



**Evaluación de aptámeros con afinidad por receptores de barrera  
hematoencefálica conjugados a la enzima Alfa-N-acetilglucosaminidasa**

**Andrés Ordóñez Rojas**

**Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Microbiología Industrial  
Bogotá D.C.  
2021**

**Evaluación de aptámeros con afinidad por receptores de barrera hematoencefálica  
conjugados a la enzima Alfa-N-acetilglucosaminidasa**

**Andrés Ordóñez Rojas**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Microbiólogo Industrial**

**Carlos Javier Alméciga Díaz, QF., PhD.**

Director

**Angela Johana Espejo Mojica, Míc. Ind., PhD.**

Codirectora

**Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM)**

**Pontificia Universidad Javeriana**

**Facultad de Ciencias**

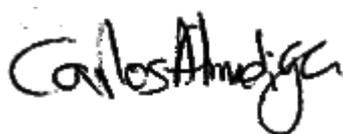
**Microbiología Industrial**

**Bogotá D.C.**

**2021**

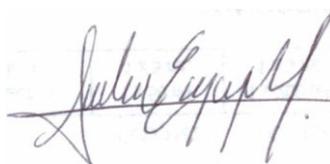
**Evaluación de aptámeros con afinidad por receptores de barrera hematoencefálica  
conjugados a la enzima Alfa-N-acetilglucosaminidasa**

**Andrés Ordóñez Rojas**



---

**Carlos Javier Alméciga Díaz, QF., PhD.**  
Director



---

**Angela Johana Espejo Mojica, Mic. Ind., PhD.**  
Codirectora



---

**Sol Milena Mejía Chica, Quím., PhD.**  
Evaluadora



---

**Marcela Franco Correa, Mic., PhD.**  
Directora  
Programa de Microbiología Industrial

**Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Microbiología Industrial  
Bogotá D.C.  
2021**



**Artículo 23 de la resolución N°.13 de julio de 1946**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo por buscar verdad y justicia”

**Agradecimientos**

Llegar a este momento, el de escribir los agradecimientos, no es particularmente sencillo. Pensaba aquí expresar unas pocas palabras, pero parece que me extenderé un poco. Me gustaría agradecer a la vida, misma vida que mi madre me dio. Vida que gracias al incansable esfuerzo y sacrificio de mi madre, hoy presenta a ustedes el culminar de una etapa.

No sería sensato de mi parte no presentar aquí mi agradecimiento al profesor Javier, quien como docente de biología molecular me inspiró y es gracias a sus enseñanzas que hoy culminó mi carrera. A la profesora Angela, quién me escuchó en los momentos difíciles, quien me dio sus palabras de apoyo y motivación que en su momento cambiaron mi perspectiva, palabras que me dejaron pensando. Agradezco a todos y cada uno de los integrantes del instituto que de una u otra forma hicieron posible esta experiencia de aprendizaje y aproximación al mundo de la investigación.

Finalmente quiero dedicarte este último párrafo a ti, gracias por cambiarme la vida. Gracias por cada día motivarme a ser mi mejor versión, por cada momento juntos. Momentos buenos y malos que hoy significan mucho, que significan todo. Tuvo que ocurrir una pandemia para que el destino nos pusiera en el camino. Gracias novia mía por cada amanecer.

## Listado de Figuras

- Figura 1.** Se destacan las enzimas deficientes involucradas en los diferentes subtipos de MPS III. Adicionalmente, el recuadro naranja señala el paso en el que NAGLU está involucrada en la degradación de la cadena de glicosaminoglicanos heparán sulfato. NAc, N-acetilo;  $\text{SO}_3^-$ , sulfato.....4
- Figura 2.** La estructura terciaria de NAGLU tiene tres dominios distintos. El dominio uno (cian) es un dominio pequeño  $\alpha / \beta$  ubicado en la parte inferior del bolsillo catalítico con una hoja  $\beta$  de dos hebras insertada entre el dominio catalítico dos (púrpura) y el dominio helicoidal tres (rosa). Los glutamatos catalíticos, E316 y E446 y los glicanos están representados como barras grises y verdes, respectivamente.....6
- Figura 3.** Predicción de estructura 2D. A) Aptámero TfRA4 con su respectiva energía plegamiento. B) Aptámero GL21.T y su energía de plegamiento predicha. C) Aptámero RNV-L7 con su energía de plegamiento predicha. En la parte inferior de cada modelo se observa una representación de puntos y paréntesis de la estructura secundaria.....17
- Figura 4.** Predicción de estructura 3D de los aptámeros seleccionados. Las estructuras de los aptámeros de ADN fueron corregidas haciendo el cambio de U a T y modificando los azúcares.....18
- Figura 5.** Esquema de reacción de dos pasos para conjugar anticuerpos y proteínas enzimáticas con Sulfo-SMCC. El reticulante se hace reaccionar primero con NAGLU para producir una proteína activada por maleimida. Después de eliminar el exceso de reticulante sin reaccionar y los subproductos, la proteína activada con maleimida se hace reaccionar con la proporción molar apropiada del aptámero que tiene grupos sulfhidrilo. Por lo general, se producen varias o múltiples activaciones de maleimida por molécula de proteína, lo que permite conjugar varias moléculas de enzima con cada molécula de anticuerpo.....19
- Figura 6.** Construcción de las quimeras, en verde la estructura cristalográfica de NAGLU. A) NAGLU-TfRA4. B) NAGLU-GL21.T. C) NAGLU-RNV-L7. Los valores tanto de  $T_m$  como de RMSD indican variaciones estructurales que no comprometen la identidad del componente proteico de la quimera.....19
- Figura 7.** Posiciones de docking para los sustratos 4MUG y HS para los modelos de quimera y proteína nativa. En rojo se señalan los glutamatos catalíticos 316 y 446.....20
- Figura 8.** Cociente de afinidad entre las quimeras y NAGLU nativa en función de los sustratos 4MUG y HS. Los valores de afinidad son reportados como veces contra los valores predichos para cada sustrato acoplado con la proteína NAGLU nativa.....21
- Figura 9.** Acoplamiento molecular aptámero-receptor realizado en el servidor HDOCK. Para cada acoplamiento se obtuvo un valor, de izquierda a derecha, de *Docking Score* de -245,57, -269,52 y -237,86, respectivamente.....23
- Figura 10.** Docking quimera-receptor realizado en HDOCK. Para cada docking se obtuvo un valor de *Docking Score*, de izquierda a derecha, de -122.35, -105.46 y -130.71, respectivamente.....23
- Figura 11.** Actividades volumétricas y específicas de las diferentes etapas del proceso de conjugación. La actividad enzimática volumétrica y específica al inicio del proceso fue de  $0,6 \pm 0,03$  U/mL y  $2,53 \pm 0,14$  U/mg. Al final del proceso se obtuvieron valores de actividad volumétrica y específica de  $0,03 \pm 0,01$  U/mL y  $0,36 \pm 0,04$  U/mg.....24

