

CONJUGACIÓN DE PÉPTIDO C9P-FICT ESPECÍFICO PARA HER2 COMO POTENCIAL NANOTERAPÉUTICO EN CÁNCER

Andrea Alfonseca¹, Sandeep Panikar¹, Elder de la Rosa², Pavel Lugo³, Tanya Camacho^{3*}

¹Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, CIATEJ, Guadalajara, 44270. ²Universidad La Salle Bajío, León, 37150.

³Investigador por México, Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, CIATEJ, Guadalajara, 44270.
tcamacho@ciatej.mx

Resumen

El receptor HER2 es una proteína transmembranal, asociada al cáncer de mama que se sobreexpresa en alrededor del 30% de los casos. La heterogénea distribución espacial del receptor HER2 en las células tumorales puede representar un problema de penetración que afecta la eficacia terapéutica, sin embargo, los conjugados de anticuerpo con fármaco (ADC) o los conjugados de péptidos con fármaco (PDC) pueden superar este problema siendo una opción de entrega inteligente de fármaco a nivel nanométrico (~100 nm). En este trabajo, se modeló *in silico* el péptido C9P, que fue aislado previamente por nuestro equipo de investigación. Posteriormente, se realizó una conjugación activa por EDC (N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) con isocianato de fluoresceína (FITC) generando la versión llamada C9P-FITC. Empleando microscopía confocal en células que expresan el receptor HER2, se demostró que el péptido C9P-FITC, tiene especificidad, penetración celular. Para ello, se seleccionaron las líneas celulares U87 y SKBR3 que son positivas al receptor HER2. Como control negativo se emplearon las células HBEC que son negativas al receptor HER2. Estas células fueron sembradas por duplicado en cámaras de cultivo celular para microscopía y se pusieron en contacto con el péptido C9P-FITC por 24 horas. En las células U87 y SKBR3 que son positivas a HER2 se encontró fluorescencia asociada a la penetración del péptido C9P-FITC. Sin embargo, en las células U87 el receptor HER2 no se encuentra sobreexpresado, por lo tanto, la fluorescencia asociada a la detección de C9P-FITC fue menor. En cambio, en las células HBEC no hubo detección debido a la ausencia del receptor HER2. El péptido C9P-FITC demostró alta especificidad a HER2, tanto en células de baja expresión o sobreexpresión del receptor. Adicionalmente, se empleó el péptido C9P para conjugarlos en la superficie de puntos cuánticos de carbono (CD) que también se conjugaron con el fármaco cisplatino (CPPD), para generar un nanoterapéutico. Finalmente, se analizó la entrega inteligente de cisplatino por el nanosistema empleando células SKBR3. Nuestros resultados sientan las bases que sustentan la aplicación de C9P como acarreador en la entrega inteligente de fármacos.

Palabras claves: cáncer de mama, péptidos, receptor HER2, nanomedicina

Abstract

HER2 is a transmembrane protein receptor associated with breast cancer, where it is overexpressed in about 30% of cases. The spatial heterogeneous distribution of the HER2 receptor in tumor cells may represent a problem affecting therapeutic efficacy, nevertheless antibody-drug conjugates (ADC) or peptide-drug conjugates (PDC) may overcome this problem. The C9P peptide was previously isolated by our research team. In this manuscript



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



we describe the in silico analysis of C9P. Subsequently, we describe an active conjugation with EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) and fluorescein isothiocyanate (FITC) resulting in C9P-FITC conjugated. Using confocal microscopy and the C9P-FITC peptide the specificity, cell penetration, in HER2-positive cells were demonstrated. For this, two cell lines U87 and SKBR3, which are HER2+ were used. The HBEC cells, which are HER2- were selected as negative control. These cells were seeded in a cell culture chambers for microscopy in duplicate and placed in contact with the C9P-FITC peptide for 24 hours. Both U87 and SKBR3 cells lines were positive for the presence of HER2 and were recognized by the C9P-FITC peptide. However, in U87 cells, the HER2 receptor is not overexpressed; therefore, the fluorescence associated with the detection of C9P-FITC was lower. In contrast, in the HBEC cells used as negative control, there was no detection due to the absence of HER2. The C9P-FITC peptide demonstrated high specificity to HER2 in cells with low expression and those that overexpress the receptor.

Additionally, C9P was used to conjugated in cisplatin-conjugated quantum dots (CDs), generating a nanosystem capable for specific payload delivery. Our nanotherapeutic has cytotoxicity in SKBR3 cells. Our preliminary results lay the basis for applying C9P as a drug carrier.

