los ODV son embebidos por una matriz cristalina de poliedrina que forman los cuerpos de oclusión (OB) y son los responsables de la transmisión horizontal de la enfermedad entre los individuos susceptibles de una población. Los BV son los responsables de la transmisión de la infección de una célula a la otra y de un tejido a otro dentro del mismo insecto <sup>71</sup> (Figura 8).

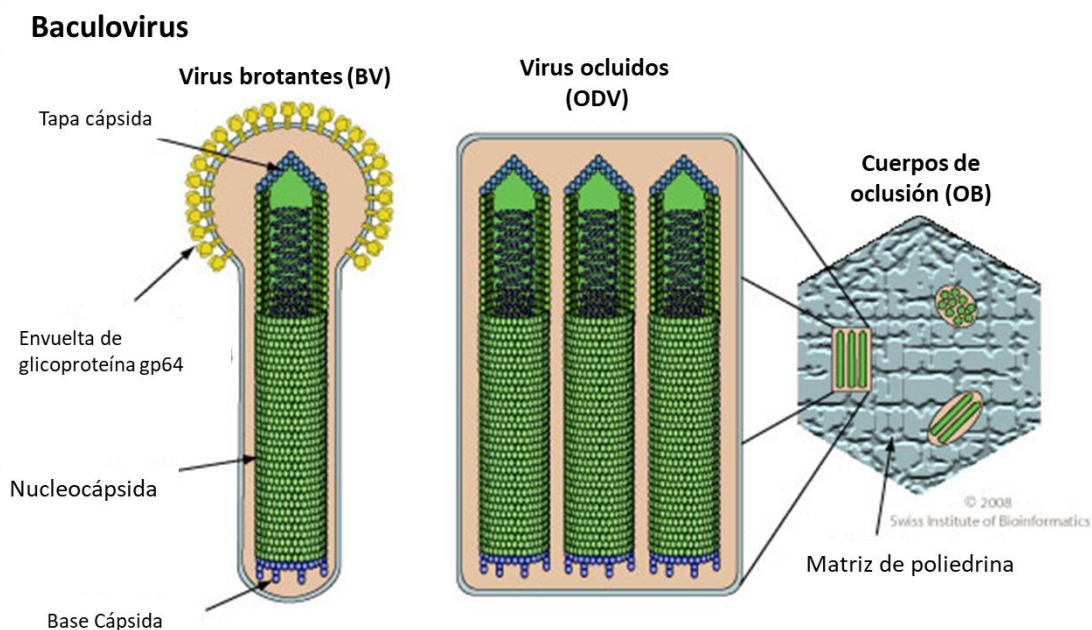


Figura 8. Morfología de los baculovirus ocluidos subfamilia *Eubaculovirinae* <sup>72</sup>

El virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV) es la cepa más estudiada de los Baculovirus <sup>70</sup>. Su genoma ha sido mapeado y secuenciado totalmente. Debido a la flexibilidad de las nucleocápsidas, las partículas de baculovirus recombinantes pueden albergar grandes secuencias de ADN foráneo, por lo que es un buen candidato para la producción de proteínas recombinantes.

A diferencia de la mayoría de otros virus de ADN, la expresión de genes del baculovirus ocurre en cuatro fases <sup>73</sup>: fase inmediata, temprana, tardía y muy tardía. En la fase inmediata, la ARN polimerasa II codificada por el hospedador, transcribe los

genes tempranos que activarán posteriormente a los genes tardíos. En la fase temprana se transcriben los genes que codifican las proteínas necesarias para la replicación del ADN y la expresión génica tardía, incluyendo la ADN polimerasa, la helicasa, una de las cuatro subunidades de ARN polimerasa viral, y los factores esenciales tardíos. Las proteínas que impiden los mecanismos de defensa del hospedador, como los inhibidores de la apoptosis, también se producen en la fase temprana. En la fase tardía el ADN se está replicando y las proteínas necesarias para el ensamblaje del virión y de los virus brotantes (BV) se producen, incluyendo la nucleocápsida viral y las proteínas de la envuelta. En la fase muy tardía los viriones se ocluyen y dos proteínas, la poliedrina y la proteína P10, se producen en grandes cantidades. La poliedrina forma la matriz de los cuerpos de oclusión OB en el que los viriones están incrustados, mientras que P10 está involucrada en la liberación de los OB del núcleo de las células infectadas hacia el final de infección. Los promotores de la poliedrina y P10 son los que se usan para la producción de proteínas recombinantes en grandes cantidades.

Los vectores baculovíricos se usan en combinación con células de insectos o larvas para producir este tipo de proteínas. Este sistema es capaz de realizar las correctas modificaciones postransduccionales en comparación con los sistemas de expresión procariotas. Las células de lepidóptero usadas en el sistema de producción baculovírico son fáciles de crecer y de mantener, no necesitan CO<sub>2</sub>, pueden crecer en medio sin suero y los cultivos son fácilmente escalables. Además, los lepidópteros están libres de patógenos humanos.

Cabe destacar el uso de la secuencia de la bombixina en el diseño de secuencias para expresión de proteínas recombinantes en el sistema de expresión baculovírico. La bombixina es un péptido cerebral de la polilla de seda *Bombyx mori*. Esta hormona se segrega en las células neurosecretoras de *Bombyx*<sup>74</sup>. El precursor de este péptido tiene homología con las proteínas de la familia de la insulina de los vertebrados<sup>75</sup>. Al ser un péptido pequeño que se secreta al medio extracelular, la secuencia de este péptido se añade en multitud de diseños de secuencias para producir proteínas recombinantes en el sistema de producción baculovírico, ya que puede favorecer que la célula secrete la proteína al medio extracelular y así simplificar el proceso de purificación de la proteína recombinante<sup>73,74</sup>.

Las proteínas producidas mediante este sistema se usan para estudios funcionales o preparación de vacunas. La primera vacuna producida en el sistema de expresión de

baculovirus, que se aprobó y comercializó, se dirige contra la peste porcina clásica o la fiebre porcina (Intervet) la cual va acompañada de una prueba serológica <sup>70,73</sup> que también se produjo en este sistema, permitiendo así la discriminación entre animales infectados y vacunados (de ahí el nombre de la vacuna DIVA o vacuna marcadora). La primera vacuna para humanos producida en el sistema de expresión baculovírico es la que protege contra el cáncer cervical (Glaxo-SmithKline). Recientemente se están desarrollando baculovirus como vectores de terapia génica para su uso en humanos <sup>76-78</sup>.



## Capítulo 2. Materiales y Métodos



## 1. Materiales

A continuación, se detallan los materiales usados en este proyecto:

- Células competentes: *E.coli* DH5 $\alpha$  (ThermoFisher).
- Vector de transferencia pVL1392 y pBAC4x-1 (GeneArt Invitrogen).
- MV-DNA: ADN lineal de AcMNPV. (GeneArt Invitrogen).
- LB (Lennox).
- Bacto Agar (BD).
- Cebadores (Eurofinsgenomics).
- Taq Polimerasa (Bioline).
- Anticuerpo anti StrepTag® HRP Conjugate, (Merck Millipore).
- Anticuerpo Anti -EGFR (528) AF488 sc - 120 (Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpo StrepMAB - Classic Chromeo 488 (Iba Lifesciences).
- Coomassie Blue (Bio-Rad).
- Enzimas de restricción: NotI, XmaI, XhoI, BamHI, BglIII y XbaI (ThermoFisher).
- Ligasa (ThermoFisher).
- Lipofectamina (Invitrogen).
- Agarosa (Sigma-Aldrich).
- RedSafe Reagent (Intron).
- Hyperladder I y IV (Bioline).
- Tris/Borate/EDTA 1X (Bio-Rad).
- Tris/Glycine/SDS 1X (Bio-Rad).
- Tris/Glycine 1X (Bio-Rad).
- 2-B.mercaptoetanol (Merck).
- Bradford Protein assay (Bio-Rad).
- Kit “Plasmid DNA Purification” (Intron).
- Kit “Isolate PCR and Gel” (Bioline).
- Kit High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Roche).
- Grace's insect medium (Gibco).
- Suero fetal bovino y Antibiótico (Sigma-Aldrich).
- SensiMix SYBR Hi-ROX (Bioline).

- Columna de purificación de sefarosa *StrepTrap HP* (Ge Healthcare)
- cloruro de hierro (II) tetrahidrato y cloruro de hierro (III) hexahidrato (Sigma-Aldrich).
- Ácido succínico (Sigma-Aldrich).
- Poli-etilenglicol amino terminado (PEG; 1500 g/mol) (Sigma-Aldrich).
- N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC) (Alfa Aesar).
- N-Hidroxisuccinimida (NHS) (Alfa Aesar).
- Camptotecina (CPT) (Alexis Biochemicals).
- FITC Annexin V (BD Biosciences).
- LysoTracker Red DND - 99 (ThermoFisher).
- Cubreobjetos de vidrio de 1 mm de espesor Goldseal No.1 (ThermoFisher).
- Medio de montaje para fluorescencia VECTASHIELD® (Vector Laboratories).

## 2. Obtención de los ligandos de direccionamiento

- *Diseño de las secuencias*

A partir de la bibliografía científica consultada se diseñan las secuencias de ADN que darán lugar a las proteínas de interés y se recurre a un servicio externo (GeneArt Invitrogen) para su síntesis química.

Para poder extraer las secuencias de interés e introducirlas en los vectores de transfección, dichas secuencias se diseñan con regiones de restricción flanqueantes para asegurar la extracción de la secuencia completa y su correcta inserción en los vectores. Además, se añade una secuencia de un péptido de secreción, bombixina.

- *Preparaciones de Vectores*

Los vectores con las secuencias se amplifican mediante transformación bacteriana, a partir de bacterias competentes. Se utiliza la cepa de *E.coli* DH5 $\alpha$  tratadas por choque térmico para que posean un alto número de poros en su membrana que las hacen muy permeables permitiendo que el ADN exógeno entre y se replique con mayor rendimiento. Para ello se utilizan 100 ng de secuencia de interés y 50  $\mu$ l de cultivo de bacterias de DH5 $\alpha$  (eficiencia de transformación de  $1.5 \cdot 10^8$  t/ $\mu$ l). El procedimiento fue el siguiente: 30 minutos en hielo, después se aplica un choque térmico a 42°C durante 30 segundos y de nuevo 5 minutos en hielo. Se añaden 3  $\mu$ l de glucosa 50% y 800  $\mu$ l de LB líquido y se incuba durante una hora a 37°C en agitación para mejorar la inserción del ADN en la bacteria. Posteriormente se realiza la siembra en las placas de LB sólido suplementado con antibiótico selectivo específico. Se siembran diferentes cantidades de la transformación y se incuban boca abajo a 37°C durante 15 horas.

Las colonias que han aparecido se pican y se lleva a cabo su sobrecrecimiento en medio líquido, 10 ml de LB líquido suplementado con el antibiótico que corresponda y se incuban a 37°C durante toda la noche (15h). De los cultivos de bacterias obtenidos se extrae el ADN para comprobar que los insertos de interés se han amplificado y poder aislarlos de los vectores mediante cortes con sus respectivas enzimas de restricción. Se

utiliza el *kit “Plasmid DNA Purification”* de Intron siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN obtenido se cuantifica en el equipo Nanodrop (ThermoFisher).

Las secuencias de interés se aíslan y se linearizan los vectores mediante una digestión múltiple con las enzimas de restricción. Las enzimas utilizadas son: NotI, XmaI, XhoI, BamHI, BglII y XbaI (ThermoFisher). Siguiendo las indicaciones del fabricante se digieren las secuencias y los vectores. Posteriormente se realiza una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE para comprobar las bandas obtenidas por la acción de las enzimas de restricción.

Las bandas correspondientes a las secuencias de interés y a los vectores linearizados se aíslan del gel para extraer el ADN del gel. Se usa el *kit “Isolate PCR and Gel”* de Bioline de purificación de ADN siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN obtenido se cuantifica en el equipo Nanodrop (ThermoFisher).

Se ligan las secuencias de interés con el vector correspondiente. Se utiliza la T4 Ligasa (ThermoFisher) siguiendo las indicaciones del fabricante. El producto de ligación se somete de nuevo a un proceso de transformación bacteriana para amplificar los vectores de transfección. Una vez obtenidos los cultivos de bacterias en LB líquido se extrae el ADN de dichos cultivos y se realizan una PCR con cebadores específicos y el *kit MyTaq™ DNA Polymerase* (Bioline) para comprobar que los fragmentos obtenidos corresponden a los vectores que portan las secuencias de interés. Se usa un termociclador con el siguiente programa: 1 ciclo 2 min 95°C; 26 ciclos de 45s 95°C, 1 min 52°C, 3,5 min 72°C; 1 ciclo 10 min 72°C.

- *Obtención Working Viral Bank (WVB)*

En este apartado se explica el proceso de creación del Working Viral Bank (WVB) o virus de trabajo.

En primer lugar, se realiza una cotransfección en células de insecto Sf21 (células de ovario *Spodoptera frugiperda*) sembradas en placas de 6 pocillos. Para dicho procedimiento se usa una mezcla que contiene:

- Lipofectamina, es un agente muy utilizado en las transfecciones ya que tiene la capacidad de abrir poros en la membrana.

- El producto obtenido tras la ligación y posterior amplificación, el vector con la secuencia incorporada.
- ADN lineal de *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV).

Todo esto se mezcla en 1 ml de medio sin suero ni antibiótico y se añade a los pocillos donde las células se encuentran en un alto porcentaje de confluencia (70-80%). Tras 5 horas de incubación a 28°C en oscuridad se añade 1 ml de medio suplementado con antibiótico y suero (10%) y se incuban durante 5 días bajo las mismas condiciones (28°C, oscuridad) ya que los virus son fotosensibles

A los 5 días de incubación se recogen las células de los pocillos, se centrifugan durante 5 minutos a una velocidad de 800 xg y se recoge el sobrenadante, que es donde están los virus que se han formado, esto se denomina P0. Se necesita amplificar esa cantidad de baculovirus producida. Para ello se realiza una segunda infección en células para amplificar la cantidad de virus con una multiplicidad de infección (MOI) < 1. (100 µL del sobrenadante obtenido se añaden a un Flask T75 cm<sup>2</sup> con células Sf21 con un alto porcentaje de confluencia). Se incuban durante 5 días a 28°C y en oscuridad. Se recogen de nuevo las células, se centrifugan 5 min a 800xg y se preserva el sobrenadante donde están los virus, esto se denomina P1.

La multiplicidad de infección (MOI) es la cantidad de genomas virales que hay para infectar las células. Se usa una MOI baja (<1) cuando queremos replicar los virus, para que las células no sufran daño en exceso por la infección, pero que el virus no sea capaz de replicarse. Se usa una MOI alta (>1) para producir las proteínas de interés.

Para la caracterización de los virus de trabajo mediante RT-qPCR y secuenciación Sanger. Se extrae el ADN viral con el kit de extracción de ADN “High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante

Se realiza una RT-qPCR para titular los virus y calcular las unidades formadoras de placas por mililitro (pfu/ml) utilizando el método de Hitchman (Hitchman, Siaterli, Nixon, & King, 2007). Se usa el kit “SensiMix SYBR Hi-ROX” de Biorline. Se prepara una mastermix que contiene 12,5 µl de SYBR, 2 µl de cada cebador a 100 nM, 2,5 µl de agua libre de proteasas por cada muestra. En cada pocillo se añaden 19 µl de la mastermix y 1 µl de ADN. Se usa un termociclador 7900HT de ThermoFisher con el

siguiente programa: 1 ciclo 10 min 95°C; 36 ciclos 15s 95°C, 30s 52°C y 30s 72°C; 1 ciclo 15s 95°C; 1 ciclo 20s 60°C; 1 ciclo 15s 95°C.

Para la secuenciación Sanger se realiza una PCR con cebadores específicos y el kit MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline). Se usó termociclador de Bio-Rad con el siguiente programa: 1 ciclo 2 min 95°C; 26 ciclos de 45s 95°C, 1 min 52°C, 3,5 min 72°C; 1 ciclo 10 min 72°C.

Los cebadores que flanquean las secuencias y cebadores internos de la secuencia.

Los cebadores utilizados para la RT-qPCR son los siguientes:

Primer Fw 5' – CGGCGTGAGTATGATTCTCAA- 3'

Primer Rv 5' – ATGAGCAGACACGCAGCTTTT- 3'

Los cebadores utilizados para la PCR y la secuenciación son los siguientes:

Para pVL1392 (NRG):

PolH Fw 5' – AAATGATAACCATCTCGC- 3'

PolH Rv 5' – CAACAACGCACAGAATCTAGC- 3'

Para pBAC4X-1:

EGFR\_L PolH\_Fw\_Rv 5' – CCATCTCGCAAATAAATAAGTA- 3'

1629DWN 5' – CTGTAAATCAACAACGCACAG- 3'

EGFR\_P PolH\_Left\_Fw 5' – AGTCCCCCTTGTTGTAAGTG- 3'

AS603UTR 5' – GTCTATCAATATATAGTTGCT- 3'

- *Infección de células y Producción de Proteínas*

Para producir las proteínas de interés, las células y las larvas se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) => 5.

Para las células se siguió el mismo protocolo de la obtención del WVb, 5 días en oscuridad a 28°C.

La infección de larvas de *Trichoplusia ni* con los virus de trabajo, se realiza con una dosis de 3ng del virus de trabajo y un volumen final de 10  $\mu$ l. Utilizando una jeringa Hamilton, se administran los 3ng por vía parenteral, en la parte ventral del insecto entre los anillos 2-3 más cercanos a la parte posterior del mismo. Se infectan un total de 40 larvas de cada uno de los virus de trabajo, además se inoculan 5 larvas control con medio de cultivo, estas larvas servirán como control de inyección (y dos larvas sin inocular, como segundo control (negativo)). Una vez inoculadas, las larvas se incuban con temperatura ( $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) y humedad ( $75\% \pm 5$ ) controladas durante 5 días. Se realiza un seguimiento diario donde se comprueba que las larvas infectadas con el virus de trabajo poseen signos y síntomas asociados a la infección y los controles por el contrario no. Transcurridos los 5 días, se recogen las larvas en tubos de centrífuga, de 5 en 5, indicando peso medio y peso total. Se revisan también las larvas controles, que llegan a su estadio final de pupa. Las larvas se congelan rápidamente metiendo el tubo en nitrógeno líquido y se almacenan a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento.

Para solubilizar las proteínas probamos con dos tipos de buffer diferentes, uno de matriz TRIS (100mM Tris, 150mM NaCl) a un pH de 8.5 y otro de matriz Citrato (50mM de Sodio Monocitrato, 150 mM NaCl) a un pH de 5.5. Como solubilizadores se probaron diferentes compuestos:

- CHAPS al 0.5% de concentración peso/volumen, un detergente zwitterónico. Los grupos terminales de estos detergentes contienen el mismo número de cargas positivas y negativas lo que resulta en una carga neta nula <sup>79</sup>. Este tipo de detergentes han sido usados en la literatura para la solubilización de diferentes receptores de membranas biológicas y son fácilmente dializables <sup>80</sup>.
- Sarcosyl o lauril sarcosinato de sodio al 1% de concentración peso/volumen. Es un surfactante aniónico englobado en la categoría de detergentes iónicos. Este detergente se utiliza para permeabilizar las células y extraer proteínas para técnicas como Western Blot o ELISA. La aplicación más importante que es que este detergente permite la solubilización y el correcto plegamiento de proteínas recombinantes <sup>79</sup>.
- Nonidet™ P 40 y Triton™ X-114 al 1% de concentración peso/volumen. Son detergentes no iónicos y no desnaturalizantes. Son muy similares, solo difieren en el número promedio de micelas y en la distribución del tamaño de los grupos terminales <sup>79</sup>.

Además, se usaron 20 ciclos de sonicación de 10 segundos con intervalos de 10 segundos entre ellos. Posteriormente los extractos se sometían a un proceso de centrifugación de 30 min a 16.000 xg y se separaba el sobrenadante del pellet y se guardaban las dos fracciones.

Para la purificación de los ligandos se usó una columna de sefarosa con resina de Streptavidina. La purificación se llevó a cabo en un equipo ÄKTA FPCL (GE Lifesciences) con una columna de 1 ml StrepTrap HP de GE Lifesciences. Las fracciones de elución de los ligandos de direccionamiento se pasaron por un filtro de centrifugación de corte molecular Amicon® Ultra Centrifugal Filters (Merk Millipore), para eliminar los detergentes, concentrar la muestra y cambiar progresivamente el buffer de elución por buffer PBS, para su uso en cultivos celulares.

Para el almacenamiento de las fracciones purificadas se alicuotaron en y se guardaron muestras tanto a -20°C para su uso posterior como a -80°C para su conservación durante un largo período.

### 3. Análisis de proteínas por Western Blotting

- *Cuantificación de proteínas por el método de Lowry*

Para determinar la concentración de proteínas del homogenado celular se usó el método colorimétrico de Lowry <sup>81</sup>. Para ello se realizó una dilución 1/5 de la suspensión celular y, siempre por triplicado, se procedió a medir con un lector de placas POLARstar Omega (BMG Labtech) 5  $\mu$ L de la muestra diluida, agua destilada en el caso del blanco, 25  $\mu$ L de tartrato de cobre alcalino y 200  $\mu$ L de Reactivo de Folin. Se deja en oscuridad 30 minutos antes de su lectura a 550 nm. La cantidad de proteína se determinó mediante una recta patrón realizada previamente con cantidades conocidas (0,2-1,5 mg/ml) de albúmina de suero bovina, BSA.

- *SDS-Page y Western-Blotting*

El análisis de proteínas presentes en las muestras celulares lisadas se realizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), según el procedimiento descrito por Laemli <sup>82</sup>. La separación de proteínas se resolvió en un sistema MiniProtean III (BioRad) y con tampón de electroforesis (Tris/Glycine/SDS, BioRad), se separaron las proteínas en geles de acrilamida/bis acrilamida (BioRad), donde el gel condensador y separador se fabricaron al 4 y 12,5%, respectivamente. La electroforesis de las proteínas se realizó a 120 V en tampón de electroforesis TGS-BioRad (Tris/Glicina/SDS). Realizada la electroforesis, se realizó una transferencia a membrana mediante el sistema Trans-Blot (SD, Semi-Dry Transfer Cell con fuente de alimentación BioRad Power Pac 1000) a voltaje constante 25 V y durante 45 minutos en tampón de transferencia TG (Tris/Glycine, BioRad). Se usaron membranas de Nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences). Una vez finalizada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con una solución de Rojo Ponceau al 0.5% en ácido acético al 1% para comprobar la eficiencia de la transferencia. Tras desteñir el rojo de Ponceau con ácido acético 1% las membranas se bloquearon con

TTBS (Tris 20mM pH 7.6, NaCl 150 mM+Twenn20 0,05%) + Leche en polvo al 0,5% a temperatura ambiente durante 1 hora.

Para los experimentos en condiciones No desnaturalizantes (western blot Nativo) se usó el mismo procedimiento, salvo que todos los Buffers carecían de SDS para que no desnaturalizara las proteínas.

- *Dot-Blotting*

La metodología empleada consistió en la activación de la membrana PVDF (Immobilon Transfer Membranas, Millipore) con metanol durante 20 segundos. Las muestras se colocaron directamente sobre una membrana de polivinildifluoruro PVDF quedando las moléculas adsorbidas a la misma. Se bloquearon con TTBS (Tris 20mM pH 7.6, NaCl 150 mM+Twenn20 0,05%+ Leche en polvo al 0,5%) a temperatura ambiente durante 1 hora.

- *Inmunotinción con anticuerpos y revelado con líquido de electroquimioluminiscencia (ECL)*

Las membranas ya bloqueadas se incubaron con los anticuerpos primarios en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se lavaron 3 veces durante 5 minutos con TTBS. La detección de la proteína se realizó por quimioluminiscencia usando el Kit comercial Immun-Star HRP Chemiluminiscent (BioRad Laboratories).

Los anticuerpos para la detección de los ligandos de direccionamiento, diluidos en TTBS + Leche en polvo al 0,5%, que se ha utilizado es el siguiente: Anticuerpo StrepTag® II Antibody conjugado con peroxidasa de rábano HRP, de Merk Millipore (71591)

#### 4. Cultivos celulares

En este proyecto de investigación se ha trabajado con las siguientes líneas celulares. Fibroblastos dérmicos humanos de adulto, línea HDF; células de carcinoma epidermide humano, línea A431; células de carcinoma hepatocelular, línea HepG2.

Los cultivos de la línea HDF se mantuvieron en medio *D-MEM 4500 mg/L de Glucosa, L-Glutamina, Piruvato* (Sigma Aldrich) suplementado con solución de antibióticos (Sigma Aldrich) y 20% de suero fetal bovino (FBS, Sigma Aldrich). Los cultivos celulares de las líneas A431 y HeLa se mantuvieron en medio *D-MEM 4500 mg/L de Glucosa, L-Glutamina, Piruvato* (Sigma Aldrich) suplementado con solución de antibióticos (Sigma Aldrich) y 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma Aldrich).

Todos los cultivos se mantuvieron en un incubador de CO<sub>2</sub> con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire, a 37°C (*Forma Scientific, CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator*).

- *El ensayo de reconocimiento ligando-receptor.*

Las células A431 se sembraron en placas de 6 pocillos sobre un cristal cubreobjetos a una confluencia del 50% con medio *D-MEM 4500 mg/L* con 10% de FBS. Tras 24 horas, las células se inocularon con 25 µg rFab o rNRG y se incubaron durante varios tiempos en un intervalo desde 0 a 120 minutos.

En cada uno de los tiempos se recogía el cubreobjetos con las células, se lavaba con PBS y se procedía tal y como se describe en el apartado de inmunofluorescencia.