## Listado de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Aptámeros reportados como potenciales para el cruce a través de barrera hematoencefálica, comunes a la búsqueda y al artículo de revisión.....	<b>13</b>
<b>Tabla 2.</b> Secuencias de los aptámeros escogidos, se muestra la secuencia original y la secuencia que se introdujo al servidor IsRNA 2DVFold.....	<b>17</b>
<b>Tabla 3.</b> Interacciones presentes en los modelos. Se muestran las interacciones de cada modelo con los respectivos sustratos, predominan las interacciones de tipo hidrofóbico.....	<b>21</b>
<b>Tabla 4.</b> Verificación de conjugación en NanoDrop. Se obtuvo la relación 260/280 para ADN de cadena sencilla, donde el conjugado arrojó un valor de 1,19 y el control negativo de conjugación presentó un valor de 1,16.....	<b>25</b>

## Tabla de contenido

1.	Introducción.....	1
2.	Planteamiento del problema y justificación.....	2
3.	Marco teórico .....	2
3.1.	Errores innatos del metabolismo.....	2
3.2.	Enfermedades de depósito lisosomal.....	3
3.2.1.	Mucopolisacaridosis III (MPS III) .....	3
3.2.2.	Mucopolisacaridosis IIIB (MPS IIIB) .....	5
3.2.3.	NAGLU recombinante.....	6
3.2.4.	Terapia de reemplazo enzimático .....	7
3.2.5.	Aptámeros como estrategia de entrega a través de barrera hematoencefálica...8	
3.2.6.	Acoplamiento (docking) molecular .....	9
4.	Objetivo General .....	9
4.1.	Objetivos específicos .....	9
4.1.1.	Seleccionar aptámeros previamente descritos como potenciales candidatos para reconocer receptores que permitan cruzar la barrera hematoencefálica.....	9
4.1.2.	Predecir <i>in silico</i> el efecto que tienen los conjugados aptámero-NAGLU sobre la afinidad a los sustratos HS y 4MUG, y su interacción con los respectivos receptores.....	9
4.1.3.	Evaluar <i>in vitro</i> el efecto de la conjugación aptámero-NAGLU sobre la actividad enzimática de NAGLU recombinante producida en <i>K. phaffii</i> . .....	9
5.	Metodología .....	9
5.1.	Búsqueda de los aptámeros .....	9
5.2.	Interacción conjugados-sustratos <i>in silico</i> .....	10
5.2.1.	Modelos .....	10
5.2.2.	Acoplamiento molecular.....	10
5.3.	Producción de NAGLU recombinante humana (rhNAGLU) a escala de 400 mL 11	
5.4.	Clarificación y concentración del extracto crudo .....	11
5.5.	Cuantificación de proteína total por BCA .....	12
5.6.	Determinación de actividad enzimática.....	12
5.7.	Conjugación de aptámeros .....	12
6.	Resultados.....	13
6.1.	Búsqueda de los aptámeros .....	13
6.1.1.	Aptámero A15 .....	14
6.1.2.	Aptámeros C2.min y Waz .....	14
6.1.3.	Aptámeros DW4, TfRA4 y TEPP .....	15
6.1.4.	Aptámero GL21.T .....	15
6.1.5.	Aptámero Gint4.T .....	16
6.1.6.	Aptámero GL56.....	16
6.1.7.	Aptámero RNV-L17.....	16
6.2.	Obtención de modelos.....	17
6.2.1.	Predicción de las estructuras 2D y 3D de los aptámeros. ....	17
6.2.2.	Construcción computacional de las quimeras.....	18
6.3.	Acoplamiento molecular.....	20
6.3.1.	Quimeras-sustratos.....	20
6.3.2.	Quimeras-receptores .....	22

6.4.	Conjugación de aptámeros .....	24
7.	Discusión .....	25
8.	Conclusiones .....	27
9.	Bibliografía.....	27
10.	Anexos.....	32

## Resumen

La mucopolisacaridosis tipo IIIB (MPS III), también llamada síndrome de Sanfilippo tipo B, es un desorden de depósito lisosomal que causa una degeneración sistémica, afectando en gran medida el sistema nervioso central (SNC). La deficiencia enzimática en esta enfermedad es causada por mutaciones en el gen *NAGLU*, el cual codifica para la enzima alfa-N-acetilglucosaminidasa (NAGLU, EC: 3.2.1.50), una de las cuatro enzimas encargadas de la degradación del heparán sulfato (HS), provocando su acumulación en lisosoma. Como modelo de tratamiento, se ha propuesto la terapia de reemplazo enzimático (TRE) que permite la reducción del sustrato acumulado a través del suministro de proteínas recombinantes. Este modelo de terapia ha sido aprobado para 11 enfermedades lisosomales.

La enzima NAGLU recombinante ha sido producida de forma exitosa en células de ovario de hámster chino (CHO) y recientemente, en nuestro laboratorio usando la levadura *Komagataella phaffii* GS115 como sistema de expresión. La primera aproximación reveló que la proteína producida era pobre en residuos de manosa-6-fosfato (M6P), esto se tradujo en una limitada captación celular. En el caso de la proteína producida en *K. phaffii*, a pesar que no se tiene la información detallada del perfil de glicosilación para esta proteína recombinante, se ha demostrado que es internalizada por las células y reduce la masa lisosomal en células de pacientes MPSIIIB. Sin embargo, teniendo en cuenta que la mayor dificultad del uso de esta proteína recombinante en una TRE de administración intravenosa sería su paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE), este trabajo propone el uso de aptámeros, ácidos nucleicos capaces de reconocer dianas específicas, como una estrategia para dicho propósito. Inicialmente se identificaron 10 aptámeros como posibles aptámeros candidatos a cruzar la BHE y a partir de estos se seleccionaron: TfRA4, aptámero que reconoce el receptor de transferrina humana; GL21.T, aptámero que reconoce el receptor de tirosin quinasa Axl; y RNV-L17, aptámero que reconoce el receptor de LDL humano. Luego de obtener los modelos 3D de estos tres aptámeros y hacer la conjugación a NAGLU, se hicieron estudios de docking para evaluar los cambios en la afinidad de la proteína por los sustratos HS y 4-metilumbeliferil-2-acetamida-2-desoxi-alfa-D-glucopiranosido (4MUG). Dichos resultados sugirieron diferencias en la interacción de los aminoácidos circundantes al sitio activo y diferencias pequeñas en la afinidad de la enzima por los sustratos. Adicionalmente, se realizó el modelamiento de la interacción de los conjugados con sus respectivos receptores, prediciendo que la conjugación de los aptámeros con la enzima NAGLU podría disminuir la afinidad de los aptámeros por su receptor. Finalmente, se realizó la producción de la proteína NAGLU recombinante a escala de 400 mL durante 72 h. El extracto crudo presentó una actividad específica inicial de 2,53 U/mg, el cual fue usado para realizar la conjugación con TfRA4. Al final del proceso de conjugación, la actividad específica se redujo a 0,36 U/mg. La verificación de la conjugación fue realizada mediante espectrofotometría donde la relación 260/280 del conjugado tuvo un valor de 1,19; mientras que la del control negativo de conjugación tuvo un valor de 1,16, valores que no permitieron concluir sobre si la conjugación fue exitosa o no. Estos resultados sirven como línea base para futuros experimentos donde se planteen las condiciones de conjugación apropiadas que lleven a que la proteína no se vea afectada. Ahora bien, los esfuerzos por purificar la proteína deben continuar para así tener certeza sobre el efecto que tiene la conjugación de los aptámeros sobre la actividad enzimática de NAGLU.