Keywords: breast cancer, peptide, HER2 receptor, nanomedicine

Introducción

El receptor HER2 es una proteína transmembranal, perteneciente a la familia ErbB o Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR). Estructuralmente, se caracteriza por una región extracelular N-terminal de unión a ligando, un único segmento transmembrana de hélice alfa y una región intracelular de tirosina quinasa. La sobreexpresión de HER2 está asociada con un amplio número de cánceres, incluidos de pulmón, ovario, glioblastoma y mama (Honarvar et al., 2018). El cáncer de mama es el segundo más común en todo el mundo y es más frecuente entre las mujeres. En general, esto lo convierte en la cuarta causa de muerte por cáncer a nivel mundial y en la principal causa de muerte en mujeres (Bray et al., 2018). En

México, el cáncer de mama representa la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres (Ramos-Herrera et al., 2020). Cuando se analizó por amplificación del ADN se ha demostrado que el receptor HER2 está sobreexpresado en aproximadamente el 30% de los cánceres primarios de mama (Honarvar et al., 2018). A pesar del enorme desarrollo tecnológico en diversas disciplinas científicas, la tasa de supervivencia de las pacientes que sufren esta enfermedad es baja, debido principalmente a un diagnóstico tardío y a un pronóstico poco esperanzador.

El receptor HER2 forma heterodímeros con otros receptores de la familia ErbB. Se ha descrito que los heterodímeros que contienen receptores HER2 tienen mayor potencial mitógeno (Honarvar et al., 2018). El



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

cáncer subtipo HER2+ enriquecido se caracteriza por la ausencia de receptores hormonales de estrógeno, progesterona y la sobreexpresión del receptor HER2 (HER2+, E-, PR-, Ki-67>30%) (Altunay et al., 2021).

Se ha propuesto que la expresión del receptor HER2 en la membrana celular podría ser heterogénea, mostrando diferentes patrones de distribución espacial que potencialmente afectan el tratamiento terapéutico, así como la respuesta y evaluación del estado de pacientes con cáncer de mama HER2+. La sobreexpresión de HER2 se asocia con un mayor crecimiento tumoral, una peor respuesta a la quimioterapia tradicional y una disminución de la supervivencia global; por lo tanto, las investigaciones se han centrado en el desarrollo de terapias dirigidas basadas en HER2 (Pallerla et al., 2021).

En general, los anticuerpos monoclonales (mAbs) contra el cáncer han demostrado resultados clínicos ineficientes, lo cual puede estar relacionado a la escasa penetración al centro de los tumores. Esta deficiencia puede estar relacionada con el tamaño de los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, 150 kDa para una IgG) (Rhodes and Green, 2018). Una alternativa prometedora es la disminución del tamaño de los anticuerpos, sin perder la capacidad de reconocimiento al antígeno.

Como ejemplos de reducción del tamaño de los anticuerpos, se ha generado diversos formatos por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos sencillos y doble (Fab y F(ab)₂), respectivamente, fragmentos variables de cadena sencilla (scFv). Recientemente, se ha impulsado el desarrollo de los dominios de solo

cadena pesada (sdAbs), por ejemplo, los VHH (dominio variable o nanobody) aislados de camellos, llamas y alpacas y los dominios vNAR (dominio variable de nuevo receptor de antígeno) aislados de tiburones, rayas y quimeras. En este sentido, los péptidos de 6-20 aminoácidos, caracterizados por su bajo peso molecular (660-2,200 Da) y su capacidad de reconocimiento (similar al reconocimiento de los anticuerpos) se pueden emplear para la generación de conjugados péptido fármaco (PDC). Los PDC pueden ofrecer mayores ventajas sobre los anticuerpos monoclonales conjugados, debido a su rápido aclaramiento sistémico, mayor estabilidad y aumento de la tasa de penetración al tumor (Giugliano et al., 2023).

Los PDC podrían representar la próxima generación de dominios conjugados a fármacos, específicamente se han empleado para el direccionamiento activo dirigido a HER2 (Honarvar et al., 2018), mostrando una capacidad superior para optimizar la administración terapéutica en el sitio, penetración tisular o tumoral y eliminación sanguínea mejorada (Panikar et al., 2019).

Entre los fármacos que pueden conjugarse con péptidos se encuentra el cisplatino (CDDP), un agente quimioterapéutico que actúa como alquilante, modificando el ADN y las proteínas celulares para detener la división celular y provocar la muerte de las células tumorales. El cisplatino se utiliza para tratar diversos tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama y otros. El mecanismo de acción del cisplatino se basa en su



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



capacidad para interferir con la división celular, dado que en su molécula contiene un átomo de platino y dos grupos de cloruro; cuando ingresa en una célula, los grupos de cloruro se disocian en presencia de agua, lo que facilita su inserción en el ADN. La formación de enlaces entre el cisplatino y el ADN produce modificaciones en la estructura de la cadena de ADN, lo que impide su replicación y transcripción (Ghosh, 2019). Estas alteraciones causan la muerte de las células tumorales, lo que se traduce en una reducción del tamaño del tumor. Además, el cisplatino también puede causar daño oxidativo al interactuar con los radicales libres, lo que conduce a la apoptosis (muerte celular programada) de las células tumorales (Tchounwou et al., 2021).

Sin embargo, las células cancerosas han adquirido resistencia al cisplatino después de repetidas administraciones, resultando en el incremento en la recurrencia y fallas en la terapia (Feng et al., 2018). Se ha demostrado que la farmacoresistencia se debe principalmente a la disminución de la internalización celular del cisplatino, que se relaciona con la baja expresión de la proteína transportadora de cobre (Ctr1), un transportador de entrada de cisplatino, dentro de la membrana plasmática de las células cancerosas resistentes al cisplatino (Feng et al., 2018). Se ha demostrado que algunos nanomateriales son prometedores portadores de fármacos para el tratamiento eficaz del cáncer (Ai et al., 2016), debido a que incrementan la internalización del fármaco a través de la endocitosis.