#### 5. Análisis de la expresión y localización proteica por inmunofluorescencia

Las células se cultivaron sobre cubres estériles en placas de 6 pocillos. Una vez alcanzada la densidad celular deseada se fijó la monocapa celular durante 5 minutos con una mezcla 3,8% Paraformaldehído en agua + NaOH 10µM + PBS 20X (62,4µl/ml). Tras retirar el paraformaldehído se permeabilizaron las células con saponina 0,1% en PBS durante 5 minutos y se lavaron 3 veces con PBS+Tween-20 (0,05%). Las muestras ya preparadas para la inmunotinción se incubaron durante 1 hora a 37° en presencia del anticuerpo primario (dilución 1:100 en PBS+Tween-20 (0,05%)). Pasado el tiempo de

incubación se lavaron las células 3 veces con PBS+Tween-20 (0,05%). Tras los lavados se tiñeron los núcleos con DAPI (ThermoFisher) a una concentración 1mg/ml en H<sub>2</sub>O durante 5 minutos, se lavaron y se montaron los cubres sobre portas con medio de montaje para fluorescencia (Vector Laboratories).

Los anticuerpos utilizados son los siguientes: Para la detección de los ligandos de direccionamiento StrepMAB-Classic conjugado con Chromeo 488 Iba Lifesciences (2-1544-050). Para la detección del receptor EGFR: Anti-EGFR (528) conjugado con Alexa Fluor® 488 Santa Cruz Technologies (AF488 sc-120). Para la detección de los lisosomas:

Lysotracker Red DND-99 ThermoFisher (L7528).

Para la visualización de las muestras inmunoteñidas se empleó un microscopio LEICA (TCS SL) o en su caso, DeltaVision system (Applied Precision; Issaquah,) con un microscopio Olympus IX-71. Para ver DAPI, se indujo una excitación a 350 nm (UV), observándose fluorescencia azul a 470 nm. Para poder observar la fluorescencia verde (excitación 488nm) en los que casos en que fue necesario, se empleó un filtro específico, observándose señal a 525nm. Para la fluorescencia roja se aplicó una excitación a 555nm para obtener señal a 620nm. La colocalización se consiguió a través de la superposición de imágenes.

Con el programa Image J, se cuantificó la fluorescencia de las imágenes usando el método de la “fluorescencia celular total corregida” (CTCF por sus siglas en inglés)<sup>83</sup> usando la siguiente fórmula:  $CTFC = \text{Densidad Integrada} - (\text{Área de la célula seleccionada} \times \text{Media de fluorescencia del fondo})$ .

## 6. Análisis celular por Citometría de flujo

Las células se incubaron con el anticuerpo Anti-EGFR (528) conjugado con Alexa Fluor® 488 Santa Cruz Technologies según las instrucciones del fabricante. La detección de los niveles de fluorescencia se realizó con el citómetro FACScalibur TM (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Para la detección de la apoptosis se usó kit comercial (FITC Annexina V Apoptosis Kit de BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante. Para diferenciar las

células que habían perdido la integridad de la membrana plasmática, se añadió Ioduro de Propidio (PI) a una concentración final de 10  $\mu\text{g/ml}$  inmediatamente antes del análisis. Las células apoptóticas fueron identificadas mediante citometría de flujo con el citómetro BD FACSAria Cell Sorter TM (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Los anticuerpos utilizados son los siguientes: Para la detección de los ligandos de direccionamiento StrepMAB-Classic conjugado con Chromeo 488 Iba Lifesciences (2-1544-050). Para la detección del receptor EGFR: Anti-EGFR (528)

## 7. Análisis de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó con un test basado en la resazurina, In Vitro Toxicology Assay Kit, Resazurin based (Sigma-Aldrich) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos hasta alcanzar la confluencia deseada. Se añadieron los tratamientos con los nanoconjugados en diferentes concentraciones y tiempos. Se retiró el sobrenadante, se lavan los pocillos con PBS y se añade la resazurina. Las células viables reducen la resazurina, de manera que se puede generar una medida cuantitativa de la viabilidad celular ya que existe una relación directa entre esta y la absorbancia. El cálculo de la viabilidad se realiza respecto a las células control (sin tratamiento) mediante la fórmula: % viabilidad = (Abs muestra/Abs control) x 100.

## 8. Análisis estadístico y programas utilizados

Los resultados que aparecen en esta Tesis se expresan como la media aritmética de las distintas repeticiones  $\pm$  desviación estándar de las mismas. Los datos se analizaron haciendo uso del programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). El método utilizado para evaluar la significación de diferencias entre los resultados fue el “test de la t de Student”, aceptando como válido un nivel de significación de  $p < 0,05$  en todos los casos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 9. Síntesis de nanoconjugados

- *Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro*

Las nanopartículas de óxido de hierro (magnetita;  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) se sintetizaron siguiendo el método de co-precipitación bajo condiciones alcalinas descrito por Casula <sup>84</sup>, con ligeras modificaciones.

Se preparan dos soluciones acuosas con cantidades estequiométricas de cloruro ferroso  $\text{FeCl}_2$  (23 ml, 0,12M) y de cloruro férrico  $\text{FeCl}_3$  (4 ml, 1,4M). Las sales se disuelven con la ayuda de un baño de ultrasonidos o mediante agitación magnética. Los moles totales de hierro de partida son  $8 \times 10^{-3}$  moles. La reacción de co-precipitación se realiza al añadir a la mezcla de sales una disolución acuosa de hidróxido sódico ( $\text{NaOH}$ ; 19 ml, 6,2M), lo que provoca que la disolución cambie a color negro, lo que indica la formación de nanopartículas de magnetita ultra pequeñas (USM). Después de la adición, la mezcla se mantiene durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. A continuación, las nanopartículas resultantes se lavan por decantación magnética con agua Mili-Q tres veces para obtener las USM como un polvo oscuro. En este punto, la superficie se modifica de acuerdo con el tratamiento post-síntesis desarrollado por el grupo de Zaderenko <sup>85</sup>. Las nanopartículas obtenidas se resuspenden en una solución acuosa de ácido nítrico  $\text{HNO}_3$  (20 ml, 2M), se agitan a temperatura ambiente durante 30 minutos y se recogen por decantación magnética en forma de precipitado marrón oscuro. A continuación, se le añaden 30 ml de peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (30%). La adición se realiza gota a gota durante 30 minutos y se mantiene en un baño de hielo durante 15 horas, para evitar el riesgo de proyección debido a la reacción exotérmica con el peróxido de hidrógeno. Las nanopartículas resultantes,  $\text{MagOH}$ , se separan por decantación magnética para eliminar el sobrenadante y se lavan tres veces con acetona y se dejan secar obteniéndose 500 mg en forma de polvo marrón, con un 70% de rendimiento con respecto al Hierro.

- *Funcionalización en superficie con un polímero PEG Bis Amino terminado*

N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC, 24mg, 0,12 mmol) y N-Hidroxisuccinimida (NHS, 9,6 mg, 0,08 mmol) se añaden a 10 ml de una solución acuosa de nanopartículas MagOH (10 mg) y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añade ácido succínico (83mg) a la mezcla y se deja en agitación vigorosa durante 15 horas para que se produzca la reacción. Las nanopartículas que se obtienen se separan por decantación magnética para eliminar el sobrenadante y se lavan tres veces con acetona para obtener 6,2 mg de nanopartículas MagOH funcionalizadas en superficie con ácido succínico. Estas nanopartículas se resuspenden en 10 ml de agua y a esa disolución acuosa se le añade EDC (24mg, 0,12 mmol) y NHS (9,6 mg, 0,08 mmol) y se deja en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, 0,225 g de Poli etilenglicol (PEG) se añade a la mezcla y se agita durante 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las nanopartículas se separan por decantación magnética, quitando el sobrenadante y lavando con acetona 3 veces para obtener 6 mg de nanopartículas MagOH-PEG.

Estas nanopartículas MagOH-Succ-PEG poseen grupos amino en superficie que permiten la unión de los ligandos de direccionamiento a la superficie de las nanopartículas para continuar con el ensamblaje de los nanosistemas de direccionamiento activo

- *Encapsulación de CPT*

Para determinar la capacidad máxima de carga de las nanopartículas MagOH-PEG, se añadieron volúmenes crecientes (desde 0,1 hasta 2 ml, en pasos de 10 en 10  $\mu$ l y 10 segundos de vortex cada vez) de una disolución de CPT disuelta cloroformo: metanol (4:1, 5 mg/ml) a una solución de nanopartículas disueltas en buffer MES (50mM, pH 6,5, 10 ml, 0,7mg/ml).

Después de añadir la CPT, la disolución se agita vigorosamente durante 30 minutos y a continuación se le añade una solución acuosa de Albúmina de Suero Bovino (BSA, 100  $\mu$ l, 10%) para recubrir las nanopartículas y se incuban durante otros 30 minutos en agitación.

Las nanopartículas MagOH-PEG[CPT], cargadas con la CPT, se recuperan por decantación magnética, quitando el sobrenadante y lavando con PBS (pH 7,4) 3 veces y finalmente se resuspenden en 1 ml de PBS. Esta solución ya está lista para usar en el siguiente paso.

El contenido de CPT cargado en las nanopartículas se estimó indirectamente. Los sobrenadantes y los lavados obtenidos durante la encapsulación se midieron por espectroscopia de ultravioleta visible (UV-Vis) para determinar la cantidad de CPT encapsulada. Se preparó una curva estándar de CPT bajo idénticas condiciones y las cantidades de CPT se midieron a 370 nm.

La eficiencia de carga (Loading efficiency, LE) y la capacidad de carga (Loading capacity, LC) de las nanopartículas se calcularon de acuerdo con las ecuaciones 1 (Eq. 1) y 2 (Eq. 2) respectivamente.

$$LE(\%) = \frac{\text{Cantidad CPT en NP}}{\text{Cantidad CPT Total}} \times 100$$

Eq. 1 Eficiencia de carga de NP

$$LC(\%) = \frac{\text{Peso CPT en NP}}{\text{Peso total NP}} \times 100$$

Eq. 2 Capacidad de carga de NP

- *Estudio de liberación de CPT*

A continuación, se llevó a cabo el estudio de liberación *in vitro* para determinar el tiempo que requerían los nanosistemas para liberar toda la carga de CPT.

Se incubaron un conjunto de soluciones de Mag-PEG [CPT] (1 mg / ml; PBS, pH 7,5) a 37°C. A intervalos de tiempo predeterminados, se centrifugó la muestra correspondiente (8000 rpm, 10 minutos) y se midió la concentración de CPT liberado en el sobrenadante mediante espectrofotometría UV a 370 nm. Las muestras se procesaron por triplicado y los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar.

- *Conjugación de los ligandos de direccionamiento*

Se añadieron EDC (24 mg, 0,12 mmol) y NHS (19 mg, 0,08 mmol) a una solución en PBS de Mag-PEG [CPT] (10 ml, 6 mg) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 25 µg de ligando de direccionamiento (rFab, rNrg y rFab / rNrg) a la mezcla de reacción y se agitó durante 2 horas a 4°C. Finalmente, los nanoconjugados Mag-PEG [CPT] con ligandos de direccionamiento se recuperaron y purificaron mediante tres ciclos de separación magnética, recogida del sobrenadante y lavado con PBS Tween (PBS 0.01% Tween 20), y las nanopartículas obtenidas se resuspendieron en PBS. (pH 7,4, 50 mM) para las siguientes aplicaciones.

## 10. Caracterización Físico-Química de los nanoconjugados

Las nanopartículas sintetizadas se han caracterizado mediante las siguientes técnicas:

- *Espectroscopia Infrarroja (IR)*

Los espectros de Infrarrojo (IR) se obtuvieron con un espectrómetro marca Jasco FTIR-4100 equipado con un detector ATR (Billerica, MA, USA). La medida se promedió a 200 scans a una frecuencia de 2.5 Hz y una resolución de 1 cm<sup>-1</sup>. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente antes de las medidas.

- *Dispersión Dinámica de Luz (DLS)*

Las medidas de radio hidrodinámico de las suspensiones de NP se realizaron con un DLS (Dinamic *Light Scattering*), Zetatrac de la marca Microtrac tras la dilución de las muestras en medio acuoso.

- *Espectroscopia UV-vis*

La cuantificación de la concentración de CPT en las muestras sintetizadas se ha realizado por espectroscopía UV-vis con un espectrómetro Ocean Optics equipado con un detector HR4000 (Dunedin, FL, USA) con una rendija de difracción para el rango de 200-1100 nm con una capacidad de resolución de 0.7 nm. La fuente de luz es el modelo

DH-2000 que combina lámparas de deuterio y halógena. El contenido de CPT en los sobrenadantes se ha cuantificado mediante una recta de calibrado.

- *Difracción de Rayos X (DRX)*

El estudio de la estructura cristalina por DRX se realizó con un difractor Philips X'Pert Pro model con geometría de Bragg-Brentano y un detector X'Celerator. Los patrones de difracción se obtuvieron desde 20° a 70° ( $2\Theta$ ) en modo escaneo de intervalos, a intervalos de 0.05° y con un tiempo de conteo de 300s/intervalo. Los difractogramas se analizaron con el programa X'Pert HighScore.

- *Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)*

Las imágenes TEM obtuvieron con un microscopio Philips CM200 operando a 200 kV equipado con un filamento de hexaboruro de lantano (LaB<sub>6</sub>) y a una resolución puntual de 0,24 nm. Los análisis de las imágenes de alta resolución se adquirieron con una cámara CCD y se analizaron con el programa Digital Micrograph (Gatan Inc.) Las muestras se prepararon secando una gota de la suspensión de las nanopartículas sobre una rejilla portamuestras de carbono.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) fueron tomadas en un microscopio GeminiSEM 300.





## Capítulo 3. Resultados y discusión



## 1. Ligandos de direccionamiento

- *Diseño de las secuencias*

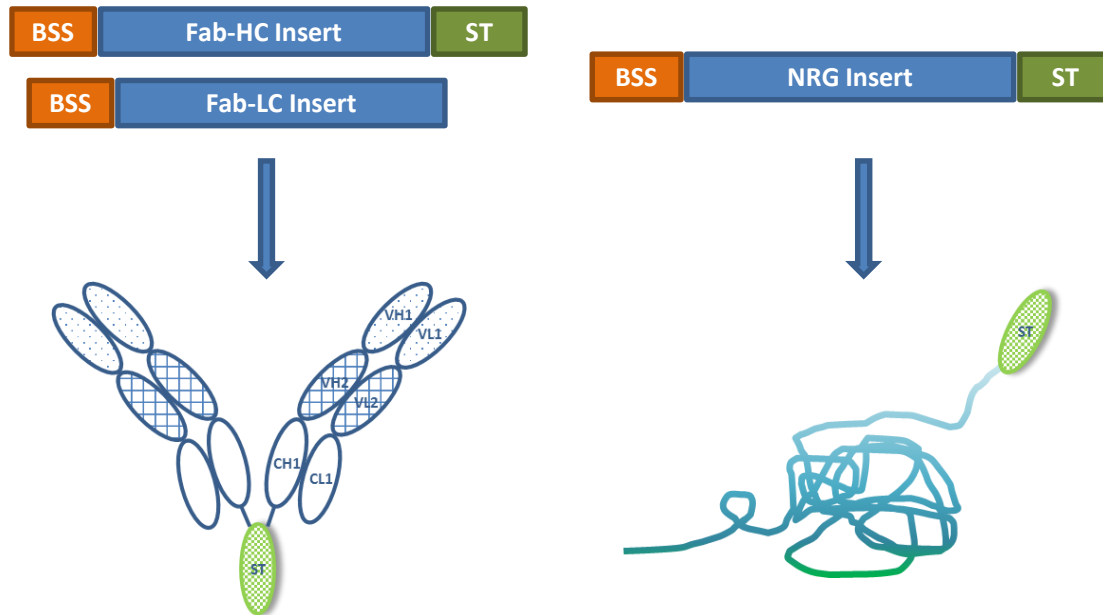
Con el fin de que los ligandos de direccionamiento puedan reconocer un mayor número de receptores de EGFR, cubriendo un mayor rango de posibles polimorfismos y mutaciones existentes, nuestra estrategia se basa en usar más de un ligando contra el mismo.

Por un lado, se diseña un anticuerpo (rFab) con un “Dominio Variable Dual” (DVD), esto es, dos regiones variables distintas colocadas en tándem en un mismo anticuerpo. Cada una de estas regiones reconoce a un epítipo diferente de EGFR (dominios IIIB y IIIC). Una de las ventajas de usar anticuerpos con DVD que puedan unirse a diferentes epítopos de EGFR es que se reduce la posibilidad de que el receptor presente mutaciones que hagan que el anticuerpo no lo reconozca<sup>86</sup>. Los anticuerpos que van dirigidos contra el dominio III del EGFR, impiden la unión del ligando EGF al receptor e inhiben la proliferación celular.

Para el diseño de la secuencia del anticuerpo se opta por usar solo la fracción de unión a antígeno (Fab), sin la fracción constante (Fc) (Fig 9a). El motivo de esta decisión fue disminuir el tamaño del anticuerpo facilitando su uso, así como evitar la unión inespecífica a receptores Fc de células en el organismo como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células B y NK, disminuyendo la estimulación del sistema inmunológico.

En cuanto al segundo ligando de direccionamiento, hemos optado por un ligando del receptor, en lugar de un anticuerpo, para expandir la funcionalidad del sistema. En la elección del ligando, aunque ErbB2 no tiene ligando conocido y ErbB3 no tiene actividad quinasa, el heterodímero entre estos dos receptores ha sido descrito como el que tiene la cascada de señalización celular más robusta de toda la familia de receptores<sup>87,88</sup>. Por esta razón, uno de los ligandos que se unen a ErbB3, la Neuregulina 2 beta (Nrg-2 $\beta$ ) se eligió como uno de los dos ligandos usados en este trabajo (Fig 9b). Además, Nrg-2 $\beta$  también es capaz de unirse y activar a ErbB4, que es capaz de formar heterodímeros ErbB3/ErbB4<sup>89-91</sup>.

De este modo, esta elección de ligandos de direccionamiento permite tratar un amplio espectro de tumores, incluyendo tanto los tumores que expresen ErbB2 como los que expresen EGFR (alrededor del 20% de los tumores de mama triple negativo).



Fi

gura 9. Representación esquemática de los ligando de direccionamiento. A) Fracción de unión a antígeno del anticuerpo (Fab) con dos dominios variables dispuestos en tándem (DVD) y la fracción constante CH1 unidos al tag de Estreptavidina para facilitar su purificación. B) Ligando Neuregulina 2 $\beta$  con el tag. Bss es la secuencia del péptido de secreción Bombixina. ST es la secuencia del Tag de Streptavidina, compuesta por 8 aminoácidos que se unen a la estreptavidina y facilita los procesos de purificación de las proteínas.

Las secuencias variables elegidas para el diseño del anticuerpo Fab contra EGFR derivan de las descritas en la patente US2009004192 A1. Los puntos que se han tenido en cuenta para el diseño de las secuencias son:

- El Fab consta de 2 cadenas, pesada y ligera, cada una de ellas con dos regiones variables complementarias en tándem. Estas regiones variables se encuentran separadas entre sí y de la fracción constante por un *linker* de 6 y 5 aminoácidos respectivamente para la cadena pesada y ligera.
- Para permitir la formación de dímeros Fab es necesario que la cadena pesada contenga CH1 y la fracción “*hinge*” o bisagra del anticuerpo.
- Para facilitar la purificación y la posterior unión a nanopartículas se añade a un tag STREP en el extremo carboxiloterminal (ST).
- Para asegurar la secreción de las proteínas recombinantes se añade el péptido de secreción Bombixina (BSS).
- Para favorecer el reconocimiento del codón de iniciación y optimizar la transducción de proteínas se añade la secuencia Kozak.

- Ambas secuencias se colocarán bajo promotores poliedrina diferentes del vector pBac4x-1.
- Se utilizará la herramienta de optimización de codones para expresión en insectos lepidópteros.

### Secuencia de la cadena ligera del anticuerpo (EGFR\_L)

A continuación, se presenta la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo. En rojo, los codones de inicio y terminación, este último por duplicado. En verde la secuencia “*Linker*” que une las secuencias de los dos dominios variables (en gris y verde) y la cadena pesada (en azul). En amarillo la secuencia Kozak. En morado la secuencia del péptido de secreción Bombixina. Las secuencias de los sitios de corte de las enzimas de restricción BamHI al inicio y XhoI al final

GGATCCCCGCCACCATGAAGATACTCCTTGCTATTGCATTAATGTTGTCAACAGTA  
 ATGTGGGTGTCAACA GACATT CAGATGACTCAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCT  
 CTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGACAAGTCAGGACATTGGCAATTATTT  
 AAAGTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACTACACAT  
 CAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGAT  
 TTTTCTCTCACCATTAACAACGTGGAGCAAGAGGATGTTGCCACTTACTTTTGCCAA  
 CACTATAATACGGTTCCTCCGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACG  
 AACTGTGGCTGCACCAGACATCGTGATGACACAAGCTGCATTCTCCAATCCAGTCA  
 CTCTTGGAACATCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGTA  
 ATGGCATCACTTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCC  
 TGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTT CAGTAGCAGT  
 GGGTCAGGAACTGATTTCACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGG  
 GTGTTTATTACTGTGCTCAAATCTAGA ACTTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACC  
 AAGCTGGAAATAAAACG AACTGTGGCTGCACC ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT  
 GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT  
 CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACT  
 CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG  
 CACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA  
 GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG  
 TTAATAACTCGAG

La secuencia de ADN de EGFR\_L codifica una proteína de 334 aminoácidos (sin incluir la Metionina inicial ni la señal de secreción) con un peso molecular predicho de 36.31 KDa y punto isoeléctrico predicho calculado de 6,71.

*MKILLAIALMLSTVMWVSTDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTV  
 KLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLEIKR  
 TVAAPDIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNL  
 ASGVDPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIF  
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL  
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC—*

### Secuencia de la cadena pesada del anticuerpo (EGFR\_P)

En **rojo**, los codones de inicio y terminación, este último por duplicado. En **verde** la secuencia “*Linker*” que une las secuencias de los dos dominios variables (en gris y verde) y la cadena pesada (en azul). En **amarillo** la secuencia Kozak. En **morado** la secuencia del péptido de secreción Bombixina. Las secuencias de los sitios de corte de las enzimas de restricción **XbaI** al inicio y **BglIII** al final. En **amarillo** el tag STREP unido por otro **linker**.

**TCTAGACCGCCACCATG**AAGATACTCCTTGCTATTGCATTAATGTTGTCAAC  
 AGTAATGTGGGTGTCAACA**GAGGTCCA**ACTGCAGCAACCTGGGTCTGAGCT  
 GGTGAGGCCTGGAGCTTCAAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAC  
 ATCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCT  
 TGAGTGGATTGGGAATATTTATCCTGGTAGTCGTAGTACTAACTACGATGAG  
 AAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCC  
 TACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTA  
 CAAGAAATGGGGATTACTACGTTAGTAGCGGGGATGCTATGGACTACTGGG  
 GTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCGTCA**GCCAGCACCAAGGGCCCC**CAGG  
**TCCA**ACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGGAGCCTGGGGGTT**CAGTGA**  
**AGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGTCACTGGATGCACTG**  
**GGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATAGGTGAGATTAATCC**  
**TAGCAGCGGTCGTAATAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGTAAGGCCACACT**  
**GACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAATTCAGCAGCCTGAC**  
**ATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGTAAGATACTATGGTTACGACGAA**  
**GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTC****GCCAGCACCAAG**  
**GGCCCC****GCGAGCACCA**AAGGCCCGAGCGTGT**TTCCGCTGGCGCCGTGCAGC**  
**CGCAGCACCAAGCGAAAGCACCGCGGCGCTGGGCTGCCTGGTGAAAGATTAT**  
**TTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGCGCGCTGACCAGCGGC**  
**GTGCATACCTTTCCGGCGGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTATAGCCTGAGC**  
**AGCGTGGTGACCGTGCCGAGCAGCAACTTTGGCACCCAGACCTATACTGC**  
**AACGTGGATCATAAACCAGCAACACCAAAGTGGATAAAACCGTGGAACGC**  
**AAATGCTGCGTGGAATGCCCGCCGTGCCCGGCGCCGCGGTGGCGGGCCCCGA**  
**GCTCACGAGGATCC****TGGAGCCACCCGCAGTTTCGAAAA****TGATGA**AGATCT

La secuencia de ADN de EGFR\_P codifica una proteína de 384 aminoácidos (sin incluir la Metionina inicial ni la señal de secreción) con un peso molecular predicho de 41.41 kDa y punto isoelectrico predicho de 7,61.

*MKILLAIALMLSTVMWVSTEVQLQQPGSELVVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPG  
QGLEWIGNIYPGSRSTNYDEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYVSS  
GDAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPQVQLQQPGAELVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWV  
KQRPGQGLEWIGEINPSSGRNNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRY  
GYDEAMDYWGQGTSVTVASTKGPASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCC  
VECPPCPAPPVAGPSSRGSWSHPQFEK--*

### Secuencia de la Neuregulina (NRG2B)

En **rojo**, los codones de inicio y terminación. En **amarillo** la secuencia Kozak. En **morado** la secuencia del péptido de secreción Bombixina. Las secuencias de los sitios de corte de las enzimas de restricción **Not I** al inicio y **XmaI** al final. En **amarillo** el tag STREP unido por un **linker**.