## Abstract

Mucopolysaccharidosis IIIB (MPSIIIB), or Sanfilippo syndrome type B, is an autosomal recessive lysosomal storage disease caused by catalytic deficiency of the enzyme  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase (NAGLU, EC: 3.2.1.50). Such deficiency causes accumulation of the glycosaminoglycan heparan sulfate (HS) within the lysosome. In patients, central nervous system impairment predominates in addition to abnormalities peripheral organs and tissues. At present, there is no therapy approved for this disease. Enzyme replacement therapy (ERT) has been proposed as a model of therapy which allows the reduction of the substrate accumulated in the lysosome through the delivery of recombinant enzymes. This therapy model has been approved for 11 lysosomal diseases, by using enzymes produced in mammalian, plant, and chicken's eggs expression systems.

The recombinant NAGLU enzyme has been successfully produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells and recently, in our laboratory using the yeast *Komagataella phaffii* as an expression system. The first approach revealed that the protein produced was poor in mannose-6-phosphate (M6P) residues, which resulted in limited cellular uptake. In the case of the protein produced in *K. phaffii*, detailed information on the post-translational profile is not available, but a reduction in the lysosomal mass of MPSIIB patients was evidenced in addition to a cell uptake. However, since the major problem associated with this disease is the crossing through the blood-brain barrier, this work proposes the use of aptamers, nucleic acids capable of recognizing specific targets, as a strategy for such crossing.

Initially, potential aptamer candidates to cross the blood-brain barrier were identified, among which the following were selected: TfRA4, an aptamer that recognizes the human transferrin receptor; GL21.T, an aptamer that recognizes the Axl tyrosine kinase receptor; and RNV-L17, an aptamer that recognizes the human LDL receptor. After obtaining the 3D models of the aptamers and making the conjugation to NAGLU, docking studies were performed to evaluate the changes in the affinity of the protein for the substrates HS and 4-methylumbelliferyl-2-acetamide-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside (4MUG). These results predicted differences in the interaction of amino acids surrounding the active site, resulting in minimal differences in the affinity of the enzyme for the substrates. Later, it was predicted the interaction of conjugated aptamers with their receptors, suggestion that NAGLU conjugation may impair the receptor-aptamer interaction. Subsequently, an attempt was made to produce the protein in the laboratory at a 400 mL scale for 72 h and then conjugate it to TfRA4. At the end of the conjugation process, the specific activity was reduced to 0.36 U / mg. Verification of the conjugation was carried out by spectrophotometry where the 260/280 ratio of the conjugate had a value of 1.19; while that of the negative control of conjugation had a value of 1.16, values that did not allow to conclude on whether the conjugation was successful or not. These results serve as a baseline for future experiments where the appropriate conjugation conditions are proposed that lead to the protein being unaffected. However, efforts to purify the protein must continue in order to be certain about the effect that conjugation of aptamers has on the enzymatic activity of NAGLU.

## 1. Introducción

La mucopolisacaridosis tipo IIIB (MPS III), también llamada síndrome de Sanfilippo tipo B, es un desorden de depósito lisosomal que causa una degeneración sistémica del cuerpo humano, afectando en gran medida el sistema nervioso central (SNC). Esta enfermedad es causada por mutaciones en el gen *NAGLU* que codifica para la enzima alfa-N-acetilglucosaminidasa (NAGLU), una de las cuatro enzimas encargadas de la degradación del heparán sulfato (HS) (1).

En aras de establecer un modelo de tratamiento, la terapia de reemplazo enzimático se ha propuesto como una alternativa para tratar las enfermedades de depósito lisosomal. Esta terapia provee una enzima recombinante funcional que cataliza la degradación del sustrato acumulado en el lisosoma de las células deficientes de la enzima. Estas enzimas son producidas mediante tecnología de ADN recombinante, y la captura por parte de las células se hace principalmente a través de endocitosis mediada por receptores manosa-6-fosfato (M6PR) (1).

Aunque la terapia de reemplazo enzimático ha demostrado eficacia en la disminución de la concentración de glicosaminoglicanos (GAGs) en orina (2), este modelo no tiene un efecto considerable sobre la concentración de GAGs en el sistema nervioso central (SNC), dada la dificultad de entrada del terapéutico a través de la barrera hematoencefálica (BHE) (3). Para solventar este problema y no generar terapias invasivas, las investigaciones tanto en la enzima NAGLU, como en otras enzimas asociadas a enfermedades de depósito lisosomal con afectación de SNC, han optado por el suministro intravenoso de proteínas fusionadas con péptidos que reconozcan receptores de BHE (4, 5) para favorecer la internalización de la enzima al SNC a través de la BHE. Sin embargo, estas proteínas fusión potencialmente podrían desencadenar reacciones inmunes en el organismo (6, 7); por lo cual sería riesgoso administrar estos productos.

Teniendo en cuenta el auge de la biología sintética, se ha propuesto el uso de los aptámeros como una alternativa a la fusión con péptidos. Los aptámeros son secuencias cortas de nucleótidos monocatenarios que pueden unirse a proteínas de forma específica y con muy alta afinidad. Dichas secuencias de ADN o ARN no codificante se caracterizan por ser inertes inmunológicamente (8). Su tamaño y carácter altamente específico le permiten atravesar células y tejidos de manera más eficiente (9). Recientemente se ha demostrado la eficacia del uso de aptámeros en el tratamiento de enfermedades como el cáncer (10), en la disminución de compuestos organofosforados (11), y en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como las tautopatías (12) al cruzar eficientemente la BHE. De manera puntual, para el tratamiento de enfermedades lisosomales, se ha empleado el aptámero GS24 como una estrategia de internalización de la enzima alfa-L-iduronidasa, demostrando la disminución de GAGs en fibroblastos (13). Sin embargo, hasta el momento el uso de aptámeros no se ha evaluado como herramienta para el direccionamiento de la enzima NAGLU recombinante. En este sentido, el presente trabajo busca realizar una evaluación *in-silico* e *in-vitro* de aptámeros afines a proteínas de la BHE conjugados con la proteína NAGLU recombinante producida en la levadura *Komagataella phaffii* GS115.