Por lo tanto, es relevante la construcción de nuevos nanosistemas que funcionen como acarreadores estables. Estos nanosistemas terapéuticos (1-100 nm) pueden conformarse por nanopartículas por ejemplo, puntos cuánticos de carbono (CD), nanopartículas de oro (AuNPs), de sílice mesoporoso (MNP) entre otras, que son conjugadas con algún agente terapéutico (por ejemplo, cisplatino) y una proteína específica (anticuerpo, fragmento de anticuerpo, sdAbs, péptido entre otros) a un biomarcador tumoral (por ejemplo, HER2) para el direccionamiento activo que permita realizar la liberación controlada del fármaco específicamente en células cancerígenas.

Los nanoacarreadores de fármacos son biocompatibles, fotoestables, de fácil funcionalización en su superficie y tienen emisión de color dependiente de la longitud de onda de excitación que se emplee (Feng et al., 2017). También han sido útiles en la administración de genes terapéuticos (L. Wang et al., 2014), fotosensibilizadores (Choi et al., 2014) y para imagenología del cáncer (M. Wang et al., 2017) empleando fluorescencia.

Previamente, el péptido C9P aislado por nuestro equipo de investigación reconoce al receptor HER2 y demostró especificidad a células SKBR3 (HER2+) y una mejor entrega inteligente de fármaco (Panikar et al., 2019). En el presente trabajo, se empleó el péptido C9P conjugado con fluoresceína (FITC) para demostrar el reconocimiento específico de células HER2+. Además, el péptido C9P fue conjugado con puntos cuánticos (CD) y cisplatino para generar un



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

nanosistema empleado para demostrar la entrega específica del fármaco en células HER2+, la penetración celular y la distribución heterogénea del receptor HER2 en células SKBR3. Esta estrategia de coadministración en un nanoterapéutico proporciona un prometedor sistema basado en CD para combatir la resistencia del cisplatino en el tratamiento del cáncer.

Metodología.

1.1 Modelado *in silico* del péptido C9P

Se analizó la estructura tridimensional del péptido C9P empleando el software PEP-FOLD3. A partir de PEP-FOLD3 se generaron varias estructuras. Se eligió el modelo con la mejor calidad basado en el valor de MAX Q, que es un criterio referido a la calidad del modelo seleccionado además, se consideró la precisión de la predicción y la conformidad con las restricciones de energía. La TM o Template Modeling score (puntuación de modelado de plantilla) se utilizó para evaluar la similitud estructural entre la estructura predicha y alguna estructura conocida (una plantilla). Una TM de 1 indicara que la estructura predicha es idéntica a la plantilla, lo que se puede considerar como una predicción acercada a la plantilla. La visualización de este modelo se realizó utilizando el software PyMOL (v2.0), que permite una representación gráfica tridimensional de la estructura. Tanto PEP-FOLD3 PyMOL son de libre acceso. Se seleccionó el modelo más estable con MAX Q y TM de 1.

1.2 Conjugación del péptido C9P con FITC

Se conjugaron 500 μg de C9P con FITC (1mg/mL) por conjugación activa mediada por EDC. Para ello se disolvió 1 mg de FITC en 1 mL de DMSO en un tubo y se protegió de la luz con papel de aluminio, después se almacenó en hielo. También se prepararon el tampón de conjugación MES (0.1 M, pH 4.5-5) y la solución de conjugación EDC (1 mg/1 mL). Posteriormente, a 115 μL (500 μg) de péptido, se le agregaron 500 μL de tampón de conjugación, 100 μL de solución de EDC y 25 μg de solución FITC. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se leyó a 493 nm y se verificó la emisión de FITC a 520 nm, este procedimiento se realizó antes y después de la conjugación con péptido C9P. Considerando que el péptido C9P tiene un posible sitio de unión con FITC, se estimó que la conjugación fue de en relación 1:1 y se empleó la concentración de péptido para los ensayos en cultivo celular.

1.3 Conjugación del péptido C9P con CD y cisplatino

La conjugación del péptido con CD se realizó por conjugación activa mediada por EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida hidrocloreuro) -NHS (N-hidroxisucinimida). Los CD fueron sintetizados por el grupo de trabajo del Dr. Elder de la Rosa (De la Rosa et al., 2020). Los CD, EDC, NHS, cisplatino se prepararon con PBS 1X a una concentración inicial de 1 mg/mL mientras que el péptido C9P se preparó a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En un tubo cónico de 10 mL para centrifuga se agregó 1 mL de CD y 1 mL de EDC. La solución se incubó a 300 rpm a

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, se agregó 1 mL de NHS y se incubó bajo las mismas condiciones, posteriormente se añadió 1 mL de C9P y se incubó nuevamente durante 2 h. El conjugado C9P-CD se concentró con un tubo de ultrafiltración 3 kDa empleando centrifugación. Los concentradores filtraron los componentes no conjugados quedando retenido el C9P-CD. Primero se realizó un prelavado de la cámara de muestra del concentrador con 1 mL de PBS 1X, y se centrifugó a 15,000 xg por 3 min a 4 °C. Posteriormente, se colocó 1 mL de la muestra de conjugación y se centrifugó a 15,000 xg por 2 min a 4 °C, repitiendo este paso 4 veces al tener 4 mL del conjugado. Después, se añadieron 2 mL de PBS 1X para intercambiar los amortiguadores, finalmente se obtuvo 1 mL total del conjugado C9P-CD.