**kozak**    **start**                      **BSS**

**GCGGCCGCTCGACCGCCACC****ATGAAGATACTCCTTGCTATTGCATTAATG**  
**TTGTCAACAGTAATGTGGGTGTCAACACGGCAGGTTTGCTGCTCAGCGCT**  
GCCGCCGCCACTGGAGAAGGGTTCGGTGCAGCAGCTACAGCGACAGCA  
GCAGCAGCAGCAGCGAGAGGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCGAG  
AGCGGCAGCAGCAGCAGGAGCAGCAGCAACAACAGCAGCATCTCTCGTCCC  
GCTGCGCCCCCAGAGCCGCGGCCGCGAGCAACAGCCGCAGCCCCGCAGCCCC  
GCAGCCCGGAGAGCCGCCGCCCGTTTCGCGAGCCGCAGCCGCCGGCGGCATG  
AGGCGCGACCCGGCCCCCGGCTTCTCCATGCTGCTCTTCGGTGTGTGCTCG  
CCTGCTACTCGCCCAGCCTCAAGTCAGTGCAGGACCAGGCGTACAAGGCAC  
CCGTGGTGGTGGAGGGCAAGGTACAGGGGCTGGTCCCAGCCGGCGGCTCCA  
GCTCCAACAGCACCCGAGAGCCGCCCGCCTCGGGTTCGGGTGGCGTTGGTAA  
AGGTGCTGGACAAGTGGCCGCTCCGGAGCGGGGGGCTGCAGCGCGAGCAG  
GTGATCAGCGTGGGCTCCTGTGTGCCGCTCGAAAGGAACCAGCGCTACATC  
TTTTTCCTGGAGCCCACGGAACAGCCCTTAGTCTTTAAGACGGCCTTTGCC  
CCCTCGATACCAACGGCAAAAATCTCAAGAAAGAGGTGGGCAAGATCCTGT  
GCACTGACTGCGCCACCCGGCCCAAGTTGAAGAAGATGAAGAGCCAGACG  
GGACAGGTGGGTGAGAAGCAATCGCTGAAGTGTGAGGCAGCAGCCGGTAA  
TCCCCAGCCTTCCCTACCGTTGGTTCAAGGATGGCAAGGAGCTCAACCGCAG  
CCGAGACATTCGCATCAAATATGGCAACGGCAGAAAGAACTCACGACTACA  
GTTCAACAAGGTGAAGGTGGAGGACGCTGGGGAGTATGTCTGCGAGGCCGA  
GAACATCCTGGGGAAGGACACCGTCCGGGGCCGGCTTTACGTCAACAGCGT  
GAGCACCACCCTGTCATCCTGGTCCGGGGCACGCCCGGAAGTGCAACGAGAC  
AGCCAAGTCCTATTGCGTCAATGGAGGCGTCTGCTACTACATCGAGGGCAT

CAACCAGCTCTCCTGCAAGTGTCTGTGGGATACACCGGGGACAGGTGTCA  
 GCAGTTCGCAATGGTCAACTTCTCCAAAGCCGAGGAGCTGTACCAGAAGAG  
 GGTCTGACCATCACGGGCATCTGCGTGGCTCTGCTGGTCGTGGGCATCGTC  
 TGTGTGGTGGCTACTGCAAGACCAAAAAACAGCGGAAGCAGATGCACAAC  
 CACCTCCGGCAGAACATGTGCCCGGCCATCAGAACCGGAGCTTGGCCAAT  
 GGGCCCAGCCACCCCGGCTGGACCCAGAGGAGATCCAGATGGCAGATTAT  
 ATTTCCAAGAACGTGCCAGCCACAGACCATGTCATCAGGAGAGAACTGAG  
 ACCACCTTCTCTGGGAGCCACTCTGTTCTCCTTCTCACCCTGCTCCACAGC  
 CACACCCACCTCCAGCCACAGACACGAGAGCCACACGTGGAGCCTGGAACG  
 TTCTGAGAGCCTGACTTCTGACTCCCAGTCGGGGATCATGCTATCATCAGTG  
 GGTACCAGCAAATGCAACAGCCCAGCATGTGTGGAGGCCCGGGCAAGGCG  
 GGCAGCAGCCTACAACCTGGAGGAGCGGCGCAGGGCCACCGCGCCACCCTA  
 TCACGATTCCGTGGACTCCCTTCGCGACTCCCCACACAGCGAGAGGTACGTG  
 TCGGCCCTGACCACGCCCGCGCGCTCTCGCCCGTGGACTTCCACTACTCGC  
 TGGCCACGCAGGTGCCAACTTTCGAGATCACGTCCCCAACTCGGCGCACG  
 CCGTGTCTGCTGCCGCCGGCGGCCATCAGTTACCGCCTGGCCGAGCAGC  
 AGCCGTTACTGCGGCACCCGGCGCCCCCGGCCCGGGACCCGGACCCGGGC  
 CCGGGCCCCGGGCCCGGCGCAGACATGCAGCGCAGCTATGACAGCTACTATT  
 ACCCCGCGGCGGGGCCCGGACCGCGGCGCGGGACCTGCGCGCTCGGCGGCA  
 GCCTGGGCAGCCTGCCTGCCAGCCCCTTCGCATCCCCGAGGACGACGAGT  
 ACGAGACCACGCAGGAGTGC GCGCCCCCGCCGCCCGCGCGCGCGCGC  
 GCGGTGCGTCCCGCAGGACGTCGGCGGGGCCCGGCGCTGGCGCCGCTCGC  
 GCCTCAACGGGCTGGCGGCGCAGCGCGCACGGGCGGCGAGGGACTCGCTGT  
 CGCTGAGCAGCGGCTCGGGCGGCGGCTCAGCCTCGGCGTCGGACGACGACG  
 CGGACGACGCGGACGGGGCGCTGGCGGCCGAGAGCACACCTTTCCTGGGCC  
 TGCGTGGGGCGCACGACGCGCTGCGCTCGGACTCGCCGCCACTGTGCCCGG  
 CGGCCGACAGCAGGACTTACTACTCACTGGACAGCCACAGCACGCGGGCCA  
 GCAGCAGACACAGCCGCGGGCCGCCCGCGGGCCAAGCAGGACTCGGCG  
 CCACTCTCACGAGGATCCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATGATGACCC  
GGGTGCA

La secuencia de ADN de NRG2B codifica una proteína de 855 aminoácidos (sin incluir la Metionina inicial ni la señal de secreción) con un peso molecular predicho de 92.15 KDa y punto isoelectrico predicho de 9,62.

***M**KILLAIALMLSTVMWVSTRQVCCSALPPPPELEKGRCSSYSDSSSSSSSERSSSSSSSSS  
 ESGSSSRSSSNSSISRPAAPPEPRPQQQPQPRSPAARRAAARSRAAAAGGMRRDPAPGFSML  
 LFGVSLACYSPLKSVQDQAYKAPVVVEGKVQGLVPAGGSSSNSTREPPASGRVALVKVLDK  
 WPLRSGGLQREQVISVSGCVPLERNQRYIFFLEPTEQPLVFKTAFAPLDTNGKNLKEVKGIL  
 CTDCATRPKLKKMKSQTGQVGEKQSLKCEAAAGNPQPSYRWFKDGKELNRSRDIRIKYNG  
 RKNSRLQFNKVKVEDAGEYVCEAENILGKDTVRGRLYVNSVSTLSSWSGHARKCNETAKSY  
 CVNGGVCYIIEGINQLSCKCPVGYTGDRCCQFAMVNFSAEELYQKRVLITITGICVALLVVGI  
 VCVVAYCKTKKQKQMHNLHRQNMCPAHQNRSLANGPSHPRLDPEEIQMADYISKVNPAT  
 DHVIRRETETTFSGSHSCSPSHHCSTATPTSSHRHESHTWSLSESLTSDSQSGIMLSSVGTSK*

CNSPACVEARARRAAAYNLEERRRATAPPYHDSVDSLRLDSPHSERYVSALTPARLSPVDFHYS  
LATQVPTFEITSPNSAHAVSLPPAAPISYRLAEQQPLL RHPAPPGPGPGPGPGPGGADMQR  
SYDSYYYPAAGPGPRRGTCALGGS LGSLPASFRIPEDDEYETTQECAPPPPRPRARGASRR  
TSAGPRRWRRSRLNGLAAQRARAARDSLSLSSGSGGGSASASDDDADDADGALAAESTPFLG  
LRGAHDALRSDSPPLCPAADSRTYYSLDSHSTRASSRHSRGPPRAKQDSAPLSRGSWSHPQ  
**FEK**

- *Obtención de los vectores de transfección*

Para este proyecto, la co-expresión de varias proteínas recombinantes requiere un vector de transferencia con diferentes promotores. La clonación de algunas secuencias de ADN aumenta el tamaño final del vector de transferencia y esto podría suponer un bajo rendimiento del mismo, por lo que, tener plásmidos de transferencia de baculovirus de pequeño tamaño es una ventaja. Destacar que, como se describe en la literatura, la presencia de LEF-2 gen es esencial para la viabilidad de los baculovirus recombinantes <sup>71</sup>.

pBAC4x-1 (Fig 10) es un plásmido de transferencia de baculovirus diseñado para la clonación y co-expresión de hasta cuatro genes diana o múltiples copias del mismo gen en células de insecto. Los plásmidos contienen dos promotores PolH y dos promotores p10, cada uno de los cuales está aguas arriba de los sitios de clonación únicos para la inserción secuencial de las secuencias de interés. Los promotores homólogos están en orientación opuesta para minimizar la recombinación. Su pequeño tamaño, 5.917 pb, la presencia del LEF-2 gen y varios sitios de clonación múltiple (MCS) son razones que llevan a elegirlo para el vector de transferencia de baculovirus.

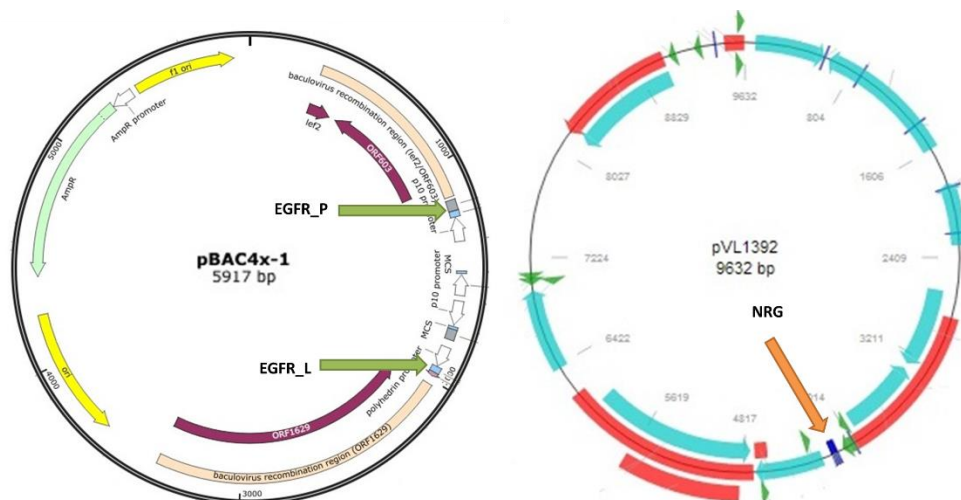


Figura 10. Representación esquemática de las secuencias de los vectores de transfección empleados para obtener los Virus de trabajo. El vector pBAC4x-1 y los sitios de inserción de las secuencias del anticuerpo, cadena pesada (EGFR\_P) y ligera (EGFR\_L). El pVL1393 y el sitio de clonación de la secuencia de la neuregulina (NRG)

El pVL1392 (Fig 10) es el vector de transferencia elegido para clonar el ligando Neuregulina, es un vector de mayor tamaño que el pBAC4x-1 (9632 pares de bases). Posee un solo promotor del gen de la poliedrina PolH y otro para el gen p10 y además contiene el gen LEF-2.

Para la obtención de las secuencias se recurrió a un servicio externo para su síntesis química. Las secuencias recibidas se encontraban insertadas en vectores independientes para su amplificación mediante transformación bacteriana.

Se disponía de 3 vectores independientes con las secuencias:

- Vector con la secuencia de la Neuregulina que se denominó NRG. Con el gen de resistencia a la kanamicina (Kan<sup>R</sup>)
- Vector con la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo que se denominó EGFR\_L con el gen de resistencia a la ampicilina (Amp<sup>R</sup>)
- Vector con la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo que se denominó EGFR\_P con el gen de resistencia a la ampicilina (Amp<sup>R</sup>)

Además, se amplificaron los vectores que se usarían para la cotransfección: pVL1392 y pBAC4x. Ambos con el gen de resistencia a la ampicilina (Amp<sup>R</sup>).

De las transformaciones bacterianas realizadas con los diferentes vectores se obtuvieron colonias en placas de LB de las cuales se picaron varias de cada uno de ellos para su sobrecrecimiento en medio LB líquido. Se extrajo el ADN de cada uno de los cultivos y se realizó una electroforesis de un microgramo de ADN de cada una de las colonias para comprobar que el tamaño correspondía a los vectores de interés.

Una vez amplificados los vectores de transfección y los que portan las secuencias, el siguiente paso fue obtener los vectores de transferencia con las secuencias de interés.

Este proceso se realizó en tres pasos: digestión con enzimas de restricción, aislamiento del fragmento de interés y ligación.

Las secuencias se diseñaron para que portaran secuencias de reconocimiento para el corte mediante enzimas de restricción al inicio y al final de las mismas para poder extraerlas e introducir las en los vectores de transfección. Así la secuencia de la NRG portaba sitio de corte de las enzimas NotI y XmaI. El vector pVL1392 también posee dichos sitios de corte aguas arriba del promotor polH. La secuencia EGFR\_L contenía

sitios de corte para las enzimas BamHI y XhoI y la secuencia EGFR\_P para XbaI y BglIII. El vector pBAC4X-1 también posee los sitios para la acción de dichas secuencias aguas arriba de los promotores polH.

Se realizó la digestión múltiple con cada pareja de enzimas de restricción de los vectores de transfección y de los vectores con la secuencia NRG, EGFR\_L y EGFR\_P. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa para separar los fragmentos de la digestión y aislar del gel las secuencias de interés y los vectores de transfección linearizados.

La secuencia de la NRG posee 2647 pares de bases y el fragmento resultante de aislarlo del vector era de 2289 pares de bases. Al tener tamaños similares fue muy difícil separarlos mediante la electroforesis en gel de agarosa, así que se optó por extraer los dos fragmentos juntos y realizar la ligación con el vector pVL1392 linearizado y la posterior transformación en bacterias. Se diseñó una digestión con la enzima de restricción XhoI de manera que, si se había insertado la secuencia de la Neuregulina, al realizar dicha digestión aparecerían 3 bandas, si se había insertado el fragmento restante del vector solo aparecerían 2 bandas y así poder diferenciar las colonias positivas para la secuencia de interés (Figura 11).

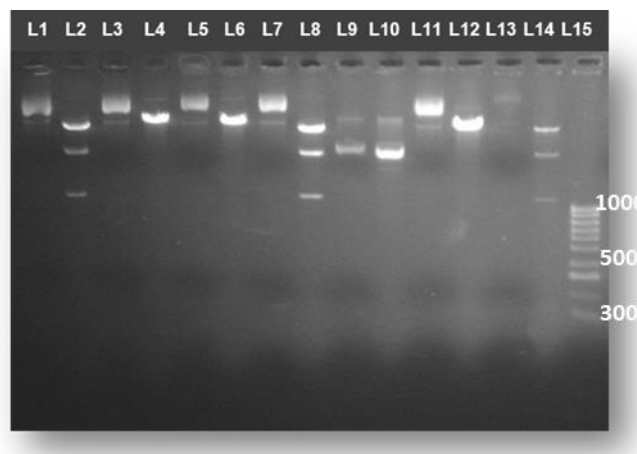


Figura 11. Digestión con enzima de restricción XhoI las colonias de pVL1392 para comprobar cuales habían incorporado la secuencia correcta. Los carriles impares corresponden al vector circular y los carriles pares el vector linearizado después de la digestión con XhoI. El carril L15 es el marcador.

Como se observa en la figura 11, que muestra el control de calidad realizado a las diferentes colonias que se habían obtenido de la transformación, los carriles L1 hasta

L14 muestran 7 colonias diferentes de Neuregulina, sin digerir y digeridas y se comprueba que las colonias correspondientes a los carriles L1-L2, L7-L8 y L13-L14 son positivas para Neuregulina; es decir, estas colonias han incorporado el vector pVL1392 y la secuencia de NRG y son las que posteriormente se usarán como vector de transfección.

El vector pBAC4X con las secuencias del anticuerpo anti EGFR se obtuvo en dos pasos: primero se introdujo la secuencia de la cadena ligera (EGFR\_L) y posteriormente se introdujo la secuencia correspondiente a la cadena pesada (EGFR\_P).

Posteriormente se realizaron los controles de calidad para comprobar que las secuencias de interés se habían incorporado a los vectores de transfección. Esta vez, se realizó una PCR con los cebadores específicos que amplificarían dichas secuencias en los vectores y se realizó una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el tamaño de las secuencias era el correcto. En la figura 12 se comprueba que las secuencias de interés se habían incorporado correctamente a los vectores de transfección y que los tamaños son los correctos para cada una de las mismas.

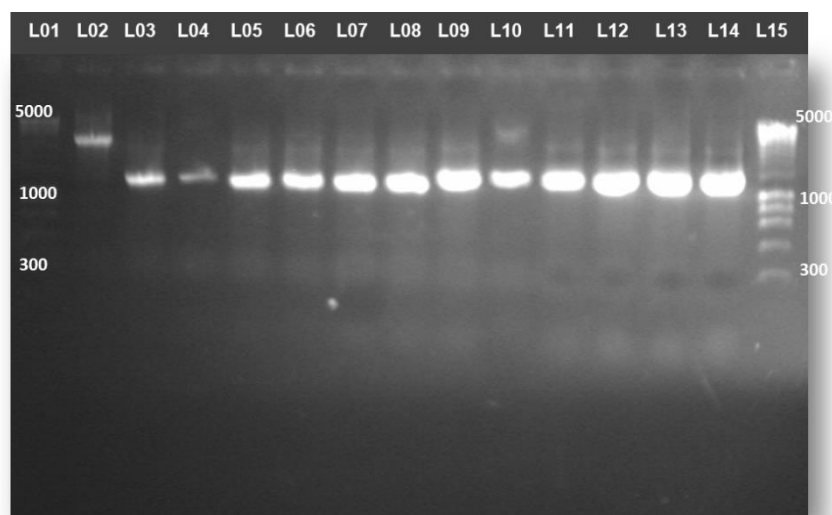


Figura 12. Productos PCR resultantes de los controles de calidad de los vectores de transfección. La banda del carril L2 corresponde a la secuencia de NRG (2600 pares de bases). Los carriles L3-L8 corresponden con la secuencia EGFR\_L, (1000 pares de bases). Los carriles L9-L14 son las secuencias EGFR\_P (1200 pares de bases).

- *Obtención Working Viral Bank*

### Cotransfección en células

Para la cotransfección en células se usó el procedimiento descrito en material y métodos. En el interior de las células se produce una recombinación homóloga que dará lugar a nuevos baculovirus que portarán en su ADN las secuencias de interés tal y como se explica en la figura 13.

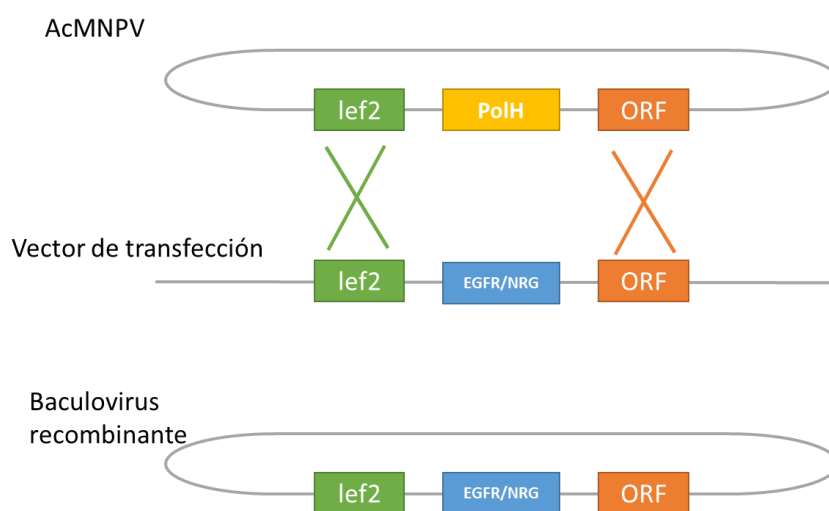


Figura 13. Proceso de Recombinación Homóloga que formará el virus de trabajo. El ADN del virus de la polihedrosis de *Autographa californica* (AcMNPV) posee el locus del gen de la polihedrina (PolH) flanqueado por el promotor del gen (ORF) y el gen del factor 2 de expresión tardía (late expression factor 2 gene lef-2), una proteína de la cápsida necesaria para la amplificación del virus <sup>71</sup>. El vector de transfección que porta las secuencias de interés también posee el promotor del gen de la polihedrina y el gen lef2. Por recombinación homóloga las secuencias de las proteínas de interés se incorporan al ADN del baculovirus AcMNPV y creando así un baculovirus recombinante capaz de infectar células de *Spodoptera frugiperda* y producir la proteína de interés.

En la Figura 14 se muestran las células antes de la infección (izquierda) y las células después de 5 días de cotransfección (derecha). Durante esos días los virus, por recombinación homóloga, han insertado la secuencia de interés en su genoma y se han replicado para formar un mayor número de virus, el sobrenadante recogido se denominó P0. Con ese sobrenadante se volvieron a infectar células Sf21 pero esta vez en FlaskT75

cm<sup>2</sup>, al cabo de 5 días en oscuridad y a 28°C, se volvió a recoger el sobrenadante obtenido de estos cultivos; este sobrenadante se denominó P1.

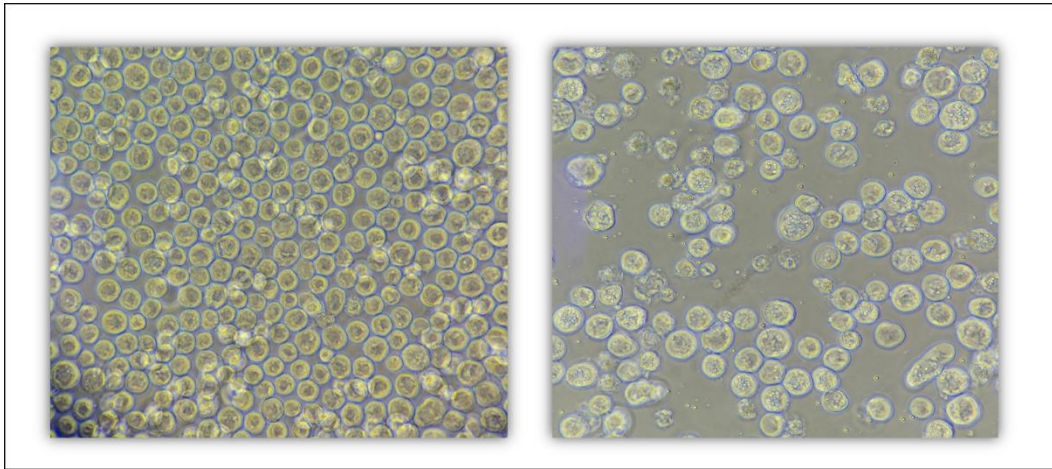


Figura 14. Células Sf21: izda. Control. Drcha. Células infectadas

#### Caracterización del virus de trabajo o WVB

Una vez obtenido el P1 se procedió a analizar los baculovirus recombinantes obtenidos de la cotransfección en células. Para ello se realizaron dos controles de calidad: Titulación de virus mediante RT-Q-PCR y Secuenciación de las secuencias de interés. Para ello se extrajo el ADN de los virus obtenidos en el P1. Mediante una PCR cuantitativa (RT-Q-PCR) se cuantifica la concentración de virus obtenidos, también denominada titulación. Los resultados se muestran en la Tabla 2: de los baculovirus que portaban la secuencia de la Neuregulina (NRG2) se obtuvo una concentración de 4,73E+07 unidades formadoras de placa por mililitro. De los baculovirus con la secuencia del anticuerpo anti-EGFR se obtuvo una concentración de 4,58E+07 unidades formadoras de placa por mililitro.

Tabla 2. Cálculo de PFU. El dato de cycle threshold (CT) corresponde a una concentración de ADN del virus por  $\mu\text{l}$  que hemos validado con una curva standard previamente. Las unidades formadoras de colonias por mililitro (pfu/ml) se calculan sabiendo que hay  $1.61\text{E}+04$  pfu por nanogramos de DNA del virus.

Titulación virus	CT	ng/ $\mu\text{l}$	pfu/ml
NRG2	12,87	2,94	$4,73\text{E}+07$
EGFR_L/P	13,72	2,85	$4,58\text{E}+07$

Para la secuenciación se realizó una PCR con el ADN del virus para amplificar los fragmentos correspondientes a las secuencias de interés con cebadores que flanqueaban las secuencias. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Fig 15) para comprobar que el tamaño de los fragmentos amplificados eran los correctos. En la figura 14 se observan los fragmentos amplificados mediante PCR de ADN del virus y se comprueba que las secuencias amplificadas tienen el tamaño esperado. El fragmento de NRG tiene aproximadamente 2600 pares de bases, el fragmento de EGFR\_L tiene unos 1000 pares de bases y el de EGFR\_P unos 1200 pares de bases.