## 50 2. Planteamiento del problema y justificación

51

52 La prevalencia en el mundo de las mucopolisacaridosis I, II, III y IV oscila entre 1,04 y 4,8  
53 por cada 100.000 neonatos (14). En Colombia, la prevalencia de la MPS III es de 0,17 por  
54 cada 100.000 nacidos vivos en el país (15). Sin embargo, para esta enfermedad no existe un  
55 tratamiento específico aprobado, por lo que aún es necesario continuar explorando opciones  
56 de tratamiento. En la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento, recientemente el  
57 Instituto de Errores Innatos del Metabolismo mostró la posibilidad de obtener la enzima  
58 NAGLU recombinante de forma activa en la levadura *K. phaffii* con potencial para ser  
59 empleada en el desarrollo de una TRE para la MPS IIIB. Sin embargo, el principal reto de  
60 esta estrategia radica en la necesidad de que la enzima recombinante alcance el SNC, para lo  
61 que se han empleado estrategias como la administración directa en cerebro o el uso de  
62 proteínas fusión (16). Una estrategia para permitir el paso de la proteína a través de la BHE  
63 es el uso de aptámeros. Estas moléculas de ADN han mostrado ser útiles para direccionar  
64 proteínas a determinados receptores y mediar así la endocitosis y transcitosis que faciliten  
65 captura celular (13). Sin embargo, el efecto de estos aptámeros sobre la estabilidad y  
66 direccionamiento de enzimas lisosomales a SNC, no ha sido ampliamente estudiado. De esta  
67 manera, el presente proyecto evaluó tanto *in silico* como *in vitro* el efecto de la conjugación  
68 aptámeros-enzimas lisosomales, empleando NAGLU recombinante producida en la levadura  
69 *K. phaffii*, como modelo para establecer las bases de una investigación más robusta alrededor  
70 del desarrollo de una terapia de reemplazo enzimático para la MPS IIIB que haga uso de  
71 aptámeros como una estrategia de entrega no invasiva en el cerebro.

72

## 73 3. Marco teórico

### 74 3.1. Errores innatos del metabolismo

75 Los errores innatos del metabolismo (EIM) son un amplio grupo de más de 1000  
76 enfermedades metabólicas congénitas, esencialmente de herencia autosómica recesiva,  
77 producto de mutaciones en genes codificantes de enzimas, transportadores y/o cofactores  
78 involucrados en el metabolismo de aminoácidos, lípidos, carbohidratos o ácidos nucleicos  
79 (17). Aunque de manera individual son raros, cuando se observa el panorama global, estos  
80 trastornos tienen una prevalencia de 50 por cada 100.000 nacimientos (18). En el país, estas  
81 enfermedades se agrupan dentro de las enfermedades huérfanas y presentan una incidencia  
82 menor a 1 por cada 5000 habitantes (15).

83

84 La manifestación de estas enfermedades puede darse desde el periodo neonatal hasta la edad  
85 adulta, y las sintomatologías pueden variar según su grado de severidad ya sea de forma  
86 crónica o aguda. Según las proteínas y/o metabolitos afectados, los EIM pueden abarcar uno  
87 o varios tejidos. Es así como los EIM pueden generar alteraciones en el corazón, hígado,  
88 bazo, riñón, piel o los sistemas visual, auditivo, esquelético, inmunológico, circulatorio y en  
89 algunos casos sobre el sistema nervioso central (19).

90

91 El diagnóstico temprano de los EIM es un requisito previo para un tratamiento eficaz, y la  
92 optimización del tratamiento también depende de una predicción precisa de la gravedad y el  
93 pronóstico (20). El tamizaje neonatal juega un papel importante en el diagnóstico precoz y  
94 el uso de espectrometría de masas en tándem ha aumentado el número de enfermedades que  
95 se pueden detectar y el análisis genético es indispensable para el diagnóstico definitivo de  
96 algunas de estas enfermedades.

97

98 En la última de década se han desarrollado alrededor de 83 medicamentos para tratar los  
99 EIM. Entre ellos se desatan la Agalsidasa- $\alpha$ , Alglucosidasa- $\alpha$ , Clorhidrato de cisteamina,

100 Bitartrato de cisteamina y la galsufase que han funcionado como tratamiento para algunos  
101 EIM como Fabry, Pompe, Citonosis, MPS VI, entre otros. La mayoría de los medicamentos  
102 que alcanzaron el grado 1 corresponde al 47 % de todos los medicamentos producidos por  
103 medio de las terapias de reemplazo enzimático para varios trastornos de almacenamiento  
104 lisosomal (21).

105

### 106 **3.2. Enfermedades de depósito lisosomal**

107

108 En las células eucariotas, el lisosoma es el principal organelo encargado del catabolismo de  
109 macromoléculas que pueden originarse dentro o fuera de la célula. Estas moléculas se  
110 entregan a los lisosomas por inmersión directa o por fusión de vacuolas digestivas con los  
111 lisosomas. La degradación se da en un pH ácido, dentro del lumen de los lisosomas. Dicho  
112 catabolismo, es realizado por un conjunto de enzimas que tienen la capacidad de degradar  
113 las macromoléculas a sus componentes monoméricos, que luego pueden pasar a través de la  
114 membrana lisosomal para ser reutilizados por la célula. La mayoría de estas enzimas son  
115 hidrolasas solubles, que tienen como óptimo un pH ácido (22).

116

117 La modificación en la secuencia de una de estas enzimas, en su cofactor proteico, en una  
118 proteína implicada en la modificación postraducciona l o el transporte de proteínas  
119 lisosomales; alterará la función lisosomal y, en consecuencia, las moléculas parcialmente  
120 degradadas se acumularán progresivamente dentro de los lisosomas (22). Esto, resulta en un  
121 grupo de patologías conocidas como enfermedades de depósito lisosómico (EDLs). La  
122 hipertrofia progresiva del sistema lisosomal produce una amplia gama de síntomas clínicos  
123 que dependen del defecto proteico, la naturaleza del material almacenado y el tipo de células  
124 en las que se acumula el material. Se han descrito más de 70 diferentes enfermedades de  
125 almacenamiento lisosómico en seres humanos con una prevalencia global de  
126 aproximadamente 1 en 8000 nacidos vivos. El diagnóstico se basa en la identificación de los  
127 síntomas clínicos, seguido de demostrar la deficiencia de una actividad enzimática o  
128 transportador específico. También se han informado muchos EDLs de origen natural en  
129 animales y se han utilizado para investigar la patogénesis de los trastornos y las estrategias  
130 terapéuticas (22).