Después, C9P-CD se conjugó con cisplatino por EDC siguiendo la metodología descrita en la conjugación con fluoresceína. El exceso de cisplatino se descartó mediante centrifugación en tubo concentrador de

ultrafiltración de 3 kDa siguiendo la metodología descrita anteriormente. Se obtuvo 1 mL del nanoterapéutico C9P-CD-Cisplatino. Se cuantificó por Micro BCA la concentración de péptido antes y después de la conjugación, comparando con la curva estándar sugerida por el fabricante.

1.4 Análisis de viabilidad celular

Se seleccionaron las líneas celulares adherentes U87 y SKBR3 que son positivas a la presencia del receptor HER2, así como las células HBEC para emplearlas como control negativo. Los medios de cultivo y las especificaciones para su crecimiento se establecieron a partir de la información brindada en el ATCC (American Type Culture Collection: <https://www.atcc.org/>). Se cultivaron en frasco para cultivo celular rectangular de cuello inclinado de 25 cm² (T25). En la Tabla 1, se indican las características principales de cultivo y la intensidad en la expresión del receptor HER2.

Tabla 1: Especificaciones para el cultivo celular

Línea celular	Morfología	Medio de cultivo	Receptores
U87	Células epiteliales de glioblastoma	DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) alto en glucosa + SFB 10% (Suero Fetal Bobino) + antibiótico 1%	+HER2
SKBR3	Células epiteliales de adenocarcinoma de mama	McCoy's 5a + SFB 10% + antibiótico 1%	+++HER2
HBEC	Células del endotelio microvascular cerebral	DMEM F12 + SFB 10% + antibiótico 1%	-HER2

+HER2: expresión de HER2, +++HER2: sobreexpresión de HER2, -HER2: negativo a HER2

Una vez que alcanzaron un nivel de confluencia superior al 95% con viabilidad celular superior al 95%, las células se tripsinizaron y 100,000 células fueron sembradas por duplicado en cámaras de cultivo celular de 8 pocillos para posterior análisis

microscópico. A las 24 h de incubación, se agregaron 2 µL de la solución del péptido C9P-FITC por duplicado y en cada una de las líneas celulares evaluadas. Para un segundo análisis, sólo se emplearon las células SKBR3, agregando un total de



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



2 μ L del nanosistema terapéutico completo (C9P-CD-Cisplatino) y los controles de conjugación a punto cuántico (C9P-CD) y de péptido conjugado a fluoresceína (C9P-FITC) después de 24 h de incubación en condiciones estándar. Las concentraciones se igualaron a \sim 500 μ g/mL. Este análisis se realizó por duplicado.

Después de 24 h de incubación, se sustituyó en cada pacillo el volumen contenido por el mismo volumen de paraformaldehído al 4% y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente (TA), y luego se volvió a sustituir el contenido por etanol al 50% y se incubó por 30 segundos. Posteriormente, se lavó tres veces con PBS 1X pH 7.4, se secó a TA. Los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (1 mg/mL) durante 1 min.

Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS 1X, las cámaras de cultivo se secaron a TA y se les colocó el cubreobjeto. El análisis de la especificidad del péptido C9P conjugado con FITC se realizó en un microscopio confocal Leica modelo DM5500-Q del CIATEJ, teniendo en cuenta los diferentes rangos de excitación/emisión de los fluorocromos utilizados (Tabla 2). El análisis de las células SKBR3 con los nanosistemas terapéuticos, C9P-CD-Cisplatino, C9P-CD y C9P-FITC se realizó por microscopía de fluorescencia (Leica DMI1). Las imágenes se obtuvieron por el modo secuencial, para evitar la interferencia del fondo y se analizaron con Leica LasX Software.

Tabla 2: Rangos de excitación/emisión de los fluorocromos.