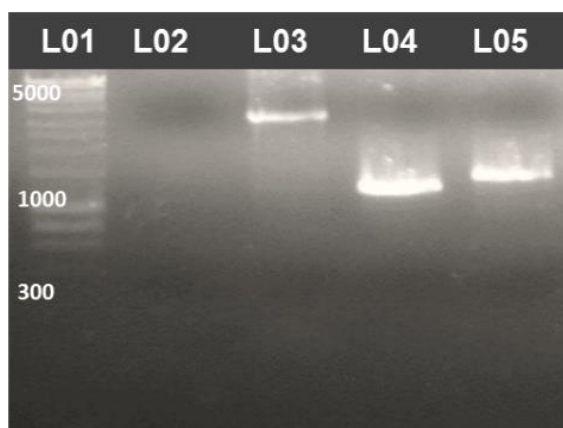


Figura 15. Producto de PCR resultante de la amplificación de ADN del virus. L1, marcador; L2, control negativo; L3, NRG (2600bp) ; L4, EGFR\_L (1000bp) , L5, EGFR\_P(1200bp).

Estos productos de PCR se secuenciaron para asegurar que no se habían producido modificaciones de la secuencia y se pudo comprobar que las 3 secuencias clonadas en

los baculovirus son idénticas a las originales y en la dirección correcta de lectura (Fig 16). Tampoco se observaron mutaciones derivadas del proceso de clonación.

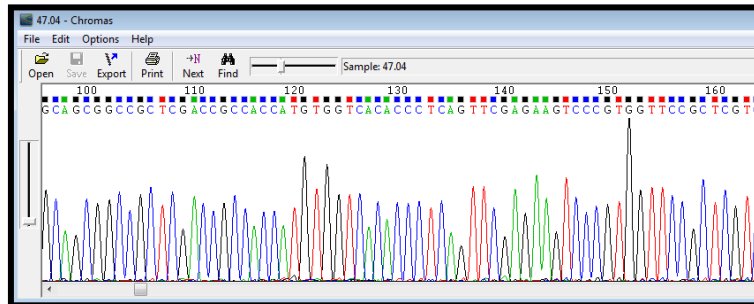


Figura 16. Captura de pantalla de un fragmento de secuenciación en el programa Chromas.

- *Obtención proteínas de interés*

Una vez realizados todos los controles de calidad de los virus de trabajo, se infectaron tanto células de SF21 como larvas para poder purificar los ligandos de direccionamiento. En la primera infección de células SF21 con los dos virus de trabajo se recogieron los pellets celulares y el sobrenadante con el medio de cultivo para ver si la proteína se secretaba al medio, ya que en las secuencias se le había incorporado la secuencia del péptido de la bombixina, un péptido de las polillas de seda *Bombyx mori* muy usado en los sistemas de expresión baculovírico.

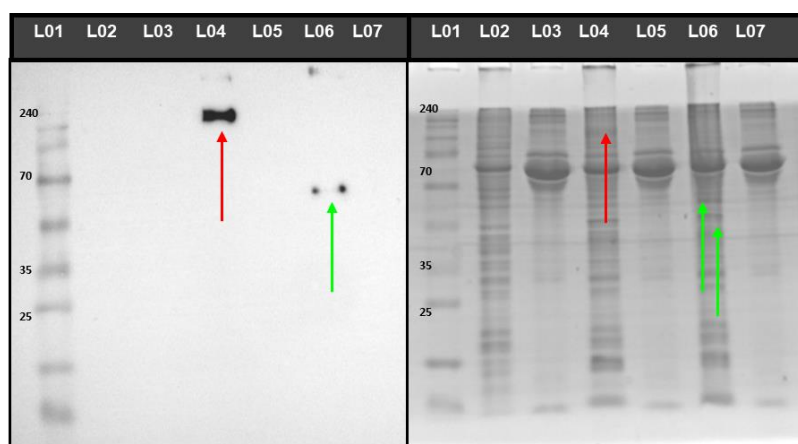


Figura 17. SDS-WesternBlot (izda.) y SDS-Coomassie (drcha.) de los extractos celulares y sobrenadantes recogidos tras la infección.: L1 marcador; L2 pellet células control; L3 sobrenadante células control; L4 pellet NRG; L5 sobrenadante NRG; L6 pellet EGFR; L7 sobrenadante EGFR. La Flecha roja indica la banda de rNRG y la flecha Verde indica las bandas de EGFR.

En este primer análisis se observó que, aunque se hubiera añadido un péptido de secreción, la bombixina, las proteínas de interés se encontraban en el pellet celular. Como se muestra en la figura 17 las flechas rojas y verdes de los carriles L4 y L6 corresponden con los pellets celulares de NRG (rojo) con un peso molecular de 92,15 kDa y anticuerpo frente a EGFR (verde) con un peso molecular de 36,31 kDa de la cadena ligera y 41,41 kDa de la cadena pesada. Aunque las proteínas de interés se estaban produciendo y tenían el tamaño esperado, no se secretaban al medio extracelular, lo que suponía que habría que purificar el extracto celular en vez del sobrenadante para purificar las proteínas de interés.

La bombixina tiene un peso molecular de 5kDa. En comparación con el peso total de las proteínas de interés, casi 100 kDa cada una, el péptido de secreción supone un porcentaje muy pequeño. Una explicación a que las proteínas no se secreten puede ser que la membrana plasmática solo pueda secretar péptidos pequeños, del tamaño de la bombixina.

Para solubilizar las proteínas del pellet celular se probaron varios buffers de solubilización que se describen en material y métodos. Los sobrenadantes y los pellets se analizaron mediante Dot Blot, una técnica que permite un análisis rápido y barato para comprobar si se conseguía solubilizar las proteínas de interés.

Como se puede observar en las imágenes de la figura 18, el buffer que mejor resultados ofrece; es decir, en el cual se observa que hay proteína en la fracción del sobrenadante (SB en la figura) en el Buffer Tris con CHAPS, siendo mejor el tratamiento con sonicación que sin ella. Este buffer solubiliza las dos proteínas, lo que ofrece una ventaja ya que solo hay que usar un mismo tipo de buffer y permitirá el uso de una sola columna de purificación.

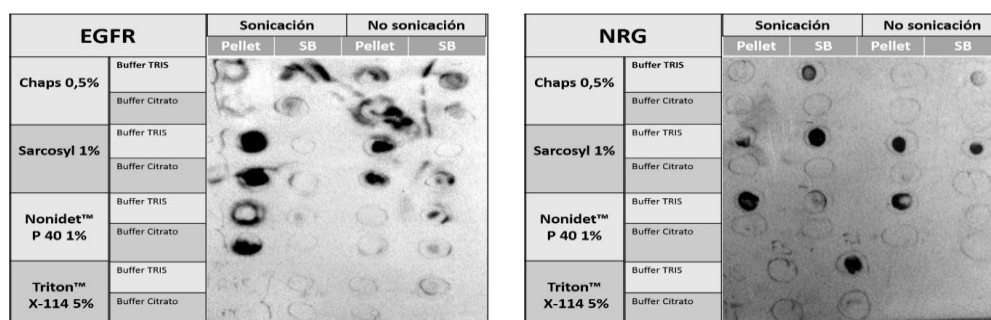


Figura 18. Imágenes de Dot Blot de las distintas fracciones del proceso de solubilización de pellets celulares.

Este mismo buffer se probó en larvas de *Triclopusia ni* infectadas con los baculovirus para la solubilización de las proteínas de interés, pero se vio que el porcentaje de solubilización era mucho más bajo que en pellets celulares. Se decidió optimizar la concentración de NaCl (de 150 mM a 500mM) para mejorar la lisis de los tejidos de la larva e incrementar así el porcentaje de solubilización de las proteínas de interés. Dado que se manejaba un volumen mayor de buffer, se aumentaron los ciclos de sonicación a 20 ciclos de 10 segundos con intervalos de 10 segundos entre ellos.

Para la purificación de los extractos de los pellets celulares se usó la columna de 1ml sefarosa con el tag Strep descrita en material y métodos ya que se manejaban pequeños volúmenes. Pero el rendimiento era demasiado bajo y había que concentrar la muestra con filtros de corte molecular para centrifugación. Los extractos de larvas aumentarían la cantidad de proteína de interés, pero también aumentaba los volúmenes de trabajo. Esto hacía imposible usar la columna de 1 ml, ya que provocaba que el atasco de la misma. Además, había que filtrar las muestras con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y posteriormente por uno de 0,22  $\mu\text{m}$ , lo que provocaba que se perdiera muestra en cada filtrado, además de la necesidad de usar varios filtros en cada proceso de purificación, lo cual encarecía notablemente cada proceso.

Finalmente se decidió usar un protocolo que consiste en mezclar directamente la resina de la columna con el extracto de larvas e incubar la mezcla para que las proteínas de interés se unan a la resina por el tag de purificación. Es más rápido y requiere de menos preparación de la muestra, lo que evita la posible degradación y/o pérdida de las proteínas de interés en el proceso de preparación de la muestra. Además, permite usar más cantidad de extracto, de manera que en un mismo proceso de purificación se pueden procesar hasta 100 larvas, para extraer una gran cantidad de proteínas.

Después del tratamiento de limpieza y concentración descrito en material y métodos, se consiguieron fracciones bastante limpias de cada uno de los ligandos. En la figura 19 se observan las fracciones de elución resultantes de la purificación y los sobrenadantes obtenidos en cada una de las centrifugaciones. Los sobrenadantes se analizaron para comprobar que el cambio de buffer y la eliminación de los detergentes no afectaban a la proteína, ya que podría precipitar o formarse agregados al eliminar el

detergente. El nivel de pureza de las eluciones de purificación es muy satisfactorio, y que además el proceso de concentración y cambio de buffer, en principio, no afecta a la estructura de las proteínas.

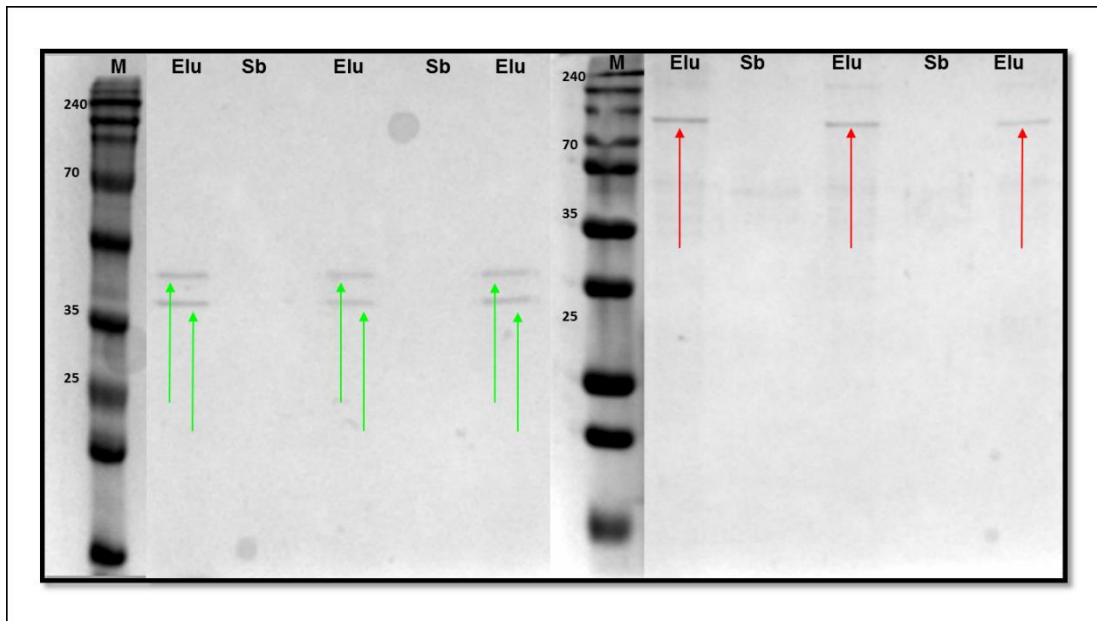


Figura 19. Imágenes de las eluciones de purificación después de concentrarlos con el Amicon. Las flechas verdes indican la fracción de anticuerpo rFab y las rojas el ligando Neuregulina.

Las proteínas de interés a partir de ahora pasaran a llamarse en el texto como ligandos de direccionamiento, rFab para el anticuerpo frente a EGFR y rNRG para el ligando Neuregulina.

## 2. Líneas celulares y ensayo de reconocimiento

- *Análisis de expresión de EGFR en diferentes líneas celulares*

Las líneas celulares que se han usado en este estudio han sido: A431, HDF y HepG2. A431 es una línea celular de carcinoma epidermoide humano. Esta línea es la mayoritariamente usada en estudios de enfoques terapéuticos dirigidos al receptor EGFR, ya que estas células poseen unos niveles desmesurados de expresión de este receptor. HDF es una línea celular derivada de la epidermis humana sana, por lo que su expresión del receptor EGFR es casi indetectable en comparación con A431<sup>92</sup>. HepG2 es una línea celular derivada de carcinoma hepatocelular (HCC) que normalmente es usada como modelo para evaluar la toxicidad de diferentes compuestos y medicamentos <sup>93</sup> y su nivel de expresión de EGFR también es ínfimo en comparación con A431, y, en nuestro caso, representa un buen modelo de línea tumoral con baja expresión de EGFR.

Los niveles de expresión de EGFR se analizaron por western blotting, tanto nativo (Fig 20A) como desnaturalizante (Fig 20B). Como era de esperar, los análisis mostraron que el EGFR está sobreexpresado en A431 en comparación con las otras líneas celulares; en las cuales la proteína del receptor es indetectable en HDF y en HepG2 solo se detecta en el Western nativo (Fig20A) y, aun así, en comparación con A431, el nivel de expresión es mínimo.

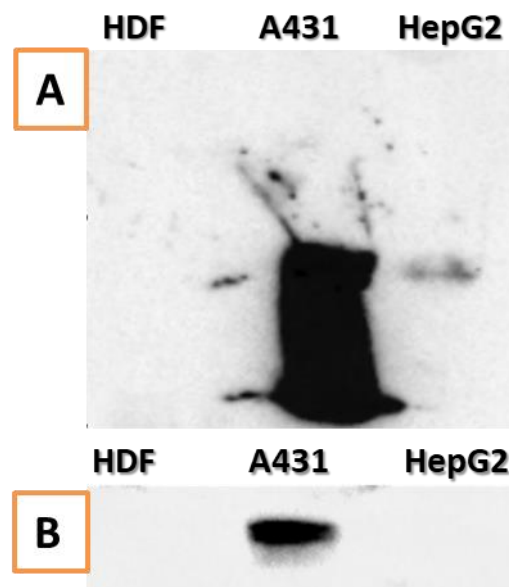


Figura 20. Niveles de expresión de EGFR en las diferentes líneas celulares Western Blotting Nativo (A), y desnaturalizante (B).

- *Internalización celular de los ligandos de direccionamiento*

Puesto que la línea A431 es la línea modelo de sobreexpresión de EGFR, el ensayo de reconocimiento ligando-receptor se realizó sobre esta línea. Las células se inocularon con 25 µg de rFab o rNRG y se incubaron durante varios tiempos en un intervalo desde 0 a 120 minutos. Los análisis de fluorescencia confocal muestran que tanto el rFab (Fig 21A) como el rNRG (Fig 21B) se unen al receptor rápidamente, a los 15 minutos de incubación ya se puede cuantificar la fluorescencia, lo que indica que los ligandos se están uniendo al receptor EGFR. Además, se observa que rNRG es capaz de translocarse al núcleo, alcanzando el máximo en esta ubicación a los 120 minutos de inoculación (Fig 21B). Esta rápida translocación puede ser, precisamente, la razón de la enorme eficacia de este ligando cuando está conjugado a los nanosistemas (como se verá más adelante).

La translocación nuclear de factores de crecimiento y sus ligandos está muy bien documentada. Varios estudios han demostrado que ligandos del receptor EGFR como las neuregulinas o el ligando EGF pueden translocarse al núcleo en otros tipos celulares; de hecho, se ha sugerido que la localización de neuregulinas en el núcleo puede tener un papel importante como factor de transcripción.<sup>1,94-97</sup> Además, la translocación al núcleo de los propios receptores celulares también tiene un papel importante en importantes implicaciones en terapias antitumorales, ya que la translocación nuclear de los ligandos y el receptor EGFR promueve la supervivencia celular, de manera que se asocia a una mayor resistencia a la quimioterapia, radiación y terapias dirigidas a esta familia de receptores<sup>3,98-103</sup>.

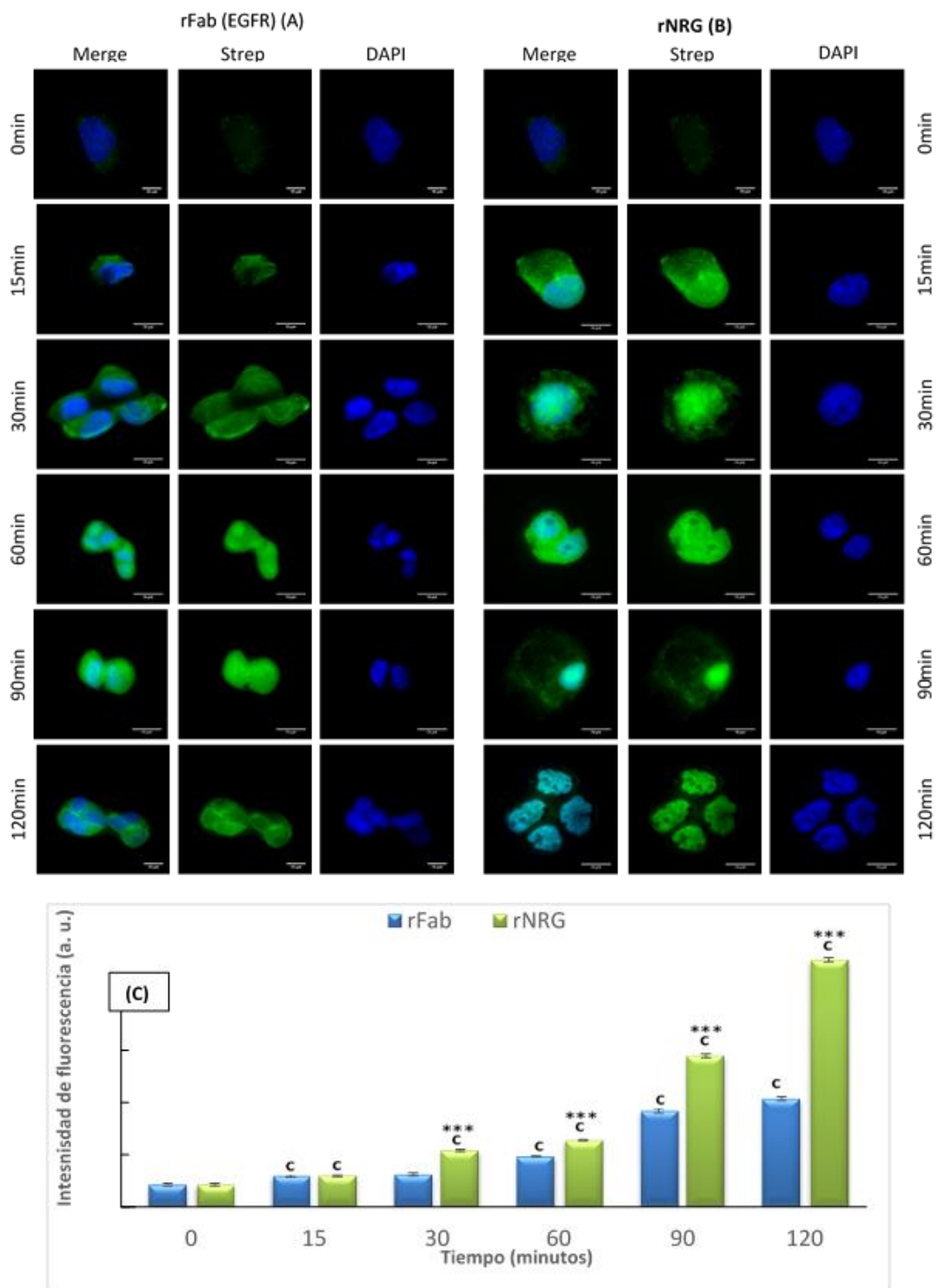


Figura 21. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de un cultivo de la línea A431 inoculado con 25  $\mu$ g de rFab (A) o rNRG (B) a diferentes tiempos. Cuantificación de la fluorescencia frente al tiempo (C) \*\*\* Se refiere a diferencias significativas entre rFab y rNRG. c Se refiere a diferencias significativas con respecto al punto de tiempo anterior con el mismo ligando. n=6; p=0.001.

### 3. Síntesis y caracterización de nanoconjugados

En la figura 22 se muestra la estrategia general de la síntesis de los nanoconjugados. El procedimiento comienza con la síntesis de nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y la posterior activación de su superficie para dotarlas de grupos OH que permitan su funcionalización (**MagOH**, Paso A). A continuación, se modifica la superficie de las mismas con ácido succínico y polietilenglicol (**Mag-PEG**, Paso B), para favorecer la carga de Camptotecina (**Mag-PEG[CPT]**, Paso C). Finalmente, se conjugan los ligandos de direccionamiento para constituir el nanovector (**Mag-PEG[CPT]-LD**, Paso D).

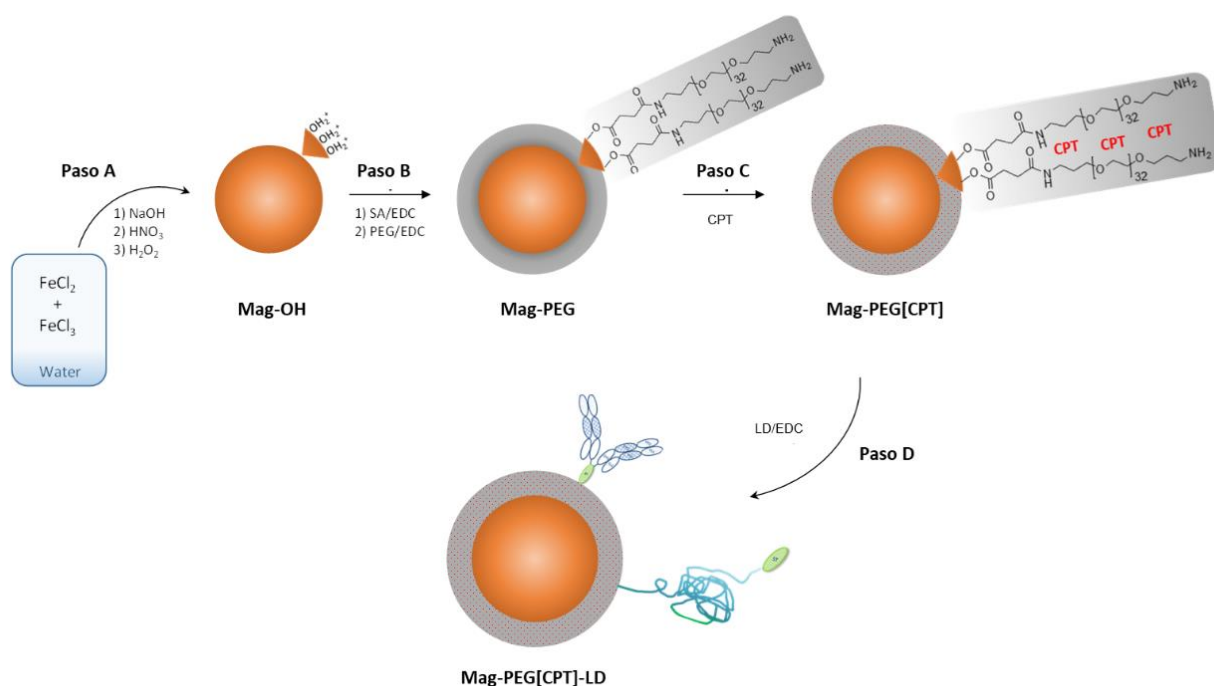


Figura 22. Representación esquemática de la síntesis de los nanoconjugados. Síntesis de nanopartículas de magnetita (Paso A), seguida de la modificación de la superficie con ácido succínico (SA) y polietilenglicol (PEG) mediante reacciones de acoplamiento mediadas por una carbodiimida (EDC) (Paso B), encapsulación de Camptotecina (Paso C) y conjugación de los ligandos de direccionamiento (LD; r-Nrg y/o rFab) (Paso D).

Las nanopartículas de óxido de hierro se sintetizaron por coprecipitación bajo condiciones alcalinas y se modificaron mediante un tratamiento post-síntesis, con el

objetivo de hidratar su superficie (Figura 22, paso A; MagOH)<sup>85</sup>. Las nanopartículas MagOH son pequeñas, de unos 7 nm de diámetro, esféricas y cristalinas. El patrón XRD de la muestra de MagOH (Fig. 23A) indica que se ha formado óxido de hierro Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetita) con simetría cúbica (grupo espacial 227, Fd-3m; JCPDS N°: 19-0629) y parámetro de red  $a = 0.84$  nm. Todos los máximos de difracción, correspondientes a los planos marcados en el difractograma, se pueden indexar a dicho sistema cúbico. El ensanchamiento de los picos es indicativo del pequeño tamaño del dominio que origina la difracción coherente<sup>69</sup>, lo que demuestra que se trata de una muestra nanocrystalina. Esta observación concuerda con los resultados obtenidos por microscopías electrónicas de transmisión y barrido (Fig. 23B, C y D); las pequeñas nanopartículas de magnetita se distribuyen como un fractal, formando grupos ramificados con un tamaño medio de partícula de aproximadamente 7 nm (Figura 23B). El recuadro de la Fig. 23B muestra una ampliación de una nanopartícula de magnetita donde se puede observar el espaciado interplanar (111) de la fase cúbica de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (líneas blancas marcadas en la micrografía).