131

#### 132 **3.2.1. Mucopolisacaridosis III (MPS III)**

133

134 Existen cuatro subtipos de MPSIII acorde a la deficiencia enzimática que se manifieste: A,  
135 B, C y D. Cada una de estas, se caracteriza por la deficiencia de una enzima que participa en uno  
136 de los pasos de la degradación del heparán sulfato (HS). El HS es un polisacárido cargado  
137 negativamente que se une a las proteínas de la membrana plasmática, estando presente en la  
138 matriz extracelular como parte de los proteoglicanos donde desempeña funciones como la  
139 transducción de señales y la regulación de la matriz extracelular (23).

140

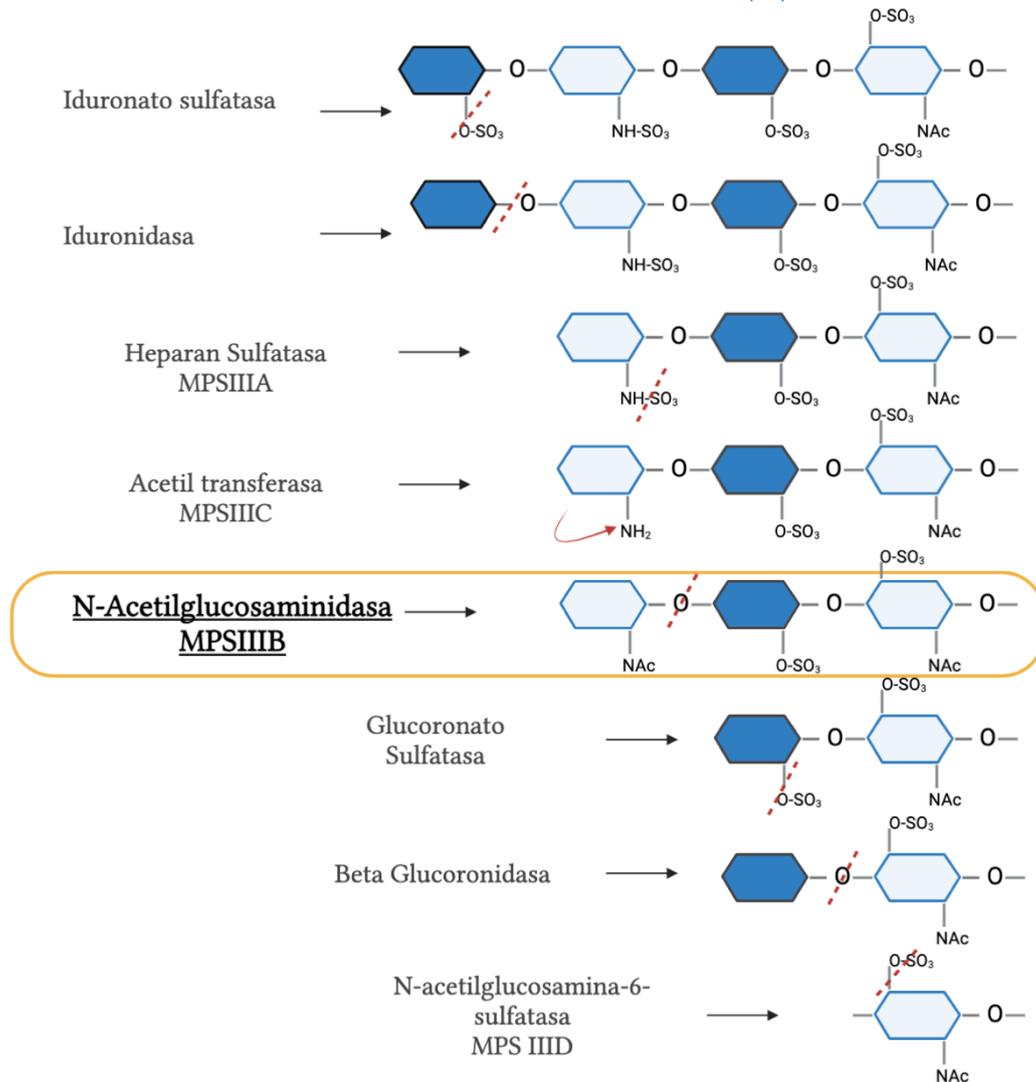
141 El catabolismo del HS se da de manera secuencial desde el extremo no reductor (**Figura 1**).  
142 Si el azúcar terminal está sulfatado, entonces el enlace sulfato debe hidrolizarse con una  
143 sulfatasa antes de que se pueda eliminar el azúcar. Cuando se ha eliminado el sulfato, una  
144 exoglucosidasa hidroliza el azúcar terminal del extremo no reductor del oligosacárido,  
145 dejando un azúcar más corto. La degradación continúa de esta manera secuencial, alternando  
146 entre la eliminación de sulfatos por las sulfatasas y la escisión de los azúcares terminales por  
147 las exoglucosidasas. Si la eliminación de un sulfato deja un residuo terminal de glucosamina,  
148 primero debe acetilarse a N-acetilglucosamina dado que el lisosoma carece de la enzima  
149 necesaria para eliminar la glucosamina. Esto se logra mediante una acetiltransferasa que usa  
150 acetil-CoA como donante de grupos acetilo. Cuando el residuo de glucosamina ha sido N-

151 acetilado, puede hidrolizarse por  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU), enzima que cataliza  
152 la reacción que le permite degradar de manera eficiente el HS y continuar con el catabolismo  
153 de este (24-26).

154

155 A pesar de que en los cuatro subtipos de MPS III se presenta acumulación de HS, estas  
156 enfermedades presentan algunas diferencias desde el punto de vista clínico. MPS IIIA  
157 presenta el cuadro clínico más grave porque se da una afectación sistémica que va desde  
158 sordera, pérdida de visión, insomnio, rasgos faciales toscos, hiperactividad, comportamiento  
159 agresivo, demencia y convulsiones. En MPSIIB, el cuadro de comportamiento es anormal,  
160 se da hepatomegalia, fenotipo de autismo y epilepsia. Para MPS IIIC se ha descrito un retraso  
161 en el desarrollo motor, problemas de conducta, deterioro del habla y cuadros de disentería  
162 severa. Finalmente, para MPS IIID el cuadro clínico no es claro pero al igual que con los  
163 demás subtipos se presenta un trastorno neurodegenerativo, problemas de habla y problemas  
164 locomotores (27). La expectativa de vida promedio de estos pacientes no supera los 20 años.  
165

166 En Colombia, la prevalencia de la MPS III es de 0,17 por cada 100.000. Según el informe del  
167 Instituto Nacional de Salud y Siviigila de Enfermedades Raras y huérfanas, desde 2016 hasta  
168 el primer periodo de 2021, se notificaron 24 casos de MPSIII. Esto corresponde al 0,06 %  
169 de un total de 45.560 informes de casos de enfermedades raras (15).