Fluorocromos	Longitud de onda de absorción (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)
Fluoresceína (FITC)	496	516
Rodamina (TRITC)	540	565
Yoduro de propidio	535	617

1.5 Ensayo en células

El ensayo de Alamar Blue comúnmente se ha utilizado para estudios de viabilidad celular y citotoxicidad, se basa en la detección colorimétrica de la actividad del metabolismo celular a través del reactivo resazurina, que también permite monitorear el entorno reductor de las células vivas. Para este ensayo, se tomaron 5,000 células (100 μ L) de la línea celular SKBR3 (HER2+) cultivadas en frascos de cultivo T25, con viabilidad de 97% y se sembraron en placas de 96 pocillos. A las 24 h, se colocaron por triplicado 50 ng/ μ L de cada uno de los nanosistemas diseñados: 1)

C9P-CD-Cisplatino, como nanosistema terapéutico completo, 2) C9P-CD, como nanosistema sin fármaco, 3) Cisplatino libre como control de muerte celular. Además, se empleó DMSO 20% como control positivo de muerte celular. La concentración de cisplatino empleado corresponde a la DL25 (50 μ g/mL). Después de 24 h de incubación a 37 °C, atmósfera húmeda al 80%, CO₂ 5%, se agregó resazurina a un 10% a cada pozo y se incubó por 4 h. Resazurina actúa como un aceptor de electrones en la cadena de transporte de electrones, sin interrumpir la transferencia normal de electrones. Tan pronto

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

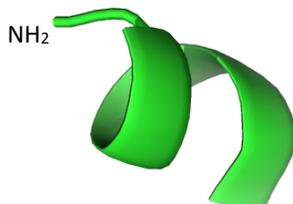
como acepta electrones, se reduce a color rosa, resultando en resorufina fluorescente. El cambio en el estado reducido se puede mediante la absorbancia a las longitudes de onda de 570 y 600 nm.

Para el análisis de los datos y comparación entre grupos se hizo un Anova de una vía seguida de una prueba de Dunnett en el software GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

Resultados y Discusión

El modelo estructural del péptido C9P fue seleccionado considerando el modelo más preciso y cercano al modelo de plantilla (MAX Q y TM de 1) para analizar los aminoácidos disponibles con grupos amino para realizar la conjugación con el fluoróforo FITC, con CD y cisplatino. Como se muestra en la Figura 1a, el péptido tiene estructura de alfa hélice y en Figura 1b se muestran las características fisicoquímicas del péptido C9P con un peso molecular de 885 Da, un punto isoeléctrico de 7.85, que se encuentra cercano a un pH fisiológico, además, un índice alifático de 111 que puede asociarse a termoestabilidad.

A)



B)

Característica	Resultado <i>in silico</i>
Peso molecular	885.044 Da
Punto isoeléctrico	7.85
Índice alifático	111.429

Figura 1. Análisis *in silico* del péptido C9P. A) Modelo del péptido C9P visualizado por PyMol. B) Tabla características fisicoquímicas del péptido C9P obtenidas con el software CLC DNA Workbench.

Después, el péptido C9P se conjugó con isocianato de fluoresceína (FITC) debido a que este es uno de los fluoróforos más utilizados en la inmunofluorescencia y citometría de flujo, ya que se puede acoplar a distintos anticuerpos con la ayuda de su grupo isotiocianato reactivo, que se une a los grupos amino, sulfhidrilo, imidazoilo, tirosilo o carbonilo. Igualmente, la conjugación activa mediada por EDC es recomendada debido a que se utiliza para preparaciones de inmunocombinados,

entrecruzamiento de proteínas con ácidos nucleicos y síntesis de péptidos ya que activa el extremo carboxílico del aminoácido para el acoplamiento de aminas primarias, resultando en la formación de un enlace amida (Rizvi et al., 2014). Debido a que sólo se añadió la concentración mínima necesaria de péptido con un exceso de CD (500 µg), el exceso de FITC no unido pasó a través de la membrana del tubo de ultrafiltración. Después de la filtración, la muestra (C9P-FITC) brillaba con un color verde intenso al

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

exponerla a una luz UV (335 nm) lo que indica el éxito en la conjugación. Varios estudios utilizan este método de conjugación para péptidos, por ejemplo, Liu et al., 2012 conjugaron covalentemente un péptido HER2 a microesferas magnéticas monodispersas incrustadas en SiO₂ a través de una reacción mediada por EDC (Liu et al., 2012).

Las células U87 y SKBR3 fueron positivas a la presencia del receptor HER2 pues existe

reconocimiento del péptido C9P-FITC. Sin embargo, en las células U87 el receptor HER2 no se encuentra sobreexpresado como en las células SKBR3. En cambio, en las células HBEC (control negativo) no se observa la detección de HER2 por C9P-FITC (Figura 2). Lo anterior confirma la sobreexpresión de HER2 en SKBR3 y la especificidad del péptido (Panikar et al., 2019).