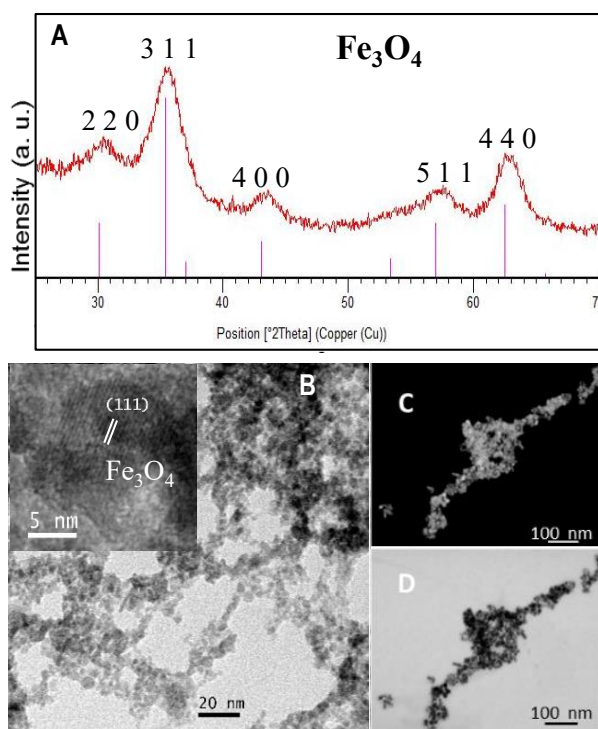


Figura 23. Difractograma de Rayos X (A); imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) imagen de alta resolución (Inserto) (B); imagen de microscopía electrónica de barrido (STEM) de campo oscuro (C) y de campo claro (D) de nanopartículas MagOH.

Las nanopartículas MagOH son extremadamente estables en medio acuoso, tal y como lo demuestra su potencial zeta. Mientras que la magnetita tiene un potencial zeta de  $-24 \pm 7$  mV, y no es estable en medio acuoso, MagOH presenta un potencial zeta de  $44 \pm 2$  mV. El signo positivo en el potencial zeta de MagOG es indicativo de la modificación superficial lograda tras la oxidación con peróxido (Fig 22, paso A).

Las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro son biocompatibles y no tóxicas <sup>58</sup> y están aprobadas por la FDA para su uso diagnóstico y terapéutico <sup>104</sup>). La pegilación, es decir, la unión a PEG de nanopartículas destinadas a un uso en aplicaciones biomédicas, es un método cada vez más empleado ya que PEG, además de ser un polímero biocompatible <sup>105 / 106</sup>, es capaz de camuflar las nanopartículas de las opsoninas, <sup>42/ 107</sup>, permite que los nanosistemas tengan una mayor estabilidad coloidal en medios acuosos <sup>108</sup>, incrementan la vida media en sangre de las nanosistemas cargados con fármacos <sup>58 109</sup>, previene las uniones no específicas a células y reduce el impacto negativo de la corona de proteínas <sup>110-114</sup>. En entornos ricos en proteínas, como puede ser el torrente sanguíneo, la formación de una corona de proteínas alrededor de las nanopartículas con ligandos de direccionamiento, disminuye drásticamente el reconocimiento ligando-receptor<sup>114</sup>.

Para llevar a cabo la funcionalización de la superficie de las nanopartículas MagOH (Figura 22, paso B), primero con ácido succínico y después con PEG, se realizaron dos reacciones de acoplamiento mediadas por carbodiimida (Fig 24). Se usó una carbodiimida soluble en agua (EDC) y, con la finalidad de aumentar la estabilidad en agua del carboxilato activado intermedio, la carbodiimida se usó en tándem con N-hidroxisuccinimida (NHS) <sup>115</sup>.

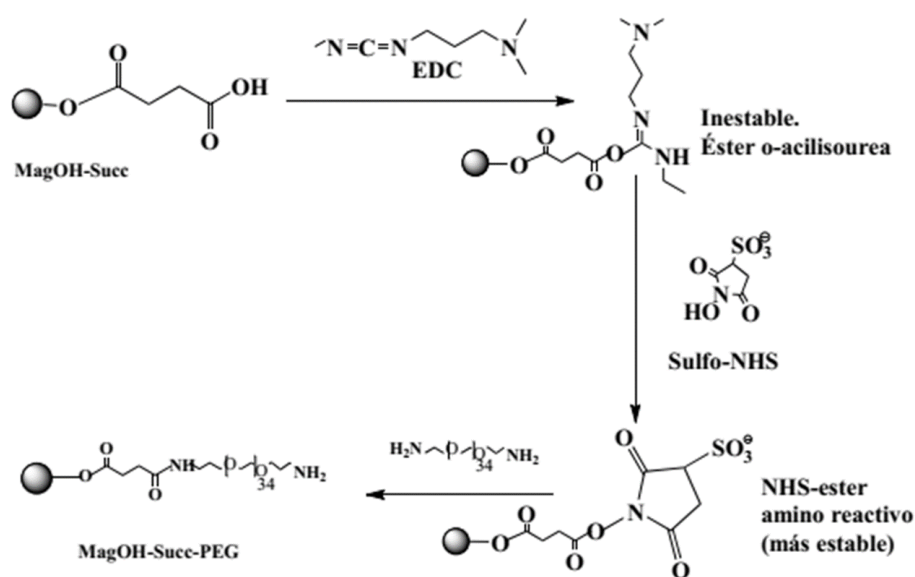


Figura 24. Formación de enlaces éster o amida por reacción de acoplamiento mediada por carbodiimidas con NHS como estabilizador.

Después de esta primera reacción de acoplamiento, la superficie de las nanopartículas queda dotada de grupos carboxilo en superficie. La presencia de estos grupos ácidos permite la posterior reacción de acoplamiento con PEG, mediante la formación de un enlace amida entre dichos grupos ácidos y los grupos amino terminales de las moléculas de PEG.

Además, PEG es soluble tanto en disolventes polares como apolares, debido a la naturaleza hidrofóbica de los grupos etilen-glicol <sup>45,116</sup>, por lo que es capaz de interactuar con compuestos hidrofóbicos, como la CPT <sup>106,116</sup>. Asimismo, en trabajos anteriores del grupo, se demostró que el PEG forma una capa alrededor de las nanopartículas capaz de incorporar, de forma estable, el agente quimioterapéutico Camptotecina, sin afectar a su estructura química ni su capacidad para inducir apoptosis en las células tumorales <sup>69</sup>.

La citotoxicidad celular de las nanopartículas pegiladas (Mag-PEG) antes de encapsular se estudió en cultivos celulares de A431, HDF y HepG2 a concentraciones de hasta 200  $\mu\text{g/ml}$  (Fig 25). Resulta destacable que ni las dosis más altas de nanopartículas resultan tóxicas para las células. Es más, las dosis más bajas inducen una repuesta de crecimiento celular en las 3 líneas celulares, siendo más pronunciada en la línea HDF (Fig 25).

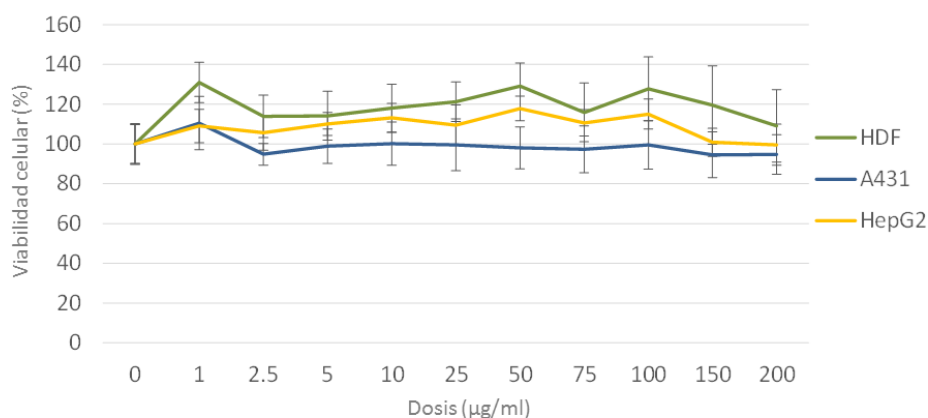


Figura 25. Citotoxicidad dependiente de dosis de las nanopartículas pegiladas (Mag-PEG) en las líneas celulares HDF, A431 y HepG2 tras 48 horas de incubación con diferentes dosis de nanopartículas.

El aumento de la viabilidad celular a dosis bajas puede deberse a que las células, cuando se las somete a un estrés ambiental, son capaces de desarrollar una respuesta de adaptación a esos cambios. Cuando este estrés es leve, por ejemplo, dosis bajas de fármacos o privación moderada de nutrientes, las células son capaces de desarrollar un

mecanismo de adaptación llamado Hormesis, que es un sistema para mantener la homeostasis celular, de forma que se desencadena el crecimiento celular y la supervivencia. Este mecanismo exhibe la dualidad en la respuesta de una célula u organismo para responder a un estímulo, ya sea endógeno o exógeno, que a bajas dosis puede ser beneficioso, pero a dosis altas puede ser tóxico e incluso fatal <sup>117</sup>. Este mecanismo está en el foco de los modelos que estiman teóricamente los umbrales de riesgo de cáncer <sup>118</sup>, la respuesta de los modelos celulares al envejecimiento <sup>119</sup> y, además, en estudios de nanotecnología <sup>120</sup>. Esto hace que sea necesario optimizar la respuesta hormética dependiente de la dosis en los tratamientos para poder obtener el mejor efecto con la dosis correcta <sup>117</sup>.

En este sentido, cabe destacar que nuestras nanopartículas pegiladas (Mag-PEG) no solo no son tóxicas a dosis altas, si no que a dosis bajas presentan una respuesta hormética induciendo el crecimiento y la viabilidad celular.

El compuesto quimioterapéutico que se ha seleccionado como modelo es el alcaloide natural Camptotecina. Su mecanismo de acción es diferente de otros agentes antineoplásicos, ya que, mientras que la mayoría inhibe la proliferación de las células cancerígenas mediante la unión al ADN o la topoisomerasa II, la Camptotecina inhibe la proliferación celular mediante la unión a la topoisomerasa I (TopI). Esta enzima se une al ADN y forma un complejo de escisión, el cual promueve la relajación del ADN superenrollado en procesos del metabolismo del ADN, como replicación, transcripción, recombinación y segregación cromosómica. La Topoisomerasa I logra la relajación del ADN haciendo un corte en una de las hebras de la doble hélice. La CPT actúa atrapando al complejo de escisión entre el ADN y la TopI, que impide que la hebra cortada por la enzima pueda unirse de nuevo <sup>121</sup>. Cuando esto ocurre durante la fase S de la mitosis, la rotura irreversible de la horquilla de replicación provoca la muerte celular<sup>122-124</sup>. A pesar de este interesante mecanismo de acción, su utilidad queda limitada debido su ínfima solubilidad en agua y su baja estabilidad química, lo que provoca la apertura del anillo de lactona (Fig 26) y, en consecuencia, la pérdida de la actividad citotóxica y la aparición de efectos secundarios hepáticos <sup>69</sup>.

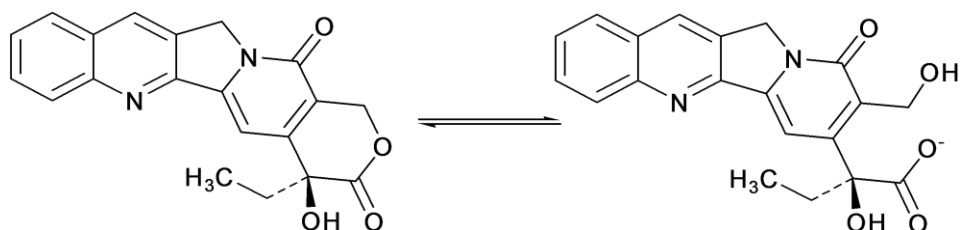


Figura 26. Forma activa de la CPT (izquierda) y forma inactiva (derecha) a través de la hidrólisis del anillo de lactona a pH fisiológico.

La encapsulación de la CPT en las nanopartículas Mag-PEG se realizó por incubación directa en una solución acuosa del compuesto con las nanopartículas para obtener Mag-PEG [CPT] (Fig 22, paso C). A partir de los espectros infrarrojos (Fig 27), se puede deducir que la CPT se ha incorporado a la nanopartícula: Las bandas características de la CPT se muestran sin ningún cambio en el espectro de Mag-PEG[CPT], por ejemplo, el grupo carbonilo del anillo de lactona permanece a  $1739\text{ cm}^{-1}$  indicando que dicho anillo no se ha abierto durante el procedimiento de encapsulación. Además, la banda característica del PEG alrededor de  $1098\text{ cm}^{-1}$  debido a la extensión del enlace C-O-C está también presente en la formulación Mag-PEG [CPT]; así como de la banda a  $530\text{ cm}^{-1}$  del núcleo  $\delta\text{Fe-O}$ .

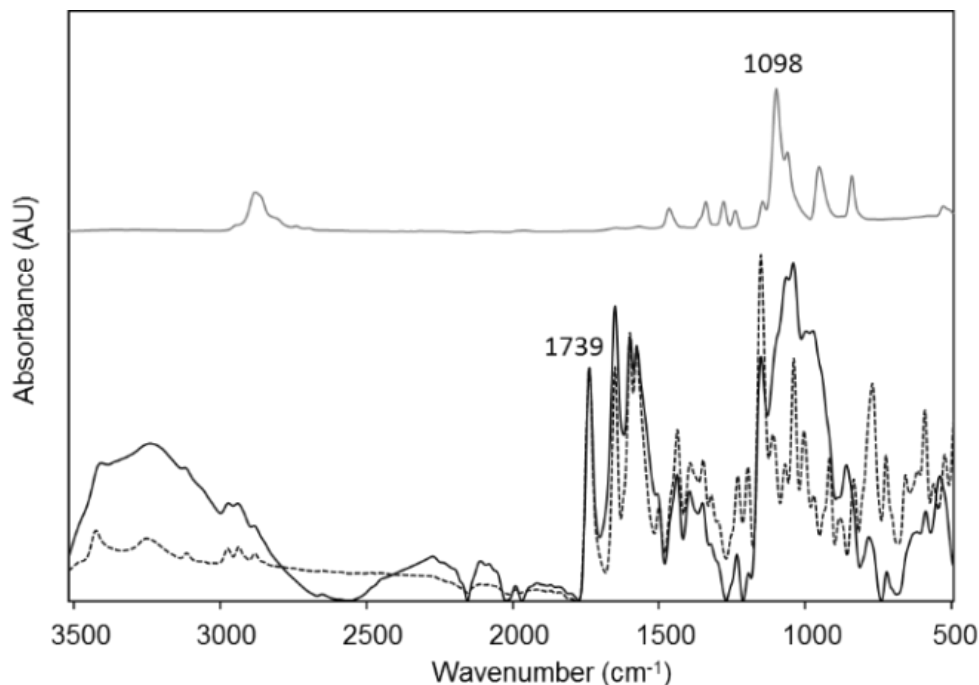


Figura 27. Espectros de infrarrojos (FTIR) de PEG (arriba) y de Mag-PEG[CPT] (abajo, línea sólida) y de CPT (línea puntuada). El espectro ha sido normalizado con respecto a la señal a  $1739\text{ cm}^{-1}$ .

La eficiencia de encapsulación (Loading efficiency, LE) y la capacidad de carga (Loading capacity, LC) de las nanopartículas se calcularon de acuerdo con las ecuaciones 1 y 2 respectivamente.

$$LE(\%) = \frac{\text{Peso máximo CTP encapsulado}}{\text{Peso de CPT Total}} \times 100 \quad (1)$$

$$LC(\%) = \frac{\text{Peso máximo CPT encapsulado}}{\text{Peso total Nanopartícula}} \times 100 \quad (2)$$

En comparación con otras nanopartículas de la bibliografía (Tabla 3), Mag-PEG[CPT] poseen mayor capacidad de carga y eficiencia de encapsulación. Por lo que sabemos, no hay descritas en la literatura nanopartículas magnéticas funcionalizadas con PEG que consigan unos valores tan elevados de LC y LE. Las eficiencias de encapsulación elevadas mejoran los valores de coste-efectividad en el procedimiento, además de conllevar una reducción en las dosis de nanopartículas que han de ser administradas, reduciendo así los efectos secundarios.

Tabla 3. Eficiencia de encapsulación (LE) y capacidad de carga (LC) de las nanopartículas Mag-PEG[CPT] en comparación con otras nanopartículas magnéticas descritas

Referencias	LC (%)	LE (%)
Este trabajo	40.52 ± 0.04	80 ± 7
Qu et al. (2013) <sup>104</sup>	11.8 ± 0.3	59.0 ± 1.5
Castillo et al. (2014) <sup>69</sup>	26.11 ± 0.02	-

Estas características convierten a estos nanosistemas en una buena alternativa para la administración de medicamentos como la Camptotecina, cuyo uso está bastante limitado, dado su alta inestabilidad química y su limitada solubilidad como se mencionó anteriormente.

En cuanto a la liberación de la CPT en función del tiempo, se ajustó a una ley de potencia y presenta un coeficiente de correlación de  $R^2$  de 0.994 en la representación de los datos. (3)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (3)$$

Donde  $M_t/M_\infty$  es la fracción liberada,  $t$  es el tiempo en horas y  $K$  y  $n$  son los parámetros de ajuste. El exponente  $n$  obtenido en este ajuste (0.31) está cerca de la raíz cúbica, un valor más cercano a cinética de orden cero que a la cinética de primer orden 1, como podría esperarse de PEG<sup>125</sup>. Indica una difusión no Fickiana, y además, un exponente tan bajo revela que la liberación es bastante uniforme, una propiedad deseable para los sistemas de administración. La vida media del compuesto liberado es de 25 minutos, un tiempo apropiado para proporcionar una descarga del fármaco (Fig 28).

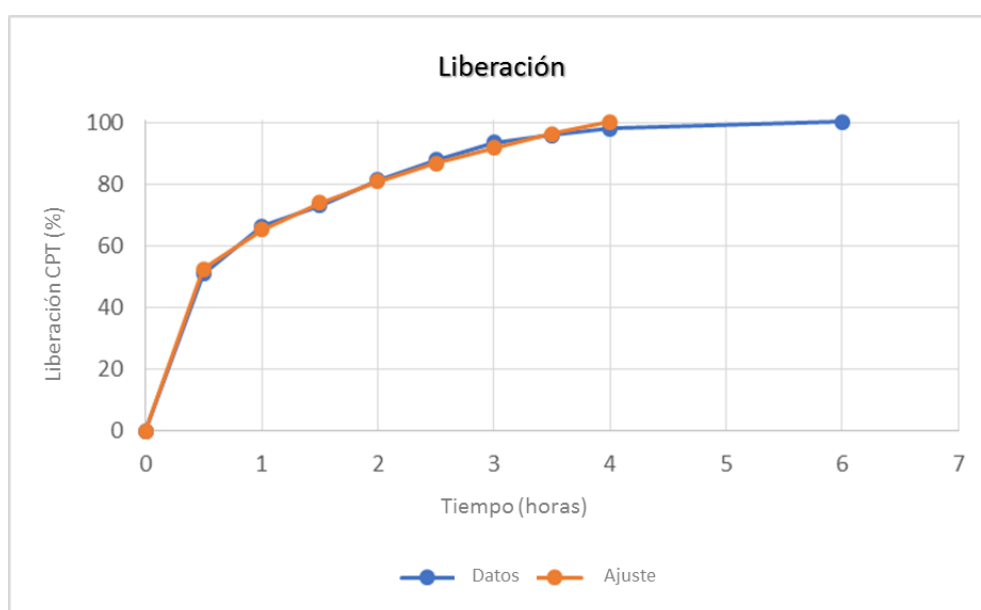


Figura 28. Perfil de liberación *In vitro* de Mag-PEG[CPT] en PBS (pH 7.5) a 37°C (línea azul). Datos representados como media  $\pm$  SD ( $n=3$ ) Los errores son más pequeños que el punto de la gráfica. Los datos de ajuste (línea naranja) obedecen a la ley de potencia descrita en la ecuación. 3.

Para evitar pérdidas de CPT por parte de los nanoconjugados durante la funcionalización con los ligandos de direccionamiento, la superficie se recubrió con Albúmina de suero bovino (BSA). El último paso de la formación de los nanoconjugados es su funcionalización con los ligandos de direccionamiento. (Fig22, Paso D). rNrg y rFab se unieron covalentemente a Mag-PEG[CPT] mediante reacciones de acoplamiento mediado por carbodiimida, entre en el grupo amino terminal del PEG y el grupo carboxilo del ligando (rNrg y rFab). Se obtuvieron 3 tipos de

formulaciones: dos con un solo tipo de ligando, Mag-PEG[CPT]-rNrg y Mag-PEG[CPT]-rFab, y otra con la combinación de los dos ligandos, Mag-PEG[CPT]-rNrg/rFab.

## 4. Efectividad de nanoconjugados

- *Citotoxicidad Celular*

El comportamiento de los nanoconjugados se evaluó en las células A431 (Fig29), HDF (Fig30) y HepG2 (Fig31). Las líneas A431 y HDF se tomaron como modelo tumoral y sano de células de piel respectivamente. A431 es una línea de carcinoma epidermoide muy usada como modelo de estudio de EGFR debido a su alta expresión de este receptor. Los niveles de expresión de HDF, al ser una línea derivada de la epidermis de pacientes sanos, son mucho más bajos, casi indetectables en comparación con A431. La línea hepG2 se eligió porque es muy usada como modelo de toxicidad para evaluar los posibles efectos secundarios y los daños hepáticos que pueden causar las nuevas formulaciones como se mencionó anteriormente. El rango de concentraciones de CPT que se han testado está muy por debajo de los niveles de toxicidad de la nanopartícula sola

Cuando se comparan la citotoxicidad de las 3 formulaciones de los nanoconjugados, Mag-PEG[CPT]-rNrg , Mag-PEG[CPT]-rFab y Mag-PEG[CPT]-rNrg/rFab, la presencia del ligando rNRG es decisiva. En incubaciones a 24 horas se observa una clara diferencia entre las formulaciones con NRG, incluso en las dosis más bajas y la viabilidad celular es siempre más baja en los nanoconjugados con rNRG en comparación con la formulación que solo contiene rFab. En incubaciones más largas (48H) y en dosis muy bajas de Mag-PEG[CPT]-rNrg, después del periodo inicial en el que hay una disminución de la viabilidad celular del 15%, las células se recuperan y además la rNRG estimula su crecimiento, debido al efecto conocido de proliferación celular de los factores de crecimiento como son las neuregulinas. Sin embargo, en combinación con rFab, la viabilidad celular continúa disminuyendo de las 24 a las 48H.

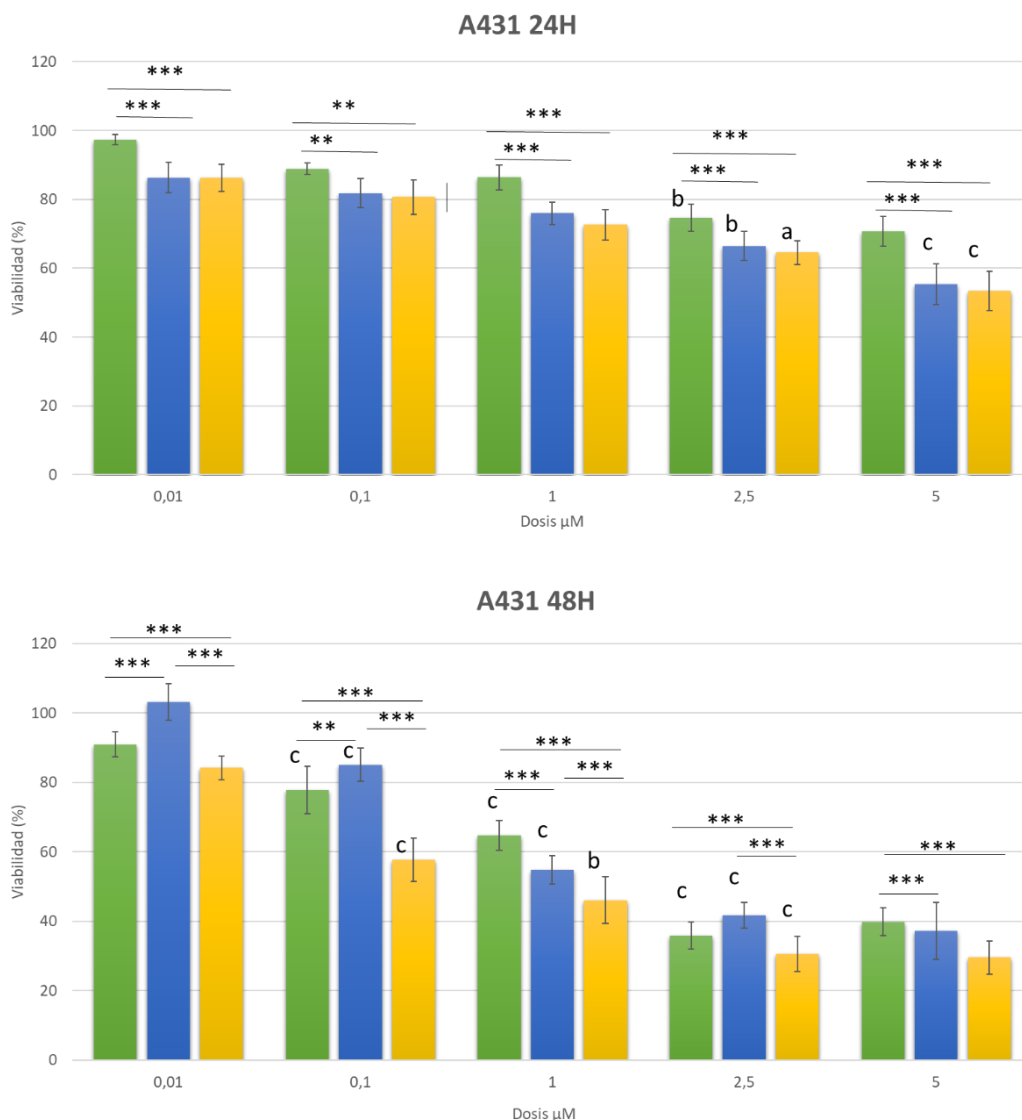


Figura 29. Ensayo de toxicidad dependiente de dosis de Mag-PEG[CPT]-rFab (verde), Mag-PEG[CPT]-rNrg (azul) and Mag-PEG[CPT]-rNrg/rFab (amarillo) en la línea A431 incubadas durante 24 y 48 horas. La dosis se refiere a la concentración de CPT en el nanoconjugado. n=6; p=0.001 (\*\*\*) ; p=0.01 (\*\*).