170

171 **Figura 1.** Se destacan las enzimas deficientes involucradas en los diferentes subtipos de MPS  
172 III. Adicionalmente, el recuadro naranja señala el paso en el que NAGLU está involucrada

173 en la degradación de la cadena de glicosaminoglicanos heparán sulfato. NAc, N-acetilo; SO<sup>3-</sup>,  
174 sulfato (1).

175

### 176 **3.2.2. Mucopolisacaridosis IIIB (MPS IIIB)**

177

178 La mucopolisacaridosis tipo IIIB (MPS IIIB), también denominada síndrome de Sanfilippo  
179 tipo B, es una EDL que causa una degeneración sistémica, afectando en gran medida el SNC.  
180 Esta enfermedad es causada por mutaciones en el gen que codifican para la enzima alfa-N-  
181 acetilglucosaminidasa (NAGLU, EC 3.2.1.50), que resultan en la acumulación lisosomal de  
182 heparán sulfato (1).

183

184 Esta acumulación de HS generalmente se refleja como discapacidad intelectual grave,  
185 regresión del desarrollo y otras manifestaciones neurológicas, incluido el trastorno del  
186 espectro autista y trastornos del sueño. El inicio de la enfermedad es típicamente antes de  
187 los diez años. Las manifestaciones sistémicas pueden incluir problemas musculoesqueléticos  
188 (rigidez articular, contracturas, escoliosis y displasia de cadera), pérdida de audición,  
189 infecciones respiratorias y enfermedades cardíacas (engrosamiento valvular, defectos en el  
190 sistema de conducción cardíaca) (28). Sin embargo, el carácter que prevalece es el deterioro  
191 neurológico.

192

193 La gravedad clínica varía en los cuatro subtipos de MPS III (definidos por la enzima  
194 involucrada) e incluso entre miembros de la misma familia. Para MPSIIIB se han reportado  
195 algunos efectos alternos como la alteración de la síntesis y tráfico de los gangliósidos, esto  
196 provoca una acumulación secundaria de los gangliósidos GM2 y GM3, lo cual puede también  
197 contribuir a esta patología (29).

198

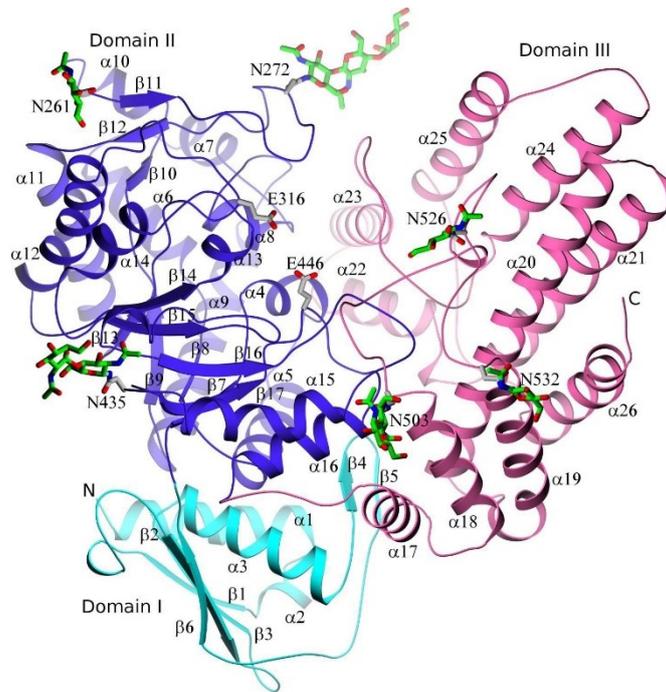
199 Las opciones de tratamiento existentes para esta enfermedad tienen como objetivo reducir  
200 el efecto fisiopatológico de la acumulación de sustrato en el lisosoma. La terapia de  
201 reemplazo enzimático (TRE) consiste en la administración exógena de la enzima lisosomal  
202 deficiente en pacientes con EDL. La terapia de reducción de sustrato implica la inhibición  
203 enzimas responsables de la síntesis del sustrato acumulado. También se han explorado para  
204 el tratamiento de las EDL el uso de chaperonas farmacológicas, el trasplante de células madre  
205 hematopoyéticas y la terapia génica, postulándolas como terapias prometedoras a través de  
206 las cuales podría ser posible tratar este tipo de enfermedades (30).

207

#### 208 **3.2.2.1. Alfa-N-acetilglucosaminidasa (NAGLU)**

209

210 El gen *NAGLU* que codifica la enzima alfa-N-acetilglucosaminidasa, la cual hidroliza los  
211 residuos terminales no reductores de alfa-N-acetilglucosamina del HS (**Fig. 1**). Este gen se  
212 encuentra en el cromosoma 17q21.2, abarca 8,5 Kb y contiene 6 exones. La enzima es un  
213 homotrímero cuya unidad monomérica tiene un peso molecular de 83,18 kDa y su estructura  
214 cristalográfica reveló tres dominios contiguos distintos (**Fig. 2**). El dominio I (residuos 24-  
215 126) consiste en un pequeño dominio  $\alpha/\beta$  ubicado en la parte inferior del bolsillo catalítico  
216 con una hoja  $\beta$  de dos hebras insertada entre el dominio catalítico II (residuos 127-465) y el  
217 dominio helicoidal III (residuos 466 -743). Los glutamatos catalíticos, E316 y E446, están en  
218 la parte superior de la estructura de barril ( $\alpha/\beta$ ) 8 del dominio II, y el bolsillo catalítico está  
219 situado en la hendidura entre los dominios II y III (25).



**Figura 2.** La estructura terciaria de NAGLU tiene tres dominios distintos. El dominio uno (cian) es un dominio pequeño  $\alpha$  /  $\beta$  ubicado en la parte inferior del bolsillo catalítico con una hoja  $\beta$  de dos hebras insertada entre el dominio catalítico dos (púrpura) y el dominio helicoidal tres (rosa). Los glutamatos catalíticos, E316 y E446 y los glicanos están representados como barras grises y verdes, respectivamente (25).

### 3.2.3. NAGLU recombinante

Las metodologías para obtener proteínas pasaron de necesitar grandes cantidades de tejidos o fluidos biológicos, que resultaban en pequeñas cantidades de proteína purificada, a necesitar única y típicamente un microorganismo y un gen de interés. De manera teórica y un poco simplificada, para obtener una proteína recombinante es necesario tomar el gen que codifica para la proteína blanco, se clona en el vector de expresión que se desee, se transforma y si es necesario se induce para finalmente tener la proteína lista para su purificación (31). Sin embargo, en la práctica, el proceso puede presentar varios inconvenientes.