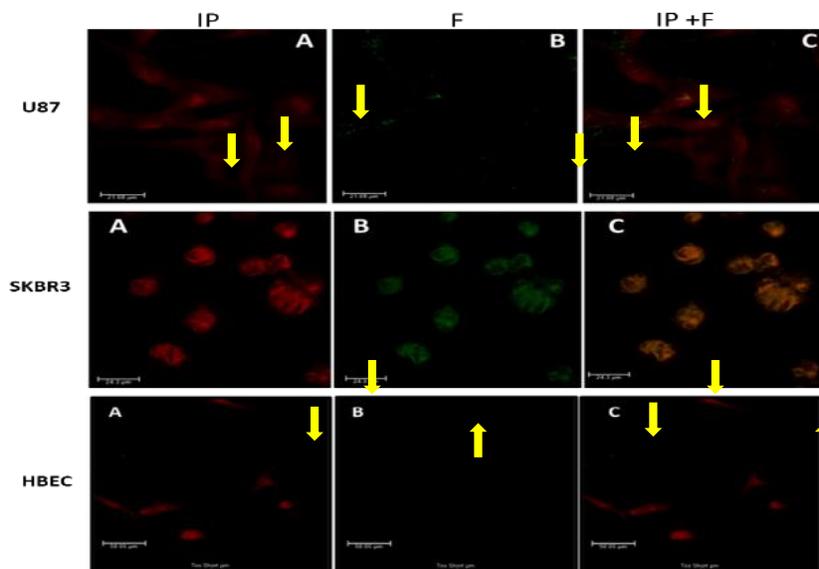


Figura 2. Microscopía confocal de células (40X). En la figura se pueden observar los núcleos marcados con yoduro de propidio (rojo) y el péptido C9P conjugado con fluoresceína (verde). IP: yoduro de propidio, F: fluoresceína. Con flechas amarillas se resaltan los puntos de fluorescencia detectados por la fluorescencia del C9P-FITC.

Según se ha reportado HER2 se expresa hasta en el 80% de los casos de glioblastoma impactando en su malignidad y en la mortalidad temprana de los pacientes (Shen et al., 2019), específicamente, específicamente, en la línea celular U87 se ha reportado la expresión del receptor (Li et al., 2022; Shen et al., 2019).

HER2 como un objetivo anticancerígeno se ha estudiado durante mucho tiempo. Su sobreexpresión juega un papel importante en la patogénesis y progresión del cáncer de mama y otros. Diversos investigadores buscan establecer una administración eficaz y confiable de fármacos, por lo que han desarrollado formulaciones de liposomas decorados con péptido anti-HER2 cargados con doxorubicina



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

(DOX), donde han evaluado la captación celular en las células SKBR3 debido a que estas sobreexpresan HER2 (Zahmatkeshan et al., 2016).

Igualmente, las técnicas de imagen por tomografía por emisión de positrones se encuentran actualmente en ensayos clínicos para un enfoque de diagnóstico de cuerpo completo no invasivo. Aunque los anticuerpos tienen una fuerte especificidad para las lesiones positivas para HER2, se ha demostrado que los péptidos permiten un tiempo más corto desde la inyección hasta la obtención de imágenes y se puede utilizar con isótopos de vida más corta, lo cual podría disminuir la toxicidad. Los péptidos que muestran especificidad para HER2 podrían comenzar a generalizar el desarrollo de técnicas de imagen molecular para cánceres HER2 positivos (Ducharme and Lapi, 2020).

El péptido C9P demostró alta especificidad al receptor HER2, tanto en las células que sobreexpresan el receptor como en aquellas que presentan una baja expresión (SKBR3 vs U87). Para confirmar la entrega de cisplatino en células HER2+, se empleó el nanoterapéutico C9P-CD-Cisplatino por 24 h en las células SKBR3, el resultado se analizó por microscopía de fluorescencia. En el mismo ensayo, se observaron vesículas apoptóticas en las células a las que se le añadió el nanosistema terapéutico completo (C9P-CD-Cisplatino). En cambio, no se observaron estas estructuras en las células tratadas con C9P-CD y C9P-FITC. Ganji, *et al.*, previamente reportó la dosis letal media de cisplatino en las células SKBR3 ($DL_{50}=8 \mu\text{g/mL}$) conjugado a nanopartículas de oro (AuNPs)

(Ganji et al., 2021). Teniendo en cuenta este dato, para los ensayos in vitro se empleó una $DL_{50}=5 \mu\text{g/mL}$ para los diferentes nanosistemas.

Estos resultados soportan la hipótesis de una conjugación eficiente del fármaco y un direccionamiento óptimo del mismo al núcleo celular asociado al direccionamiento activo del péptido C9P (Figura 3). Se ha reportado que los CD tienen gran potencial en el campo de la quimioterapia dirigida y se han explorado ampliamente para la imagenología, así como en la detección y la terapia debido a su alto rendimiento cuántico (entendido como la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas), baja citotoxicidad, alta solubilidad en agua, buena fotoestabilidad (Dubey et al., 2023). Los CD se han conjugado de manera eficiente con varios medicamentos contra el cáncer como doxorubicina (DOX), protoporfirina IX (PpIX), 5-fluorouracilo, curcumina, gemcitabina, metotrexato (MTX), oxaliplatino y cisplatino (Dubey et al., 2023). Por ejemplo, Dubey et al., 2023 planteó que el conjugado de CDs-fármaco se puede liberar específicamente de manera dirigida mediante el uso de ligandos, y que estos sistemas de administración de fármacos pueden mejorar la eficacia y reducir los efectos secundarios de los tratamientos contra el cáncer. Por otro lado, Feng et al., en el 2016 obtuvieron excelentes resultados al desarrollar CD's para desencadenar la administración de un pro-fármaco de cisplatino (IV) a los tumores a través del medio extracelular circundante y utilizando el péptido de



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

ácido arginil-glicil-aspartico (RGD) como ligando de direccionamiento activo (Feng et al., 2016) y reducir los efectos secundarios de los tratamientos contra el cáncer.