En las otras dos líneas celulares, HDF (Fig. 30) y HepG2 (Fig. 31) no se llega a menos del 50% de reducción de la viabilidad a las 48 horas. Lo que demuestra que los nanoconjugados son capaces de reconocer el receptor y están entrando a través del mismo y no por mecanismos inespecíficos

En la línea HDF, durante las primeras 24 horas de tratamiento no se aprecian diferencias en la reducción de la viabilidad por distintas dosis, exceptuando alguna dosis, lo que corrobora que los nanosistemas están entrando mediados por receptor y al tener los fibroblastos un nivel de expresión de EGFR normal, la viabilidad no se reduce drásticamente a medida que se aumentan las dosis de CPT. A las 48 horas se observa un discreto descenso en la reducción de la viabilidad en las dosis más altas. Pero en las dosis más bajas, los nanoconjugados solo con rNRG (Fig 29, barras azules) parece que estimulan el crecimiento celular. Esto se explica porque la Neuregulina estimula el crecimiento.

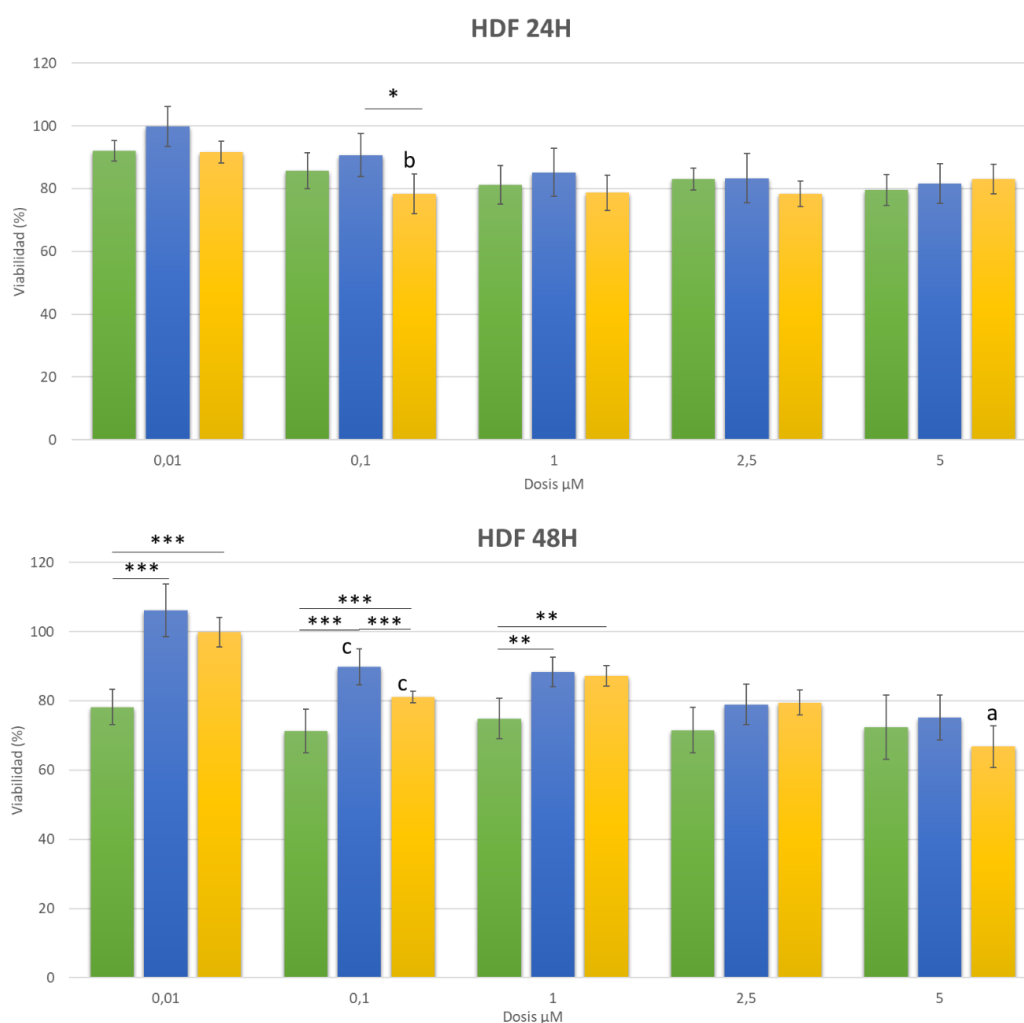


Figura 30. Ensayo de toxicidad dependiente de dosis de Mag-PEG[CPT]-rFab (verde), Mag-PEG[CPT]-rNrg (azul) and Mag-PEG[CPT]-rNrg/rFab (amarillo) en la línea HDF incubadas durante 24 y 48 horas. La dosis se refiere a la concentración de CPT en el nanoconjugado. n=6; p=0.001 (\*\*\*) ; p=0.01 (\*\*).

La línea HepG2 se comporta de manera muy parecida a los fibroblastos, algo esperable ya que presentan un nivel comparable de expresión de EGFR. Los nanoconjugados con rNRG también parecen estimular el crecimiento celular, contrarrestando el efecto de la CPT (Fig 31); además este efecto se observa a las 24 horas de tratamiento, antes que en HDF (Fig 30, 48H). Esto puede explicarse porque las células HepG2, al ser tumorales, tienen un metabolismo más elevado que las células sanas como son los fibroblastos.

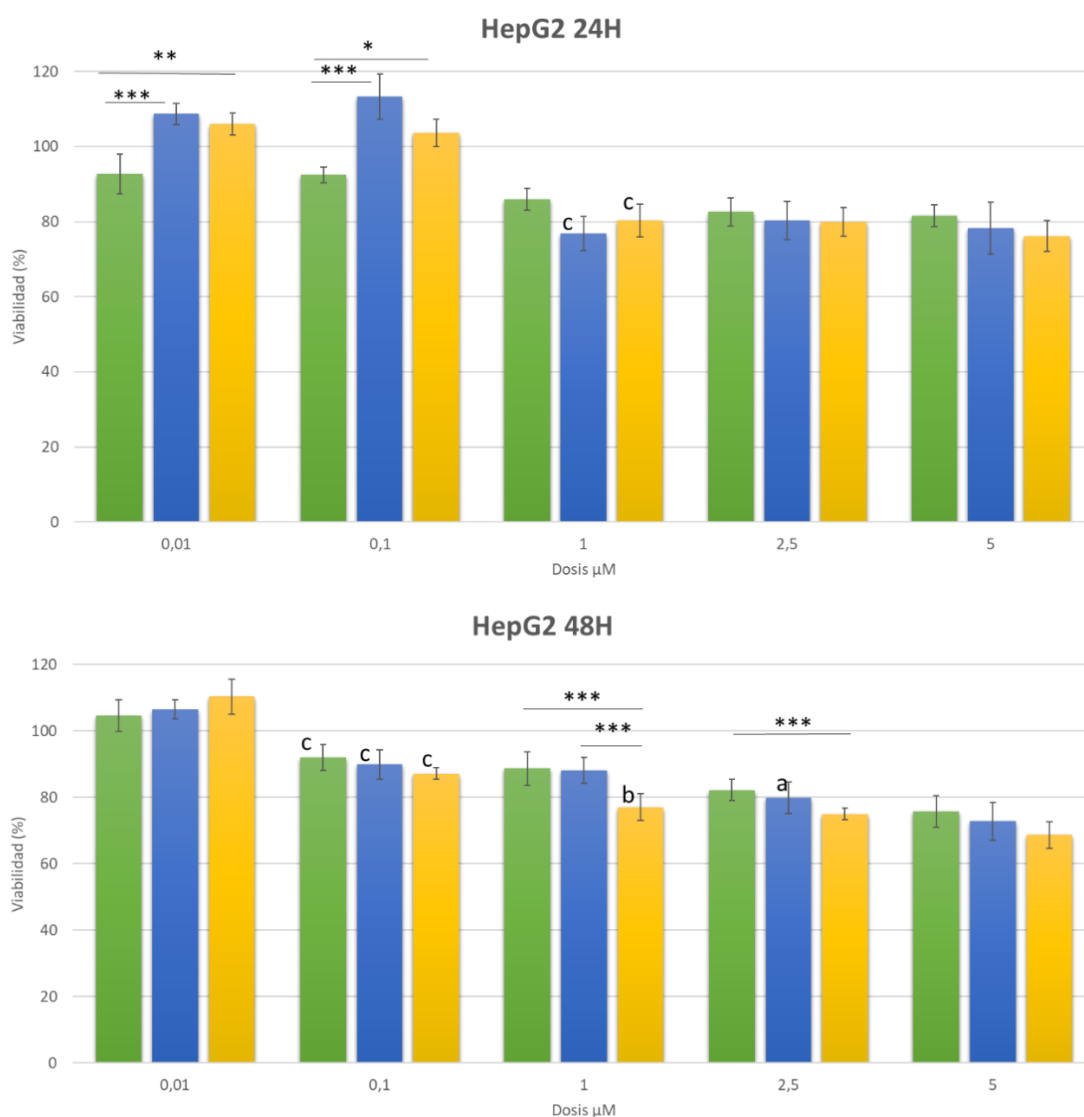


Figura 31. Ensayo de toxicidad dependiente de dosis de Mag-PEG[CPT]-rFab (verde), Mag-PEG[CPT]-rNrg (azul) and Mag-PEG[CPT]-rNrg/rFab (amarillo) en la línea HepG2 incubadas durante 24 y 48 horas. La dosis se refiere a la concentración de CPT en el nanoconjugado. n=6; p=0.001 (\*\*\*) ; p=0.01 (\*\*).

A las 48 horas la viabilidad celular por debajo del 50% se observa solo en la línea A431, por lo que se calcula la dosis letal 50 (LD50). En las otras dos líneas celulares no se ha podido calcular ya que no se ha alcanzado una viabilidad menor del 50% a las 48 horas de tratamiento. Los resultados se muestran en la tabla 4. La formulación con rNRG solo tiene una LD50 menor que la formulación con rFab solo. Pero la combinación de los dos ligandos conlleva una dramática reducción de la LD50. Este efecto de sinergia es probablemente debido a que las células de A431 expresan EGFR, HER2, and HER3 <sup>126</sup>. El rFab va dirigido directamente a EGFR, mientras que rNRG se une a HER3 and HER4, de esta manera se cubren todos los tipos de receptores de la familia EGF. Otro aspecto importante es que la CPT necesita llegar al núcleo para actuar, y rNRG ha demostrado ser un vector eficiente para llegar al núcleo (Fig. 20).

Tabla 4. Calculo de la Dosis Letal 50 de las diferentes formulaciones expresadas como concentración de CPT ( $\mu\text{M}$ ) en la línea celular A431.

Línea celular	Nanoformulación	LD50
A431	Mag-PEG[CPT]-rFab	1.43±0.26
	Mag-PEG[CPT]-rNrg	1.04±0.11
	Mag-PEG[CPT]-rFab/rNrg	0.31±0.03

- *Internalización celular*

Una vez que los receptores EGFR son activados por alguno de sus ligandos y han transmitido la señal, para evitar la estimulación continuada de dichas señales, existen diversos mecanismos para inactivar el receptor. Uno de estos mecanismos de regulación del receptor es la internalización del complejo ligando-receptor y su degradación proteolítica. Este complejo se endocita en vesículas recubiertas de clatrina hacia los endosomas primarios <sup>127</sup>. El destino de estos endosomas depende del tipo de ligando que estimule los receptores EGFR. La mayoría de los receptores estimulados por los ligandos tipo EGF son degradados por los lisosomas. La neuregulina, sin embargo, al

unirse al receptor, provoca una entrada lenta por endocitosis seguido por el reciclaje del receptor hacia la membrana plasmática <sup>128</sup>. Para poder comprobar si los nanosistemas estaban entrando en la célula por un mecanismo mediado por receptor se llevó a cabo un experimento con la sonda LysoTracker, una sonda fluorescente altamente selectiva para orgánulos ácidos como lisosomas o endosomas. Se realizó un estudio de colocalización de fluorescencia de los nanosistemas en vesículas ácidas para comprobar que la entrada de los mismos era a través de endosomas. Para ello, se cuantificaron los puntos discretos donde se solapaban la fluorescencia verde, correspondiente a los nanosistemas de direccionamiento, y los puntos rojos, que corresponden a las vesículas ácidas como lisosomas o endosomas. Este estudio no solo confirma la entrada de los nanosistemas a la célula mediante endosomas (Fig 32-33-34) sino que pone de manifiesto que esta depende de los niveles de expresión del receptor EGFR, ya que la línea A431 (Fig 33) presenta más puntos de colocalización que las líneas HDF (Fig32) y que HepG2 (Fig 34). Asimismo, la cuantificación de la colocalización de la fluorescencia (Fig 35) concuerda con los resultados de citotoxicidad, y confirma que la internalización celular es más eficaz en los nanosistemas con el ligando rNRG que con el fragmento de anticuerpo rFab; pero cuando se trata de los dos ligandos en combinación, la cantidad de nanoconjugados en las vesículas de endocitosis es remarcablemente elevada en comparación con los otros.

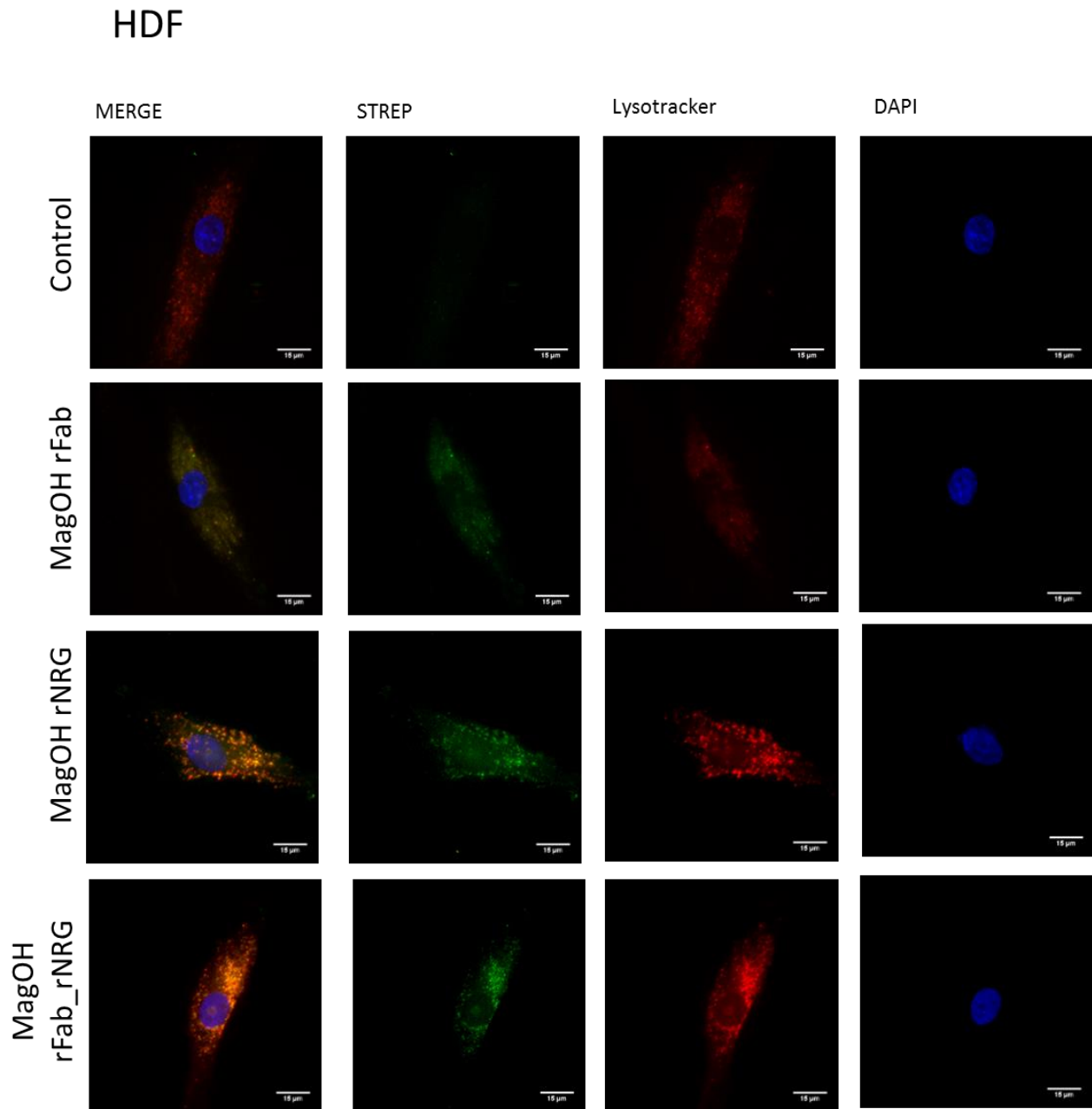


Figura 32. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de la entrada de los nanosistemas de direccionamiento en la línea celular HDF. Se incubaron las células 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de los nanosistemas durante 6 horas y se tiñeron con Lysotracker (marcador endosomas y lisosomas) y el anticuerpo Anti-Strep para los ligandos de direccionamiento.

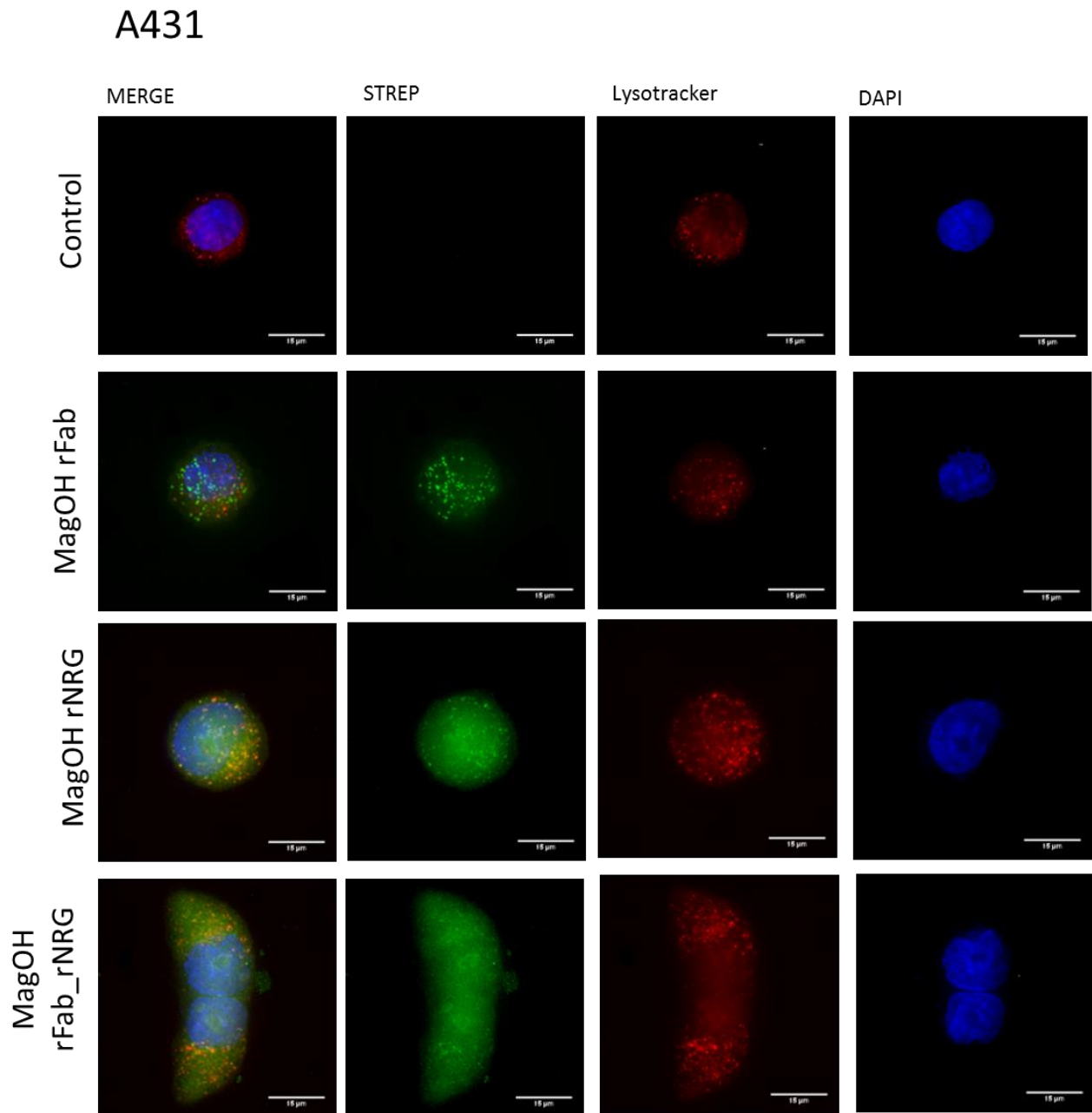


Figura 33. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de la entrada de los nanosistemas de direccionamiento en la línea celular A431. Se incubaron las células 100  $\mu\text{g/ml}$  de los nanosistemas durante 6 horas y se tiñeron con Lysotracker (marcador endosomas y lisosomas) y el anticuerpo Anti-Strep para los ligandos de direccionamiento.

## HepG2

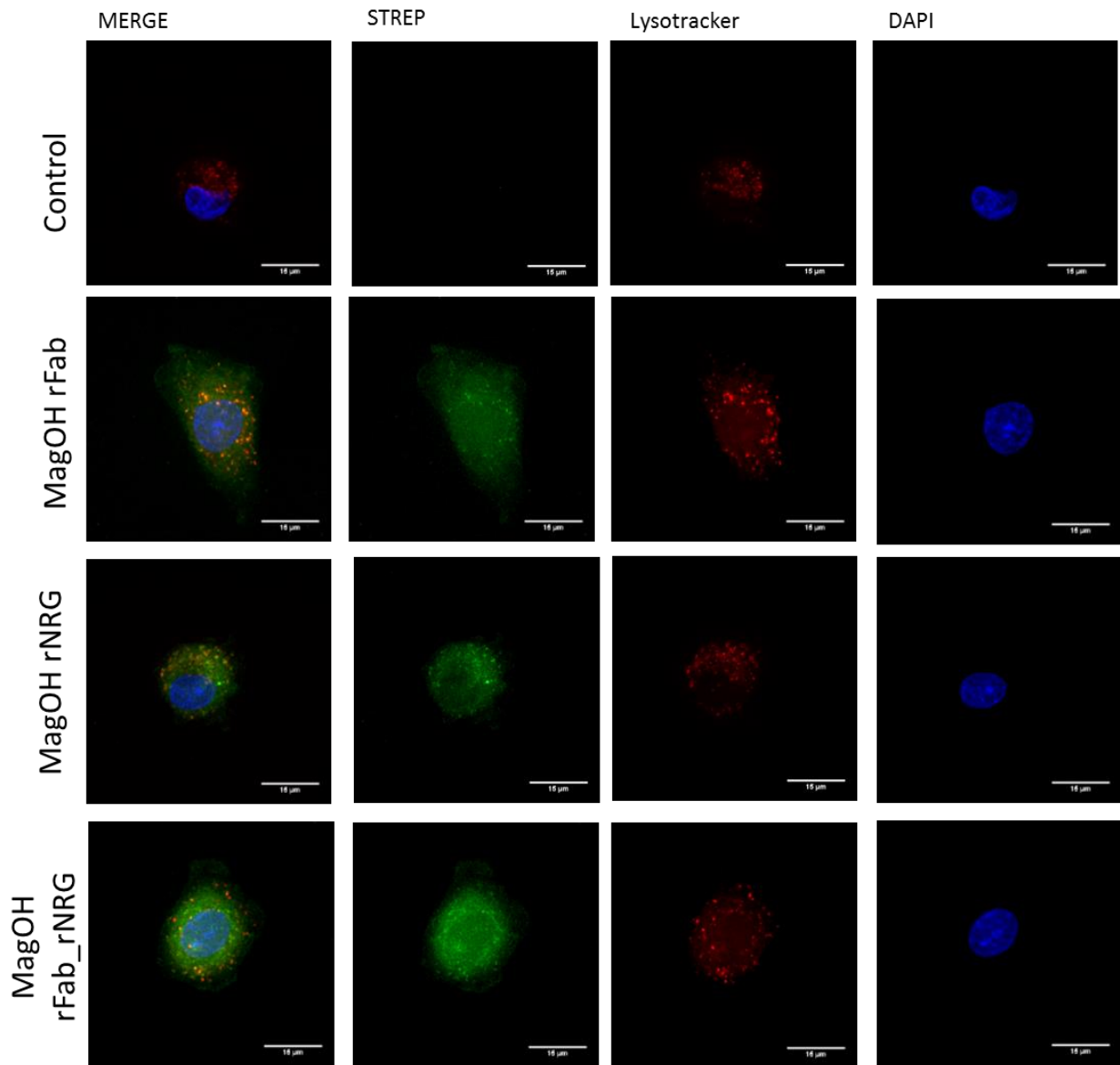


Figura 34. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de la entrada de los nanosistemas de direccionamiento en la línea celular HepG2. Se incubaron las células 100  $\mu\text{g/ml}$  de los nanosistemas durante 6 horas y se tiñeron con Lysotracker (marcador endosomas y lisosomas) y el anticuerpo Anti-Strep para los ligandos de direccionamiento.