Para el caso de NAGLU, esta fue obtenida de manera recombinante por primera vez en el año 2000 por Zhao y Neufeld en células CHO mutantes *Lec 1* (32). Obtuvieron una proteína de 83 kDa que mostró una actividad enzimática de 190,000 nmol/h/mg. En el mismo estudio fue posible observar, por medio de un marcador de [ $^{32}$ P], que la proteína tenía una baja expresión de manosa-6-fosfato. Esta característica impidió que la proteína fuese reconocida por los receptores de manosa-6-fosfato (RM6P), por ende la endocitosis no fue exitosa (32).

En el 2001 se intentó obtener NAGLU recombinante en células CHO-K1, donde se obtuvo una proteína recombinante con pesos aparentes de 89 y 79 kDa, esta diferencia se asoció a las variaciones en el perfil de glicosilaciones. La actividad enzimática de esta proteína fue de 63,420 nmol/h/mg y solo el 3 % de la misma fue endocitada por fibroblastos MPSIIB. Sin embargo, este porcentaje fue suficiente para lograr una reducción del 75 % en la acumulación de GAGs. Posteriormente se identificó que la reducida captura de la proteína se debía a la baja fosforilación de los residuos de manosa (33). Estos resultados hicieron evidente la necesidad de evaluar sistemas de expresión diferentes que lograran una mayor captura celular.

253 Los intentos por producir NAGLU recombinante en *K. phaffii* no habían dado fruto hasta el  
254 año 2021. Fue el proyecto de maestría de Heidy Triana, realizado en el Instituto de Errores  
255 Innatos del Metabolismo de la PUJ, el que logró producir de manera exitosa la enzima  
256 recombinante humana NAGLU (rhNAGLU) en *K. phaffii*. Este trabajo mostró la presencia  
257 de una proteína de 260 kDa en condiciones no reductoras y de 82 kDa en condiciones  
258 reductoras, cuya actividad enzimática específica fue de 0.438 nmol/h/mg (34).

259

### 260 3.2.4. Terapia de reemplazo enzimático

261

262 La TRE proporciona una enzima funcional recombinante a las células deficientes a través de  
263 la vía de endocitosis del RM6P, que dirige las proteínas extracelulares marcadas con M6P al  
264 lisosoma para disminuir la concentración de HS dentro del mismo (1). Para el caso de las  
265 MPS esta terapia está disponible los tipos I, II, IVA, VI y VII (30).

266

267 Aunque este enfoque terapéutico, para las enfermedades mencionadas anteriormente, ha  
268 mostrado una mejoría en la función pulmonar, movilidad articular, hinchazón del bazo e  
269 hígado y reducción en los GAGs secretados en orina; este modelo de terapia no ha logrado  
270 prevenir o mejorar las manifestaciones en el sistema nervioso central principalmente porque  
271 las proteínas recombinantes no logran llegar a cerebro debido a la presencia de la barrera  
272 hematoencefálica (35). Para superar este reto, el desarrollo de una TRE para la MPS IIIB, se  
273 ha valido de que el receptor M6P también es el receptor para el factor de crecimiento similar  
274 a insulina 2 (IGF2) en un sitio de unión diferente (16). En este sentido, la enzima rhNAGLU  
275 se fusionó con la fracción de unión al receptor de IGF2 (rhNAGLU-IGF2) para mejorar su  
276 captación celular. El trabajo preliminar *in vitro* ha sugerido que la enzima rhNAGLU-IGF2  
277 podría mejorar la focalización neuronal y astrocítica (36). Un estudio de dosis de fase I/II  
278 patrocinado por Biomarin para evaluar la seguridad y eficacia de BMN-250 (rhNAGLU-  
279 IGF2) en pacientes con MPS IIIB (NCT02754076; estudio de extensión a largo plazo  
280 NCT03784287) comenzó en 2016 con un aumento de la dosis inicial (30, 100 y 300  
281 mg/infusión) mediante infusión intracerebroventricular (ICV) semanalmente hasta alcanzar  
282 la dosis máxima tolerada probada, luego esta se administró durante 48 meses. La enzima  
283 rhNAGLU-IGF2 fue bien tolerada y los niveles de HS en el líquido cefalorraquídeo (LCR)  
284 descendieron a valores normales en los siete pacientes tratados. Después de 24 semanas de  
285 tratamiento, los volúmenes de hígado y bazo alcanzaron el rango normal en 9/9 y 7/9 sujetos,  
286 respectivamente (37). El estudio de extensión (NCT03784287) se inició en 2018 y la  
287 administración ICV semanal de una dosis de 300 mg continuará hasta las 240 semanas.

288

289 En el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM), se ha empleado la levadura  
290 *Komagataella phaffii* GS115 como sistema de expresión para la producción de rhNAGLU,  
291 obteniendo una actividad enzimática específica de 0,438 U/mg (34). La captación de  
292 rhNAGLU fue evaluada en fibroblastos MPSIIIB, donde se evidenció un incremento  
293 significativo de hasta 45,3 U/mg de actividad enzimática intracelular respecto a las células  
294 sin tratamiento. Adicionalmente, se demostró que la enzima es endocitada de manera  
295 dependiente de receptores de manosa y M6P. Finalmente, ensayos demostraron la reducción  
296 de masa lisosomal en fibroblastos MPSIIIB después de 24 h de tratamiento con la enzima  
297 recombinante, demostrando que *K. phaffii* es un sistema de expresión adecuado para la  
298 producción de rhNAGLU con potencial aplicación en TRE.

299

300

301

302

303

### 3.2.5. Aptámeros como estrategia de entrega a través de barrera hematoencefálica

Los aptámeros son secuencias cortas de nucleótidos monocatenarios que pueden unirse a proteínas de forma específica y con muy alta afinidad (38). También son conocidos como anticuerpos sintéticos o químicos, dado que los aptámeros se producen y desarrollan sin la necesidad de un huésped biológico (8). La alta especificidad y afinidad de unión son el resultado de que los aptámeros adoptan conformaciones estructurales secundarias y terciarias únicas basadas en las propias secuencias de nucleótidos. En consecuencia, estas conformaciones permiten a los aptámeros interactuar con epítopos específicos de proteínas a través de interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno o fuerzas de van der Waals (39).