En nuestro ensayo de viabilidad, se estableció un grupo control que representa la condición estándar o de referencia en el experimento y la supervivencia celular en este grupo fue del 100% (Figura 4). Por otro lado, en el grupo tratado con el nanoterapéutico completo C9P+CD+Cisplatino se observó una disminución significativa en la supervivencia celular, ya que solo el 31% de las células sobrevivieron, en cambio, el grupo tratado con C9P-CD donde la supervivencia celular fue del 100%, lo que indica que no hubo diferencias significativas entre este último grupo y el grupo control. Basándose en estos resultados, se puede concluir que la combinación del nanoterapéutico completo C9P+CD+Cisplatino fue citotóxico disminuyendo la supervivencia celular en comparación con el grupo de control y el grupo C9P-CD. Además, existe diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia entre el grupo C9P-CD-Cisplatino y el grupo C9P-CD, lo que indica que el nanosistema C9P-CD-Cisplatino es más eficiente al eliminar células a una DL_{50} de 8 $\mu\text{g/mL}$ previamente reportada Ganji et al., 2021.

Los resultados obtenidos en la presente investigación evidencian que el empleo de los nanoacarreadores de fármacos permiten una excelente absorción por parte de las células cancerosas. En nuestro caso, el nanoterapéutico (C9P-CD-Cisplatino) es eficiente asociado a la interacción del péptido C9P con el

receptor HER2. Después, de ser absorbido por las células cancerosas, el cisplatino tuvo efecto citotóxico en el citoplasma y esto se puede corroborar con los resultados de los experimentos de viabilidad celular, donde las células en las que se empleó el nanosistema C9P-CD-Cisplatino mostraron que la captación aumentó lo que pudiera permitir una mayor efectividad en tratamiento de pacientes de cáncer de mama.

Estos resultados constituyen una primera aproximación a la eficacia de los nanoterapéuticos contra células HER2 positivas, demostrando que, aunque aún son necesarios más estudios enfocados en la caracterización de la acción biológica, eficacia y bioseguridad del nanoacarreador, este sigue siendo una alternativa prometedora dentro de la terapia actual.

Conclusiones.

El péptido C9P demostró especificidad y unión al receptor HER2 tanto en el análisis *in silico* como *in vitro*. Adicionalmente, se puede conjugar con FITC sin perder especificidad, demostrando la versatilidad de péptidos de 7 aminoácidos para ser empleados como acarreadores activos de diversas moléculas, por ejemplo, fármacos. Una ventaja adicional es que C9P-FITC logró detectar al receptor HER2 tanto en células que sobreexpresan el receptor (por ejemplo, SKBR3) y en células que lo expresan en menor cantidad (U87). Adicionalmente, el nanoterapéutico diseñado (C9P-CD-Cisplatino) demostró la entrega del fármaco cisplatino en células SKBR3 como resultado el daño nuclear. Estos resultados demuestran que el péptido



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

C9P constituye una alternativa prometedora contra HER2 que podrían impactar en el diagnóstico y ser una opción en la terapéutica del cáncer de mama HER2+.

Agradecimientos. Al CONACYT y al Laboratorio Nacional PlanTECC por el apoyo número 315918.

Referencias bibliográficas

Ai, X., Ho, C. J. H., Aw, J., Attia, A. B. E., Mu, J., Wang, Y., Wang, X., Wang, Y., Liu, X., & Chen, H. (2016). In vivo covalent cross-linking of photon-converted rare-earth nanostructures for tumour localization and theranostics. *Nature communications*, 7(1), 10432.

Altunay, B., Morgenroth, A., Beheshti, M., Vogg, A., Wong, N. C., Ting, H. H., Biersack, H.-J., Stickeler, E., & Mottaghy, F. M. (2021). HER2-directed antibodies, affibodies and nanobodies as drug-delivery vehicles in breast cancer with a specific focus on radioimmunotherapy and radioimmunoimaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 48(5), 1371-1389.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.

Choi, Y., Kim, S., Choi, M. H., Ryoo, S. R., Park, J.,

Min, D. H., & Kim, B. S. (2014). Highly biocompatible carbon nanodots for simultaneous bioimaging and targeted photodynamic therapy in vitro and in vivo. *Advanced Functional Materials*, 24(37), 5781-5789.

De la Rosa, E., Ramírez, G., Panikar, S., Camacho, T., Salas, P. S., & López-Luke, T. (2020). Algunas aplicaciones de la nanofotónica en la biomedicina. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 13(24), 1e-24e.

Dubey, N., Dhiman, S., & Koner, A. L. (2023). Review of Carbon Dot-Based Drug Conjugates for Cancer Therapy. *ACS Applied Nano Materials*, 6(6), 4078-4096.

Ducharme, M., & Lapi, S. E. (2020). Peptide based imaging agents for HER2 imaging in oncology. *Molecular Imaging*, 19, 1536012120960258.

Feng, T., Ai, X., An, G., Yang, P., & Zhao, Y. (2016). Charge-convertible carbon dots for imaging-guided drug delivery with enhanced in vivo cancer therapeutic efficiency. *ACS nano*, 10(4), 4410-4420.