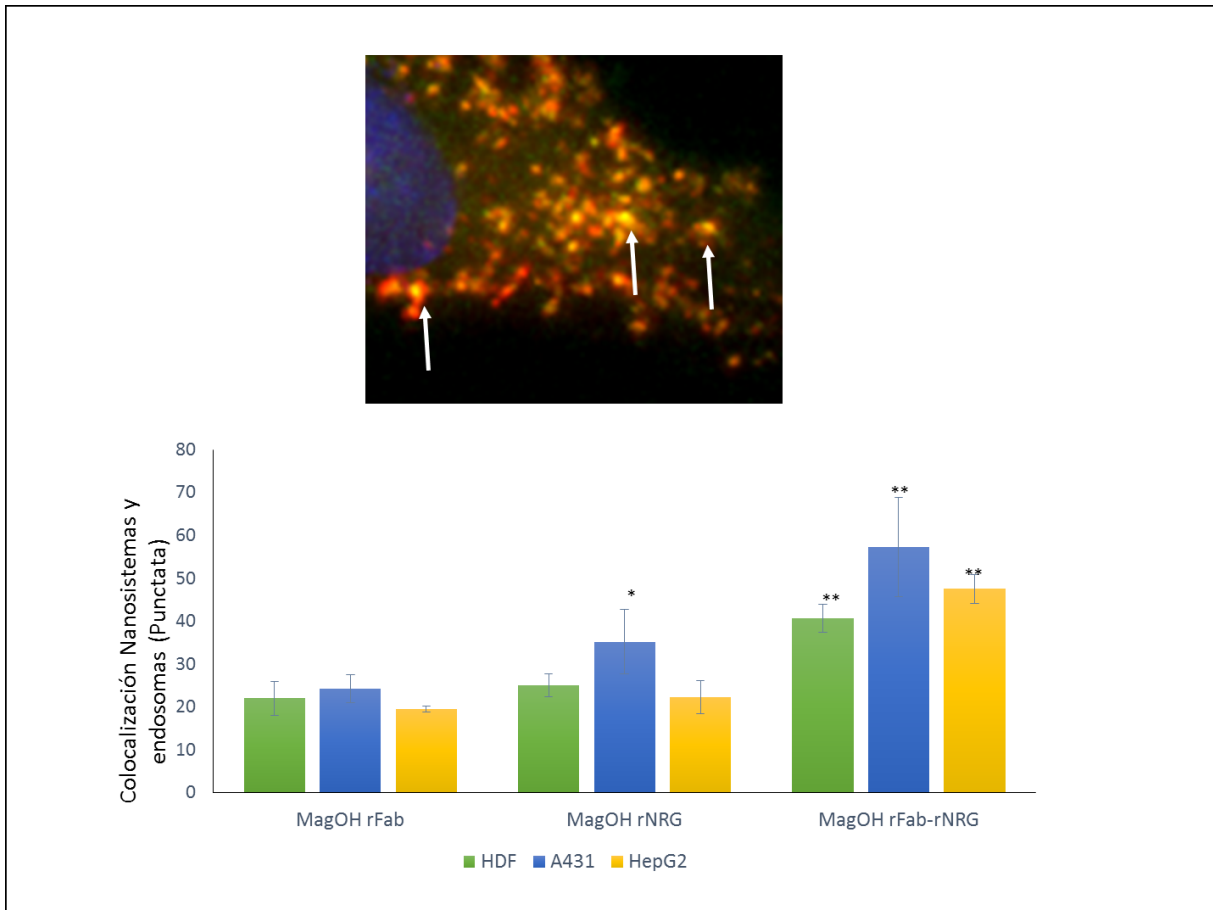


Figura 35. Para la determinación de la entrada de los nanosistemas se cuantificaron los puntos de colocalización en las imágenes de microscopía de fluorescencia entre los ligandos (verdes) y los endosomas (rojos) de las células y se analizaron las diferencias entre los tres tipos de nanosistemas por línea celular. El análisis estadístico se realizó comparando los nanosistemas entre sí. n=6; p=0.05 (\*); p=0.01 (\*\*).

- *Apoptosis*

La muerte celular se puede producir por dos mecanismos: la apoptosis o la necrosis. La apoptosis, o muerte celular programada, es un mecanismo fisiológico muy conservado evolutivamente que depende de una cascada proteolítica mediada por caspasa, que conduce a la muerte celular programada a través de una serie de cambios celulares tales como fragmentación del núcleo, liberación del citocromo c o aumento del calcio intracelular <sup>129</sup>. La apoptosis se produce en la mayoría de los organismos multicelulares para mantener la remodelación de tejidos durante el desarrollo, la homeostasis de los tejidos, la eliminación de células senescentes y de células con daño genético severo <sup>130</sup>.

En la apoptosis, la membrana plasmática y las proteínas asociadas están protegidas de la acción de caspasas gracias a la red de microtúbulos apoptóticos (RMA o AMN de sus siglas en inglés *Apoptotic Microtubule Network*) <sup>131</sup>, de manera que todos los procesos de degradación están aislados del espacio extracelular por la membrana plasmática que se mantiene impermeable.

Muchos fármacos antineoplásicos tales como la CPT, elimina las células tumorales mediante la inducción de la apoptosis. Se cree que este mecanismo de muerte celular es fisiológicamente ventajoso ya que las células apoptóticas se eliminan por fagocitosis antes de que pierdan la permeabilidad de la membrana plasmática, impidiendo así la liberación de contenido celular al espacio intermembrana y la consecuente respuesta inflamatoria <sup>132</sup>. Finalmente, las células apoptóticas son fagocitadas por los macrófagos, que los reconocen a través de una serie de moléculas y receptores de puente, tales como fosfatidil serina, que aparece en la cara externa de su membrana externa. En cambio, la necrosis viene acompañada por la ruptura de integridad de la membrana plasmática por lo que todos los compuestos intracelulares se liberan al espacio intercelular, de manera que se induce la inflamación produciendo efectos tóxicos en las células adyacentes <sup>130,132</sup>.

Se quiso comprobar si el mecanismo por el que se estaba induciendo la muerte de las células era mediante apoptosis debido a la acción de la CPT o si las células estaban muriendo por otro mecanismo.

Para ellos se observó si había inicio temprano de apoptosis, donde se da la activación de caspasas, que conllevan la translocación de la fosfatidil serina (PS) hacia el exterior de la membrana plasmática, la cual sigue intacta. El yoduro de propidio es un colorante que no es capaz de atravesar la membrana plasmática. En las etapas finales de la apoptosis, así como en la necrosis, la integridad de la membrana se pierde, por lo que el yoduro de propidio (PI) es capaz de pasar y teñir el núcleo. Este experimento permite diferenciar entre células con apoptosis temprana, apoptosis tardía o necrosis.

Se realizó una citometría de flujo y las células se tiñieron con los compuestos Annexina V y yoduro de propidio para ver la translocación de la fosfatidil serina (PS) hacia el exterior de la membrana plasmática y diferenciar entre células apoptóticas y necróticas. Las necróticas serán aquellas células que estén marcadas con yoduro de propidio, debido a la rotura de la membrana plasmática pero que no exponen la PS. Como se muestra en la figura 36, todas las líneas celulares presentan niveles de apoptosis, aunque estos niveles en la línea A431 son significativamente mayores que los de las otras líneas celulares.

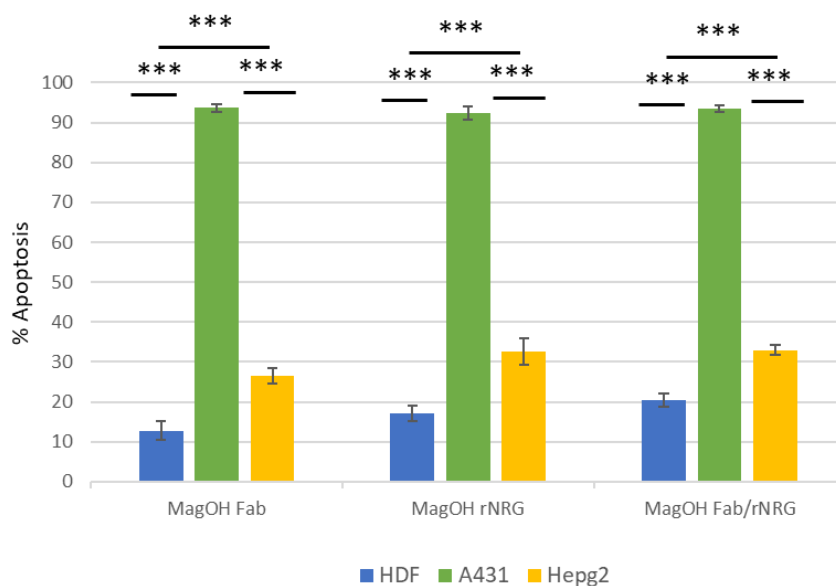


Figura 36: Niveles de apoptosis detectados por citometría de flujo con los marcadores Annexina V y yoduro de propidio. Los datos que se muestran son los que corresponden a la población celular marcada con Annexina (Ann +) pero no con yoduro de propidio (PI -) del total de la muestra analizada.  $n \geq 10.000$ .

Otra señal de que se está llevando a cabo la apoptosis es la fragmentación de los núcleos que se puede observar mediante microscopía de fluorescencia. Después de 24 horas de tratamiento con los nanosistemas, se observan núcleos condensados y fragmentados, se pueden distinguir porque tienen mucha más intensidad de fluorescencia que los núcleos normales y además aparecen fragmentados (Fig. 37).

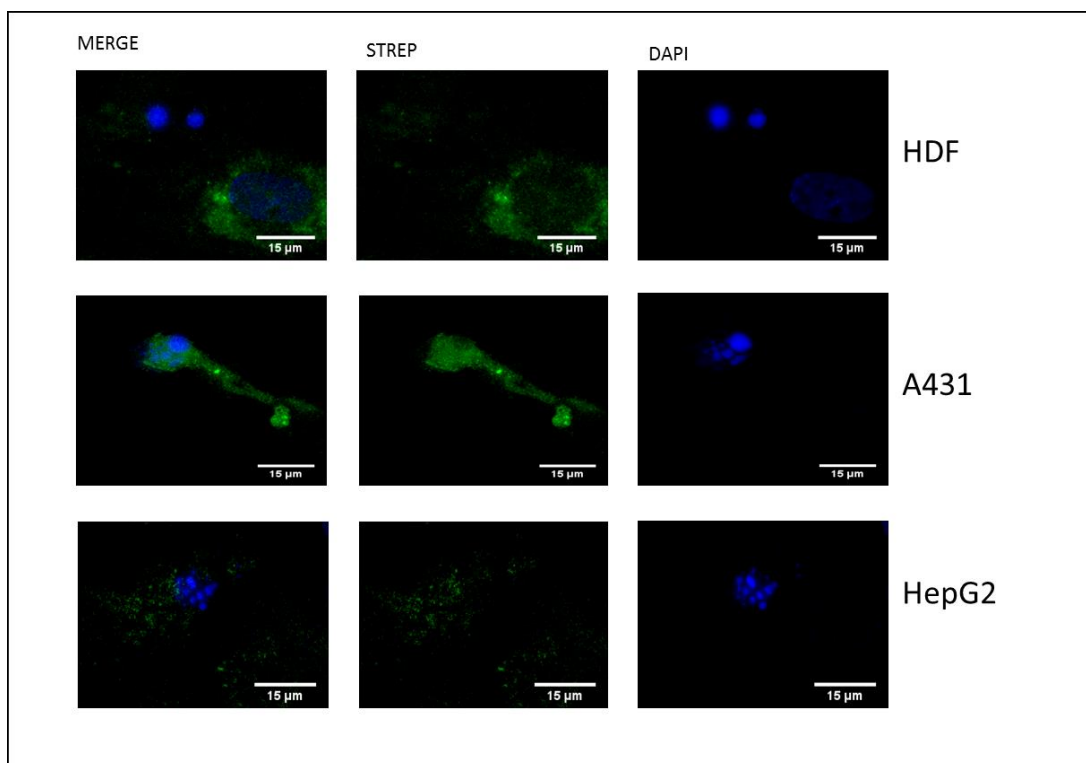


Figura 37: Determinación de la existencia de apoptosis causada por los tratamientos con nanosistemas de direccionamiento en las tres líneas celulares. Las células se incubaron con nanosistemas cargados con CPT (5 µM) durante 24 horas. Los núcleos se marcaron con DAPI y los nanosistemas se marcaron con anticuerpo anti-strep. La apoptosis se puede determinar por la presencia de núcleos condensados y fragmentados.

Estos dos ensayos permiten corroborar que los nanosistemas de direccionamiento inducen la muerte celular mediante apoptosis.

La efectividad de los nanosistemas con los dos ligandos MagOH-CPT-rFab/rNRG sobre los conjugados solos puede explicarse por varias razones:

### **1) El mecanismo de endocitosis del complejo ligando receptor**

La neuregulina-2 (NRG2) se une a ErbB3 y ErbB4 y es capaz de activar, por heterodimerización con estos receptores, a EGFR (ErbB1) y ErbB2 <sup>89,133</sup>. Se ha visto que los niveles de expresión de ErbB4 en células tumorales epiteliales son bastantes diferentes entre sí <sup>89</sup>, siendo los niveles en A431 y HepG2 considerablemente bajos. La Neuregulina, al unirse al receptor provoca una endocitosis lenta, para asegurarse el correcto reconocimiento y activación del receptor, seguido de un mecanismo de reciclaje del receptor <sup>128</sup>. Por tanto, aunque estas líneas celulares no posean un nivel elevado de expresión de los receptores diana de la Neuregulina, provocan la heterodimerización con los otros tipos de receptores; además como induce el reciclaje del receptor, los receptores ErbB3 o ErbB4 de las células pueden volver expresarse en la superficie de la célula.

### **2) El mecanismo de acción del fragmento de anticuerpo**

Los receptores EGFR (ErbB1) son bloqueados por el anticuerpo, impidiendo su reciclaje y promoviendo su degradación proteolítica. El fragmento de anticuerpo rFab, se une al receptor EGFR (ErbB1), bloquea la unión con el ligando y, de esta forma, previene también la activación del mismo y su reciclaje. Existen varios tipos de anticuerpos frente al receptor EGFR que actualmente se usan en inmunoterapia contra tumores con sobreexpresión de este tipo de receptores. Por ejemplo, el Cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico frente a EGFR <sup>134</sup>. En ensayos clínicos se ha comprobado que el tratamiento combinado de Cetuximab con Irinotecan, un derivado del CPT, ha dado mejores resultados que solo el tratamiento con el anticuerpo <sup>135</sup>.

### **3) El mecanismo de acción de las neuregulinas y sus receptores asociados:**

La activación de los diferentes receptores ErbB mediante NRG2 pueden activar distintas vías de señalización, dependiendo del tipo celular tales, como MAPK, PI3, Proteína Quinasa C y la vía JAK-STAT. La Neuregulina NRG2 regula la proliferación, diferenciación y supervivencia celular <sup>136</sup>, induce el crecimiento y la diferenciación en células epiteliales o neuronales <sup>11</sup>. La desregulación de la actividad de NRG2 puede conllevar la aparición de cáncer, esquizofrenia o Alzheimer <sup>91,137</sup>. Sin embargo no

existen muchos datos acerca de las respuestas específicas en diferentes líneas celulares<sup>136</sup>. NRG2 $\beta$  estimula el crecimiento dependiente de dosis en células MDA-MB-453<sup>138</sup>, sin embargo, en células MDA-MB-468 retrasa el progreso del ciclo celular<sup>139</sup>.

Se ha comprobado que homodímeros activados del receptor ErbB3 o heterodímeros ErbB3-ErbB4 pueden localizarse en el núcleo y activar factores de transcripción<sup>140</sup>. Aunque la localización nuclear de las Neuregulinas aún no ha sido completamente dilucidada, se han identificado varios genes dependientes de las Neuregulinas así como niveles elevados de las mismas en algunos tumores invasivos<sup>97</sup>.

#### **4) El mecanismo de acción de la CPT**

El mecanismo de acción de la CPT es de sobra conocido por ser su diana molecular la topoisomerasa I. Esta enzima está implicada en procesos de regulación de la topología del ADN durante la replicación, la recombinación y la transcripción<sup>141</sup>. El CPT se une a los complejos ADN-TopI e inhibe la religación del ADN, lo que provoca daños severos en ADN llevando a la célula a morir por apoptosis<sup>142</sup>.

A la vista de estos datos, podemos decir que el ligando rNRG, así como los receptores activados por la misma, inducen la transcripción de genes reguladores de la proliferación, diferenciación o supervivencia celular. Esto provoca cambios en la topología del ADN donde interviene la enzima topoisomerasa I. Esto provoca que el núcleo se encuentre más susceptible a la acción de la CPT, lo que podría explicar las diferencias en la eficacia de los nanosistemas con Neuregulina comparados con los conjugados solo con el anticuerpo.



## Capítulo 4. Conclusiones



La eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga en Camptotecina que hemos alcanzado con nuestros nanovectores son ambas extremadamente elevadas. Además de estas excelentes características en lo que se refiere a la vectorización de fármacos quimioterapéuticos, el hecho de que nuestros nanovectores posean un núcleo superparamagnético resulta muy prometedor de cara a posteriores estudios en aplicaciones terapéuticas tales como la terapia hipertérmica y la resonancia magnética nuclear de imagen. En cuanto a su caracterización químico-física, nuestros nanovectores, además de poseer una elevada estabilidad, liberan su carga en el agente quimioterapéutico de forma sostenida.

La vectorización se ejerce sobre la familia de receptores EGF, un receptor ampliamente expresado en tumores. Hemos utilizado dos agentes de direccionamiento, tanto por separado como en combinación: por un lado, un fragmento de anticuerpo dirigido contra EGFR y, por otro lado, uno de los ligandos del receptor, en concreto una neuregulina. Nuestra elección de los agentes de direccionamiento permite tratar tumores que expresan ErbB2, es decir, tumores Her2+, así como tumores Her2- que expresan EGFR, es decir ErbB1. De acuerdo a nuestros resultados, el uso de neuregulina como agente de direccionamiento proporciona un vector eficiente para la entrega de cargos al núcleo, lo que favorece, en el caso particular de la Camptotecina y debido a su mecanismo de acción, su actividad antitumoral. A dosis muy bajas del nanovector cargado con Camptotecina, el efecto de supervivencia celular de la neuregulina predomina sobre la citotoxicidad del fármaco antitumoral. Esto puede deberse a que el umbral en el que la neuregulina estimula el crecimiento celular es muy inferior a aquel en el que la Camptotecina induce la apoptosis celular, por lo que en el caso del vector dirigido exclusivamente con la neuregulina, la dosis debe ser elevada para que suponga algún beneficio. Esta deficiencia no se manifiesta en el nanovector que, además de la neuregulina, incorpora un fragmento de anticuerpo contra EGFR. En tales formulaciones bidentadas se obtienen claros beneficios en la apoptosis celular ya desde las dosis más bajas. Estos beneficios también resultan claros en lo que se refiere a las dosis letales 50, observándose que la formulación bidentada requiere mucho menos Camptotecina que cualquiera de las monodentadas, ya sea la que sólo contiene la neuregulina como agente de direccionamiento, o la que sólo contiene el anticuerpo. Desde una perspectiva más amplia, la acción de Camptotecina se hace mucho más

eficiente en las formulaciones bidentadas porque estas proporcionan, por un lado, un vector que se dirige a las células tumorales y, por otro lado, un vector que se dirige al núcleo, lo que resulta en un efecto tándem. Por último, también cabe esperar que la formulación bidentada sea más eficiente para hacer frente a la aparición de mutaciones que afecten al reconocimiento del receptor, ya que se dirige a tres receptores de la familia EGFR, lo que ayudaría a superar uno de los grandes problemas de la terapia antitumoral.





## Capítulo 5. Bibliografía



- (1) Linggi, B., and Carpenter, G. (2006) ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol.* 16, 649–56.
- (2) Singh, B., Carpenter, G., and Coffey, R. J. (2016) EGF receptor ligands: recent advances. *F1000Research* 5.
- (3) Carpenter, G., and Liao, H.-J. (2009) Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus. *Exp. Cell Res.* 315, 1556–66.
- (4) Wells, A., and Marti, U. (2002) Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? *3*, 1–6.
- (5) Bennasroune, A., Gardin, A., Aunis, D., Crémel, G., and Hubert, P. (2004) Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 50, 23–38.
- (6) [TheMedicalBiochemistryPage.org](http://TheMedicalBiochemistryPage.org).
- (7) Goodsell, D. S. (2003) The molecular perspective: epidermal growth factor. *Oncologist* 8, 496–7.
- (8) Roskoski, R. (2014) The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.* 79, 34–74.
- (9) Kumar, R., Paul, A. M., Amjesh, R., George, B., and Pillai, M. R. (2020) Coordinated dysregulation of cancer progression by the HER family and p21-activated kinases. *Cancer Metastasis Rev.* 39, 583–601.
- (10) Tomas, A., Futter, C. E., and Eden, E. R. (2014, January) EGF receptor trafficking: Consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol.* Trends Cell Biol.
- (11) Carraway, K. L., and Burden, S. J. (1995) Neuregulins and their receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 606–612.
- (12) Kumar, R., George, B., Campbell, M. R., Verma, N., Paul, A. M., Melo-Alvim, C., Ribeiro, L., Pillai, M. R., da Costa, L. M., and Moasser, M. M. (2020) HER family in cancer progression: From discovery to 2020 and beyond. *Adv. Cancer Res.* 1st ed. Elsevier Inc.
- (13) Schneider, M. R., and Wolf, E. (2009) The epidermal growth factor receptor

ligands at a glance. *J. Cell. Physiol.* 218, 460–6.

(14) Burgess, A. W. (2008) EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth factors* 26, 263–274.

(15) Mei, L., and Xiong, W.-C. (2008) Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 437–52.

(16) Mendelsohn, J. (2002) Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 20, 1S-13S.

(17) Wilson, K. J., Gilmore, J. L., Foley, J., Lemmon, M. A., and Riese, D. J. (2009) Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: Implications for cancer. *Pharmacol. Ther.* 122, 1–8.

(18) Jacob, W., James, I., Hasmann, M., and Weisser, M. (2018) Clinical development of HER3-targeting monoclonal antibodies: Perils and progress. *Cancer Treat. Rev.* 68, 111–123.

(19) Meulendijks, D., Jacob, W., Voest, E. E., Mau-Sorensen, M., Martinez-Garcia, M., Taus, A., Fleitas, T., Cervantes, A., Lolkema, M. P., Langenberg, M. H. G., De Jonge, M. J., Sleijfer, S., Han, J. Y., Calles, A., Felip, E., Kim, S. W., Schellens, J. H. M., Wilson, S., Thomas, M., Ceppi, M., Meneses-Lorente, G., James, I., Vega-Harring, S., Dua, R., Nguyen, M., Steiner, L., Adessi, C., Michielin, F., Bossenmaier, B., Weisser, M., and Lassen, U. N. (2017) Phase Ib study of lumretuzumab plus cetuximab or erlotinib in solid tumor patients and evaluation of HER3 and heregulin as potential biomarkers of clinical activity. *Clin. Cancer Res.* 23, 5406–5415.

(20) Morelli, M. P., Overman, M. J., Dasari, A., Kazmi, S. M. A., Mazard, T., Vilar, E., Morris, V. K., Lee, M. S., Herron, D., Eng, C., Morris, J., Kee, B. K., Janku, F., Deaton, F. L., Garrett, C., Maru, D., Diehl, F., Angenendt, P., and Kopetz, S. (2015) Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Ann. Oncol.* 26, 731–736.

(21) Griffiths, C. L., and Olin, J. L. (2012) Triple Negative Breast Cancer : A Brief.

(22) O'Donovan, N., and Crown, J. (2007) EGFR and HER-2 antagonists in breast cancer. *Anticancer Res.* 27, 1285–1294.

(23) Asif, H. M., Sultana, S., Ahmed, S., Akhtar, N., and Tariq, M. (2016) HER-2

positive breast cancer - A mini-review. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 17, 1609–1615.

(24) Paper, R., Molavipordanjani, S., and Hosseinimehr, S. J. (2021) The radiolabeled her3 targeting molecules for tumor imaging. *Iran. J. Pharm. Res.* 20, 141–152.

(25) Jones, F. E. (2008) HER4 Intracellular Domain ( 4ICD ) Activity in the Developing Mammary Gland and Breast Cancer 247–258.

(26) Balic, M., Thomssen, C., Würstlein, R., Gnant, M., and Harbeck, N. (2019) St. Gallen/Vienna 2019: A brief summary of the consensus discussion on the optimal primary breast cancer treatment. *Breast Care* 14, 103–110.

(27) Panal, M., Herrera, M., Muela, D., and Hardisson, D. (2017) Revista de Senología y Patología Mamaria Correlación entre la expresión de Ki67 con factores de mama precoz 27.

(28) Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., and Yu, S. C. (2020) Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res.* 22, 1–13.