Feng, T., Chua, H. J., & Zhao, Y. (2017). Reduction-responsive carbon dots for real-time ratiometric monitoring of anticancer prodrug activation in living cells. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(8), 1535-1541.

Feng, T., Chua, H. J., & Zhao, Y. (2018). Carbon-dot-



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

mediated Co-administration of chemotherapeutic agents for reversing cisplatin resistance in cancer therapy. *ChemNanoMat*, 4(8), 801-806.

Ganji, M., Dashtestani, F., Neghab, H. K., Soheilifar, M. H., Hakimian, F., & Haghirsadat, F. (2021). Gold nanoparticles conjugated L-lysine for improving cisplatin delivery to human breast cancer cells. *Current Drug Delivery*, 18(6), 753-760.

Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic chemistry*, 88, 102925.

Giugliano, F., Carnevale Schianca, A., Corti, C., Ivanova, M., Bianco, N., Dellapasqua, S., Criscitiello, C., Fusco, N., Curigliano, G., & Munzone, E. (2023). Unlocking the Resistance to Anti-HER2 Treatments in Breast Cancer: The Issue of HER2 Spatial Distribution. *Cancers*, 15(5), 1385.

Honarvar, H., Calce, E., Doti, N., Langella, E., Orlova, A., Buijs, J., D'Amato, V., Bianco, R., Saviano, M., & Tolmachev, V. (2018). Evaluation of HER2-specific peptide ligand for its employment as radiolabeled imaging probe. *Scientific reports*, 8(1), 2998.

Li, C., Lin, Q., Hu, F., Bao, R., Cai, H., & Gu, Y. (2022). Based on lapatinib innovative near-infrared fluorescent probes targeting HER1/HER2 for in vivo tumors imaging. *Biosensors and Bioelectronics*, 214, 114503.

Liu, Z., Duan, J.-H., Song, Y.-M., Ma, J., Wang, F.-D.,

Lu, X., & Yang, X.-D. (2012). Novel HER2 aptamer selectively delivers cytotoxic drug to HER2-positive breast cancer cells in vitro. *Journal of translational medicine*, 10, 1-10.

Pallerla, S., Comeau, J., & Jois, S. (2021). Cancer vaccines, treatment of the future: With emphasis on her2-positive breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 779.

Panikar, S. S., Ramírez-García, G., Vallejo-Cardona, A. A., Banu, N., Patrón-Soberano, O. A., Cialla-May, D., Camacho-Villegas, T. A., & de la Rosa, E. (2019). Novel anti-HER2 peptide-conjugated theranostic nanoliposomes combining NaYF₄: Yb, Er nanoparticles for NIR-activated bioimaging and chemo-photodynamic therapy against breast cancer. *Nanoscale*, 11(43), 20598-20613.

Ramos-Herrera, I. M., Reyna-Sevilla, A., González Castañeda, M. E., Robles-Pastrana, J. D., Herrera-Echauri, D. D., & González-Rivera, C. A. (2020). Cáncer de mama en Jalisco. Análisis espacial de la mortalidad en 2010-2017. *Gaceta médica de México*, 156(6), 542-548.

Rhodes, K. R., & Green, J. J. (2018). Nanoscale artificial antigen presenting cells for cancer immunotherapy. *Molecular immunology*, 98, 13-18.

Rizvi, S. B., Rouhi, S., Taniguchi, S., Yang, S. Y., Green, M., Keshtgar, M., & Seifalian, A. M. (2014).



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Near-infrared quantum dots for HER2 localization and imaging of cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1323.

Shen, L., Li, H., Bin, S., Li, P., Chen, J., Gu, H., & Yuan, W. (2019). The efficacy of third generation anti-HER2 chimeric antigen receptor T cells in combination with PD1 blockade against malignant glioblastoma cells. *Oncology reports*, 42(4), 1549-1557.

Tchounwou, P. B., Dasari, S., Noubissi, F. K., Ray, P., & Kumar, S. (2021). Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. *Journal of experimental pharmacology*, 303-328.

Wang, L., Wang, X., Bhirde, A., Cao, J., Zeng, Y., Huang, X., Sun, Y., Liu, G., & Chen, X. (2014). Carbon dots based two-photon visible nanocarriers for safe

and highly efficient delivery of siRNA and DNA. *Advanced healthcare materials*, 3(8), 1203.

Wang, M., Zhang, K., Dai, X.-X., Li, Y., Guo, J., Liu, H., Li, G.-H., Tan, Y.-J., Zeng, J.-B., & Guo, Z. (2017). Enhanced electrical conductivity and piezoresistive sensing in multi-wall carbon nanotubes/polydimethylsiloxane nanocomposites via the construction of a self-segregated structure. *Nanoscale*, 9(31), 11017-11026.

Zahmatkeshan, M., Gheybi, F., Rezayat, S. M., & Jaafari, M. R. (2016). Improved drug delivery and therapeutic efficacy of PEGylated liposomal doxorubicin by targeting anti-HER2 peptide in murine breast tumor model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 125-135.