(29) Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Okamoto, I., Satoh, T., Cappuzzo, F., Souglakos, J., Ercan, D., Rogers, A., Roncalli, M., Takeda, M., Fujisaka, Y., Philips, J., Shimizu, T., Maenishi, O., Cho, Y., Sun, J., Destro, A., Taira, K., Takeda, K., Okabe, T., Swanson, J., Itoh, H., Takada, M., Lifshits, E., Okuno, K., Engelman, J. A., Shivdasani, R. A., Nishio, K., Fukuoka, M., Varella-Garcia, M., Nakagawa, K., and Jänne, P. A. (2011) Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci. Transl. Med.* 3.

(30) Gianni, L., Pienkowski, T., Im, Y. H., Roman, L., Tseng, L. M., Liu, M. C., Lluch, A., Staroslawska, E., de la Haba-Rodriguez, J., Im, S. A., Pedrini, J. L., Poirier, B., Morandi, P., Semiglazov, V., Srimuninnimit, V., Bianchi, G., Szado, T., Ratnayake, J., Ross, G., and Valagussa, P. (2012) Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): A randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 13, 25–32.

(31) Xuhong, J.-C., Qi, X.-W., Zhang, Y., and Jiang, J. (2019) Mechanism, safety and efficacy of three tyrosine kinase inhibitors lapatinib, neratinib and pyrotinib in HER2-positive breast cancer. *Am. J. Cancer Res.* 9, 2103.

- (32) Markham, A. (2019) Alpelisib: First Global Approval. *Drugs* 79, 1249–1253.
- (33) Ellis, H., and Ma, C. X. (2019) PI3K Inhibitors in Breast Cancer Therapy. *Curr. Oncol. Rep.* 21.
- (34) Wu, K., Su, D., Liu, J., Saha, R., and Wang, J. P. (2019) Magnetic nanoparticles in nanomedicine: A review of recent advances. *Nanotechnology* 30.
- (35) Tietze, R., Zaloga, J., Unterweger, H., Lyer, S., Friedrich, R. P., Janko, C., Pöttler, M., Dürr, S., Alexiou, C., Pottler, M., Durr, S., and Alexiou, C. (2015) Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468, 463–470.
- (36) Feynman, R. P. (1960) There's Plenty of Room at the Bottom. An invitation to open up a new field of physics. *Eng. Sci.* 23, 22.
- (37) Taniguchi, N.; Arakawa, C.; Kobayashi, T. (1974) On the basic concept of nanotechnology., in *Proceedings of the International Conference on Production Engineering*, pp 26–29. Tokio.
- (38) Drexler, E. (1986) Engines of Creation: The coming Era of Nanotechnology.
- (39) Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., and Rizzolio, F. (2020) The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* 25, 112.
- (40) Iqbal, P., Preece, J. A., and Mendes, P. M. (2012) Nanotechnology: The “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches. *Supramol. Chem.*
- (41) Venugopal, J., Prabhakaran, M. P., Low, S., Choon, A. T., Zhang, Y. Z., Deepika, G., and Ramakrishna, S. (2008) Nanotechnology for nanomedicine and delivery of drugs. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2184–2200.
- (42) Sun, T., Zhang, Y. S., Pang, B., Hyun, D. C., Yang, M., and Xia, Y. (2014) Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angew. Chemie - Int. Ed.*
- (43) Seeney, C. E. (2015) The emerging applications of magnetic nanovectors in nanomedicine. *Pharm. Pat. Anal.* 4, 285–304.
- (44) Kim, E. M., and Jeong, H. J. (2017, June 1) Current Status and Future Direction of Nanomedicine: Focus on Advanced Biological and Medical Applications. *Nucl. Med.*

*Mol. Imaging* (2010). Springer Verlag.

(45) Su, H., Wang, Y., Gu, Y., Bowman, L., Zhao, J., and Ding, M. (2018, January 1) Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine. *J. Appl. Toxicol.* John Wiley and Sons Ltd.

(46) Nazir, S., Hussain, T., Ayub, A., Rashid, U., and MacRobert, A. J. (2014) Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 10, 19–34.

(47) Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., and Corrie, S. R. (2016) Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* 33, 2373–2387.

(48) Cai, Y., Chen, X., Si, J., Mou, X., and Dong, X. (2021) All-in-One Nanomedicine: Multifunctional Single-Component Nanoparticles for Cancer Theranostics. *Small.* John Wiley and Sons Inc.

(49) Bahrami, B., Hojjat-Farsangi, M., Mohammadi, H., Anvari, E., Ghalamfarsa, G., Yousefi, M., and Jadidi-Niaragh, F. (2017) Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. *Immunol. Lett.* 190, 64–83.

(50) Milewska, S., Niemirowicz-Laskowska, K., Siemiaszko, G., Nowicki, P., Wilczewska, A. Z., and Car, H. (2021) Current Trends and Challenges in Pharmaco-economic Aspects of Nanocarriers as Drug Delivery Systems for Cancer Treatment. *Int. J. Nanomedicine Volume 16*, 6593–6644.

(51) Mornet S. a b c Vasseur, S. . b d G. F. . b e f g h D. E. . b g i. (2004) Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *J. Mater. Chem.* 14, 2161–2175.

(52) Dilnawaz, F., Singh, A., Mohanty, C., and Sahoo, S. K. (2010) Dual drug loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. *Biomaterials* 31, 3694–3706.

(53) Karimi, Z., Karimi, L., and Shokrollahi, H. (2013) Nano-magnetic particles used in biomedicine: core and coating materials. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 33, 2465–75.

(54) Shubayev, V. I., Pisanic, T. R. 2nd, and Jin, S. (2009) Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 467–477.

- (55) Li, X., Li, W., Wang, M., and Liao, Z. (2021) Magnetic nanoparticles for cancer theranostics: Advances and prospects. *J. Control. Release* 335, 437–448.
- (56) Ali, A., Zafar, H., Zia, M., ul Haq, I., Phull, A. R., Ali, J. S., and Hussain, A. (2016) Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 9, 49–67.
- (57) Maity, D., and Agrawal, D. C. (2007) Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *J. Magn. Magn. Mater.* 308, 46–55.
- (58) Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J., and Couvreur, P. (2012) Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem. Rev.* 112, 5818–5878.
- (59) Lu, A. H., Salabas, E. L., and Schüth, F. (2007) Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46, 1222–1244.
- (60) Khiabani, S. S., Farshbaf, M., Akbarzadeh, A., and Davaran, S. (2016) Magnetic nanoparticles: preparation methods, applications in cancer diagnosis and cancer therapy. <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1167704> 45, 6–17.
- (61) Vallabani, N. V. S., and Singh, S. (2018) Recent advances and future prospects of iron oxide nanoparticles in biomedicine and diagnostics. *3 Biotech* 8, 279.
- (62) Laurent, S., Saei, A. A., Behzadi, S., Panahifar, A., and Mahmoudi, M. (2014) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges. *Expert Opin. Drug Deliv.* 11, 1449–70.
- (63) Ali, A., Shah, T., Ullah, R., Zhou, P., Guo, M., Ovais, M., Tan, Z., and Rui, Y. K. (2021) Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications. *Front. Chem.* 9, 1–25.
- (64) Bee, A., Massart, R., and Neveu, S. (1995) Synthesis of very fine maghemite particles. *J. Magn. Magn. Mater.* 149, 6–9.
- (65) Wong, X. Y., Sena-Torralba, A., Álvarez-Diduk, R., Muthoosamy, K., and Merkoçi, A. (2020) Nanomaterials for Nanotheranostics: Tuning Their Properties According to Disease Needs. *ACS Nano* 14, 2585–2627.

- (66) Waddington, D. E. J., Boele, T., Maschmeyer, R., Kuncic, Z., and Rosen, M. S. (2020) High-sensitivity in vivo contrast for ultra-low field magnetic resonance imaging using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Sci. Adv.* 6.
- (67) Deng, F., Bell, D. (2018) Superparamagnetic iron oxide | Radiology Reference Article | *Radiopaedia.org*.
- (68) Moise, S., Byrne, J. M., El Haj, A. J., and Telling, N. D. (2018) The potential of magnetic hyperthermia for triggering the differentiation of cancer cells. *Nanoscale* 10, 20519–20525.
- (69) Castillo, P. M., de la Mata, M., Casula, M. F., Sánchez-Alcázar, J. A., Zaderenko, A. P., Mata, M. de la, Casula, M. F., Sánchez-Alcázar, J. A., Zaderenko, A. P., de la Mata, M., Casula, M. F., Sánchez-Alcázar, J. A., and Zaderenko, A. P. (2014) PEGylated versus non-PEGylated magnetic nanoparticles as camptothecin delivery system. *Beilstein J. Nanotechnol.* 5, 1312.
- (70) van Oers, M. M. (2011) Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *J. Invertebr. Pathol.* 107 Suppl, S3-15.
- (71) Wu, C. P., Huang, Y.-J., Wang, J.-Y., Wu, Y.-L., Lo, H.-R., Wang, J.-C., and Chao, Y.-C. (2010) Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus LEF-2 Is a Capsid Protein Required for Amplification but Not Initiation of Viral DNA Replication. *J. Virol.* 84, 5015–5024.
- (72) Swiss Institute of bioinformatics. [Www.isb-sib.ch/](http://www.isb-sib.ch/).
- (73) Bouma, A., de Smit, A. ., de Kluijver, E. ., Terpstra, C., and Moormann, R. J. . (1999) Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.* 66, 101–114.
- (74) Adachi, T., Takiya, S., Suzuki, Y., Iwami, M., Kawakami, A., Takahashi, S. Y., Ishizaki, H., Nagasawa, H., and Suzuki, A. (1989) cDNA Structure and expression of bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 264, 7681–7685.
- (75) Congote, L. F., and Li, Q. (1994) Accurate processing and secretion in the baculovirus expression system of an erythroid-cell-stimulating factor consisting of a chimaera of insulin-like growth factor II and an insect insulin-like peptide. *Biochem. J.*

299, 101–107.

- (76) Hitchman, R. B., Murguía-Meca, F., Locanto, E., Danquah, J., and King, L. A. (2011) Baculovirus as vectors for human cells and applications in organ transplantation. *J. Invertebr. Pathol. 107 Suppl*, S49-58.
- (77) Kaikkonen, M. U., Ylä-Herttuala, S., and Airene, K. J. (2011) How to avoid complement attack in baculovirus-mediated gene delivery. *J. Invertebr. Pathol. 107 Suppl*, S71-9.
- (78) Rivera-Gonzalez, G. C., Swift, S. L., Dussupt, V., Georgopoulos, L. J., and Maitland, N. J. (2011) Baculoviruses as gene therapy vectors for human prostate cancer. *J. Invertebr. Pathol. 107 Suppl*, S59-70.
- (79) Johnson, M. (2016) Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. *Mater. Methods*.
- (80) Latorre, R. (1996) Biofísica y fisiología celular. Universidad de Sevilla.
- (81) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *J. Biol. Chem. 193*, 265–275.
- (82) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature 227*, 680–5.
- (83) McCloy, R. A., Rogers, S., Caldon, C. E., Lorca, T., Castro, A., and Burgess, A. (2014) Partial inhibition of Cdk1 in G<sub>2</sub> phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle 13*, 1400–1412.
- (84) Casula, M. F., Corrias, A., Arosio, P., Lascialfari, A., Sen, T., Floris, P., and Bruce, I. J. (2011) Design of water-based ferrofluids as contrast agents for magnetic resonance imaging. *J. Colloid Interface Sci. 357*, 50–55.
- (85) Zaderenko Partida, A. P., Caro Salazar, C., Merklings, P., Calero Díaz, S., Sayagués de Vega, M. ., Oliva Montero, J. ., and Aguayo Orozco, A. (2015) Procedimiento post-síntesis de modificación de la superficie de nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro. P201430524.
- (86) Koefoed, K., Steinaa, L., Søderberg, J. N., Kjær, I., Jacobsen, H. J., Meijer, P.-J.,

- Haurum, J. S., Jensen, A., Kragh, M., Andersen, P. S., and Pedersen, M. W. (2011) Rational identification of an optimal antibody mixture for targeting the epidermal growth factor receptor. *MAbs* 3, 584–95.
- (87) Kim, J., Lee, J., Kim, C., Choi, J., and Kim, A. (2015) Anti-cancer effect of metformin by suppressing signaling pathway of HER2 and HER3 in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Tumor Biol.* 2015 375 37, 5811–5819.
- (88) Olayioye, M. a, Neve, R. M., Lane, H. a, and Hynes, N. E. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19, 3159–3167.
- (89) Okazaki, S., Nakatani, F., Masuko, K., Tsuchihashi, K., Ueda, S., Masuko, T., Saya, H., and Nagano, O. (2016) Development of an ErbB4 monoclonal antibody that blocks neuregulin-1-induced ErbB4 activation in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470, 239–244.
- (90) Mei, L., and Nave, K. A. (2014) Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases. *Neuron.*
- (91) Carraway III, K. L., Weber, J. L., Unger, M. J., Ledesma, J., Yu, N., Gassmann, M., and Lai, C. (1997) Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* 387, 512–516.
- (92) Haigler, H., Ash, J. F., Singer, S. J., and Cohen, S. (1978) Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 3317–21.
- (93) Costantini, S., Di Bernardo, G., Cammarota, M., Castello, G., and Colonna, G. (2013) Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene* 518, 335–345.
- (94) Faria, J. A. Q. A., de Andrade, C., Goes, A. M., Rodrigues, M. A., and Gomes, D. A. (2016) Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478, 39–45.
- (95) Johnson, H. M., Subramaniam, P. S., Olsnes, S., and Jans, D. A. (2004) Trafficking and signaling pathways of nuclear localizing protein ligands and their receptors. *BioEssays* 26, 993–1004.
- (96) Raabe, T. D., Deadwyler, G., Varga, J. W., and Devries, G. H. (2004) Localization

of neuregulin isoforms and erbB receptors in myelinating glial cells. *Glia* 45, 197–207.

(97) Wang, M., Trim, C. M., and Gullick, W. J. (2011) Localisation of Neuregulin 1- $\beta$ 3 to different sub-nuclear structures alters gene expression. *Exp. Cell Res.* 317, 423–32.

(98) Reif, R., Adawy, A., Vartak, N., Schröder, J., Günther, G., Ghallab, A., Schmidt, M., Schormann, W., and Hengstler, J. G. (2016) Activated ErbB3 Translocates to the Nucleus via Clathrin-independent Endocytosis, Which Is Associated with Proliferating Cells. *J. Biol. Chem.* 291, 3837–47.

(99) Korotkevych, N. V., Labyntsev, A. J., Kolybo, D. V., and Komisarenko, S. V. (2015) The Soluble Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor Stimulates EGF Receptor Trafficking to the Nucleus. *PLoS One* (Larijani, B., Ed.) 10, e0127887.

(100) Wang, Y.-N., and Hung, M.-C. (2012) Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci.* 2, 13.

(101) Han, W., and Lo, H.-W. (2012) Landscape of EGFR signaling network in human cancers: Biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer Lett.* 318, 124–134.

(102) Coti, K. K., Belowich, M. E., Liong, M., Ambrogio, M. W., Lau, Y. A., Khatib, H. A., Zink, J. I., Khashab, N. M., and Stoddart, J. F. (2009) Mechanised nanoparticles for drug delivery. *Nanoscale* 1, 16–39.

(103) Brand, T. M., Iida, M., Li, C., and Wheeler, D. L. (2011) The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov. Med.* 12, 419–32.

(104) Qu, J.-B., Shao, H.-H., Jing, G.-L., and Huang, F. (2013) PEG-chitosan-coated iron oxide nanoparticles with high saturated magnetization as carriers of 10-hydroxycamptothecin: Preparation, characterization and cytotoxicity studies. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 102, 37–44.

(105) Kievit, F. M., and Zhang, M. (2011) Surface engineering of iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. *Acc. Chem. Res.* 44, 853–862.

(106) Banerjee, S. S., Aher, N., Patil, R., and Khandare, J. (2012) Poly(ethylene glycol)-Prodrug Conjugates: Concept, Design, and Applications. *J. Drug Deliv.* 2012, 103973.

- (107) Owens DE, and Peppas NA. (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307, 93–102.
- (108) Allard-Vannier, E., Hervé-Aubert, K., Kaaki, K., Blondy, T., Shebanova, A., Shaitan, K. V., Ignatova, A. A., Saboungi, M.-L., Feofanov, A. V., and Chourpa, I. (2016) Folic acid-capped PEGylated magnetic nanoparticles enter cancer cells mostly via clathrin-dependent endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*
- (109) Kadajji, V. G., and Betageri, G. V. (2011) Water soluble polymers for pharmaceutical applications. *Polymers (Basel)*. 3, 1972–2009.
- (110) Muro, S. (2012) Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems. *J. Control. Release* 164, 125–137.
- (111) Pelaz, B., del Pino, P., Maffre, P., Hartmann, R., Gallego, M., Rivera-Fernández, S., de la Fuente, J. M., Nienhaus, G. U., and Parak, W. J. (2015) Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano* 9, 6996–7008.
- (112) Mout, R., Moyano, D. F., Rana, S., and Rotello, V. M. (2012) Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2539.
- (113) Morelli, C., Maris, P., Sisci, D., Perrotta, E., Brunelli, E., Perrotta, I., Panno, M. L., Tagarelli, A., Versace, C., Casula, M. F., Testa, F., Andò, S., Nagy, J. B., and Pasqua, L. (2011) PEG-templated mesoporous silica nanoparticles exclusively target cancer cells. *Nanoscale* 3, 3198.
- (114) Dai, Q., Walkey, C., and Chan, W. C. W. (2014) Polyethylene Glycol Backfilling Mitigates the Negative Impact of the Protein Corona on Nanoparticle Cell Targeting. *Angew. Chemie Int. Ed.* 53, n/a-n/a.
- (115) Fernandez-Montesinos, R., Castillo, P. M., Klippstein, R., Gonzalez-Rey, E., Mejias, J. A., Zaderenko, A. P., and Pozo, D. (2009) Chemical synthesis and characterization of silver-protected vasoactive intestinal peptide nanoparticles. *Nanomedicine* 4, 919–930.
- (116) Li, Y.-C., Rissanen, S., Stepniewski, M., Cramariuc, O., Rog, T., Mirza, S., Xhaard, H., Wytrwal, M., Kepczynski, M., and Bunker, A. (2012) Study of interaction between PEG carrier and three relevant drug molecules: piroxicam, paclitaxel, and

hematoporphyrin. *J. Phys. Chem. B* 116, 7334–7341.

(117) Calabrese, E. J. (2016) Preconditioning is hormesis part I: Documentation, dose-response features and mechanistic foundations. *Pharmacol. Res.* 110, 242–64.

(118) Calabrese, E. J. (2005) Cancer Biology and Hormesis: Calabrese, E. J. (2005). Cancer Biology and Hormesis: Human Tumor Cell Lines Commonly Display Hormetic (Biphasic) Dose Responses. *Critical Reviews in Toxicology*, 35(6), 463–582. <https://doi.org/10.1080/10408440591034502> Human T. *Crit. Rev. Toxicol.* 35, 463–582.

(119) Madl, P., Filippis, A. De, and Tedeschi, A. (2020) Effects of ultra-weak fractal electromagnetic signals on the aqueous phase in living systems: a test-case analysis of molecular rejuvenation markers in fibroblasts. <https://doi.org/10.1080/15368378.2020.1762634> 39, 227–238.

(120) Iavicoli, I., Fontana, L., Leso, V., and Calabrese, E. J. (2014) Science of the Total Environment Hormetic dose – responses in nanotechnology studies. *Sci. Total Environ.* 487, 361–374.

(121) Castelli, S., Coletta, A., D’Annessa, I., Fiorani, P., Tesauro, C., and Desideri, A. (2012) Interaction between natural compounds and human topoisomerase I. *Biol. Chem.* 393, 1327–40.

(122) Holm, C., Covey, J. M., Kerrigan, D., and Pommier, Y. (1989) Differential Requirement of DNA Replication for the Cytotoxicity of DNA Topoisomerase I and II Inhibitors in Chinese Hamster DC3F Cells. *Cancer Res.* 49.

(123) Hsiang, Y.-H., Lihou, M. G., and Liu, L. F. (1989) Arrest of Replication Forks by Drug-stabilized Topoisomerase I-DNA Cleavable Complexes as a Mechanism of Cell Killing by Camptothecin. *Cancer Res.* 49.

(124) Liu, L. F., Desai, S. D., Li, T. K., Mao, Y., Sun, M., and Sim, S. P. (2000) Mechanism of action of camptothecin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 922, 1–10.

(125) Fu, Y., and Kao, W. J. (2010) Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 429–444.

(126) Stoll, S. W., Kansra, S., Peshick, S., Fry, D. W., Leopold, W. R., Wiesen, J. F., Sibilia, M., Zhang, T., Werb, Z., Derynck, R., Wagner, E. F., and Elder, J. T. (2001)

- Differential utilization and localization of ErbB receptor tyrosine kinases in skin compared to normal and malignant keratinocytes. *Neoplasia* 3, 339–350.
- (127) Sorkina, T., Bild, A., Tebar, F., and Sorkin, A. (1999) Clathrin, adaptors and eps15 in endosomes containing activated epidermal growth factor receptors. *J. Cell Sci.* 317–27.
- (128) Waterman, H., Sabanai, I., Geiger, B., and Yarden, Y. (1998) Alternative Intracellular Routing of ErbB Receptors May Determine Signaling Potency. *J. Biol. Chem.* 273, 13819–13827.
- (129) Sánchez-Alcázar, J. A., Rodríguez-Hernández, Á., Cordero, M. D., Fernández-Ayala, D. J. M., Brea-Calvo, G., Garcia, K., and Navas, P. (2007) The apoptotic microtubule network preserves plasma membrane integrity during the execution phase of apoptosis. *Apoptosis* 2007 127 12, 1195–1208.
- (130) Avila, M. O., Maraver, J. G., Paz, M. V., Lavera, I. De, Mata, M. D. La, Cordero, M. D., G. E. A., Ávila, M. O., Vega, A. F., Maraver, J. G., Paz, M. V., Lavera, I. De, Mata, M. D. La, Cordero, M. D., Gómez, E. A., Pavón, A. D., Córdoba, M. Á., Cotán, D., and Sánchez-Alcázar, J. A. (2015) Emerging Roles of Apoptotic Microtubules During the Execution Phase of Apoptosis 1. *Cytoskeleton* 446, 435–446.
- (131) Oropesa-Ávila, M., Fernández-Vega, A., de la Mata, M., Maraver, J. G., Cordero, M. D., Cotán, D., de Miguel, M., Calero, C. P., Paz, M. V., Pavón, A. D., Sánchez, M. A., Zaderenko, A. P., Ybot-González, P., and Sánchez-Alcázar, J. A. (2013) Apoptotic microtubules delimit an active caspase free area in the cellular cortex during the execution phase of apoptosis. *Cell Death Dis.* 4, e527.
- (132) Doncel, J. P., Ojeda, P. de la C., OropesaÁvila, M., Paz, M. V., Lavera, I. De, Mata, M. D. La, Córdoba, M. Á., Hidalgo, R. L., Rivero, J. M. S., Cotán, D., and Sánchez-Alcázar, J. A. (2017) Cytoskeleton Rearrangements during the Execution Phase of Apoptosis (Jimenez-Lopez Dynamics, Function and Disease, J. C. B. T.-C.-S., Ed.), p Ch. 08. InTech, Rijeka.
- (133) Higashiyama, S., Horikawa, M., Yamada, K., Ichino, N., Nakano, N., Nakagawa, T., Miyagawa, J., Matsushita, N., Nagatsu, T., Taniguchi, N., and Ishiguro, H. (1997) A novel brain-derived member of the epidermal growth factor family that interacts with ErbB3 and ErbB4. *J. Biochem.* 122, 675–680.

- (134) Asano, R., Sone, Y., Makabe, K., Tsumoto, K., Hayashi, H., Katayose, Y., Unno, M., Kudo, T., and Kumagai, I. (2006) Humanization of the bispecific epidermal growth factor receptor x CD3 diabody and its efficacy as a potential clinical reagent. *Clin. Cancer Res.* 12, 4036–42.
- (135) Levene, A. P., Singh, G., and Palmieri, C. (2005) Therapeutic monoclonal antibodies in oncology. *J. R. Soc. Med.* 98, 146–52.
- (136) Kim, J. A., Jayabalan, A. K., Kothandan, V. K., Mariappan, R., Kee, Y., and Ohn, T. (2016) Identification of Neuregulin-2 as a novel stress granule component. *BMB Rep.* 49, 449–454.
- (137) Burden, S., and Yarden, Y. (1997) Neuregulins and their receptors: A versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 18, 847–855.
- (138) Nakano, N., Higashiyama, S., Endo, T., Ishiguro, H., Yamada, K., Nagatsu, T., and Taniguchi, N. (2000) NTAk and Isoforms Stimulate Breast Tumor Cell Growth by Means of Different Receptor Combinations. *J. Biochem.* 127, 925–930.
- (139) Crovello, C. S., Lai, C., Cantley, L. C., and Carraway, K. L. (1998) Differential Signaling by the Epidermal Growth Factor-like Growth Factors Neuregulin-1 and Neuregulin-2. *J. Biol. Chem.* 273, 26954–26961.
- (140) Tao, R.-H., and Maruyama, I. N. (2008) All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. *J. Cell Sci.* 121, 3207–17.
- (141) Legarza, K., and Yang, L.-X. (2006) New molecular mechanisms of action of camptothecin-type drugs. *Anticancer Res.* 26, 3301–5.
- (142) Liu, L. F., Duann, P., Lin, C. T., D'Arpa, P., and Wu, J. (1996) Mechanism of action of camptothecin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 803, 44–49.