Es justamente este tipo de interacciones, específicamente la que se da con los receptores asociados a los fenómenos de y transcitosis a través de la BHE, lo que da paso al uso de aptámeros como moléculas alternativas a los anticuerpos. La transcitosis es un fenómeno presente en muchos tipos de células, desde neuronas hasta células intestinales, osteoclastos y células endoteliales. En las células polarizadas, la transcitosis unidireccional se refiere al transporte de macromoléculas desde la membrana plasmática apical a la basolateral. Los pasos a lo largo de esta vía incluyen endocitosis, tráfico vesicular intracelular y exocitosis. El primero de estos pasos puede implicar la internalización adsortiva (dependiente de la carga) o mediada por el receptor (40). Las moléculas cargadas positivamente como polímeros, lípidos catiónicos, albúmina y nanopartículas pueden interactuar con la membrana celular cargada negativamente e internalizarse a través de endocitosis adsortiva (41). Aunque inicialmente se pensó que estaba atenuada en las células endoteliales del cerebro, prácticamente todas las células endoteliales presentan transcitosis mediada por receptores (42).

Para generar aptámeros que sean reconocidos como ligandos por un receptor, estos se generan de manera *in vitro* mediante un proceso llamado SELEX o evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial. En SELEX, las bibliotecas de ADN o ARN contienen  $10^{13-15}$  secuencias únicas que se seleccionan frente a una proteína, célula o molécula de interés para obtener ligandos de unión fuerte y específicos de la diana (38). Las secuencias de ADN se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y luego se someten a una reacción de unión contra la diana (39). A continuación, las secuencias de nucleótidos no unidas se eliminan de la población de secuencias total y las secuencias unidas se amplifican de nuevo mediante PCR para aumentar su número de copias. Finalmente, la biblioteca de secuencias de nucleótidos recién generada se utiliza en ciclos SELEX iterativos y el ciclo de reacción de unión, separación y amplificación se repiten tantas veces como sea necesario para promover la proliferación de especies de aptámeros que tienen afinidad con la molécula diana, mientras que de manera simultánea se van eliminando las secuencias que tiene baja afinidad (43).

Además de la ya mencionada baja o nula inmunogenicidad de los aptámeros, es importante considerar que el pequeño tamaño de estos les permite penetrar los tejidos con alta eficiencia (8). Al ser moléculas pequeñas los aptámeros son capaces de moverse rápidamente a través de barreras físicas y moleculares donde otros ligandos de afinidad, como los anticuerpos, no serían capaces de hacerlo (44). De ahí la ventaja potencial de utilizar los aptámeros como una estrategia para cruzar la BHE. Sin embargo, también es importante contemplar las desventajas, dentro de las cuales deben considerarse: la susceptibilidad a nucleasas, carencia de cadenas laterales que permitan una interacción aún mejor con su ligando (45) y, por último, la eficacia de amplificación de las secuencias depende de que tan proclives sean las mismas a

354 formar híbridos plantilla-plantilla, la hibridación correcta de cebadores y la interferencia por  
355 subproductos de la PCR (46).

356

### 357 **3.2.6. Acoplamiento (*docking*) molecular**

358

359 El acoplamiento molecular es un procedimiento computacional que busca predecir la unión  
360 no covalente de macromoléculas o, más frecuentemente, de una macromolécula (receptor) y  
361 una molécula pequeña (ligando/sustrato). El objetivo es predecir las conformaciones unidas  
362 y la afinidad de unión (47).

363

364 Entre las suposiciones hechas por este enfoque, está el establecimiento de un estado de  
365 protonación particular y una distribución de carga en las moléculas que no cambian entre,  
366 por ejemplo, sus estados ligado y no ligado (48). Además, el acoplamiento generalmente  
367 asume gran parte o la totalidad del receptor rígido, las longitudes covalentes y los ángulos  
368 constantes, mientras que se considera un conjunto elegido de enlaces covalentes que pueden  
369 rotar libremente.

370

371 La predicción de la unión de moléculas pequeñas a proteínas es de particular importancia  
372 práctica porque se utiliza para seleccionar bibliotecas virtuales de moléculas similares a  
373 fármacos, que sirven en el proceso de desarrollo de fármacos (49). El acoplamiento también  
374 es de gran ayuda cuando se intenta predecir la conformación unida de estructuras no  
375 obtenidas experimentalmente, como es el caso de los aptámeros cuya precariedad estructural  
376 en el PDB es notoria (50).

377

## 378 **4. Objetivo General**

379

380 Evaluar el efecto que tiene la conjugación de NAGLU recombinante a aptámeros que  
381 reconocen receptores de barrera hematoencefálica, sobre la interacción conjugado-receptor  
382 y su actividad enzimática.

383

### 384 **4.1. Objetivos específicos**

385

386 **4.1.1.** Seleccionar aptámeros previamente descritos como potenciales candidatos para  
387 reconocer receptores que permitan cruzar la barrera hematoencefálica.

388 **4.1.2.** Predecir *in silico* el efecto que tienen los conjugados aptámero-NAGLU sobre la  
389 afinidad a los sustratos HS y 4MUG, y su interacción con los respectivos receptores.

390 **4.1.3.** Evaluar *in vitro* el efecto de la conjugación aptámero-NAGLU sobre la actividad  
391 enzimática de NAGLU recombinante producida en *K. phaffii*.

392

## 393 **5. Metodología**

394

### 395 **5.1. Búsqueda de los aptámeros**

396

397 En aras de establecer qué aptámeros han sido reportados como potenciales candidatos para  
398 cruzar BHE, se hizo una búsqueda bibliográfica en PubMed, ScienceDirect, Scopus y  
399 Embase. Para la búsqueda se usaron claves booleanas que contenían los términos “Aptamer”  
400 AND “Delivery” AND “Blood-brain barrier” dentro del título, resumen y palabras clave,  
401 esto aplicando un filtro temporal para obtener publicaciones entre 2010 y 2021. Se  
402 contemplaron únicamente artículos de investigación y revisión. Las referencias obtenidas en  
403 las bases de datos fueron importadas al gestor EndNote para así eliminar los duplicados.

404 Posteriormente se hizo una selección manual de los artículos que eran de interés para la  
405 investigación.

406

## 407 **5.2. Interacción conjugados-sustratos *in silico***

408

409 Para llevar a cabo las simulaciones de interacción conjugado-sustrato se eligieron 3 aptámeros  
410 que por su tamaño de secuencia (no mayor a 81 nucleótidos) y potencialidad para cruzar la  
411 BHE, fueron de interés para fusionar con la proteína recombinante NAGLU. Los sustratos  
412 seleccionados, para evaluar el efecto de la fusión sobre la afinidad de la enzima, fueron el  
413 heparán sulfato y el 4-metilumbeliferil-2-acetamida-2-desoxi-alfa-D-glucopiranosido que  
414 fueron construidos usando el programa MarvinSketch by Chemaxon ([https://marvinjs-  
415 demo.chemaxon.com/latest/demo.html](https://marvinjs-demo.chemaxon.com/latest/demo.html)).

416

### 417 **5.2.1. Modelos**

418

419 La estructura cristalina de la enzima NAGLU, el ectodominio del receptor de transferrina  
420 humana, el dominio extracelular del receptor de LDL humano y el receptor de tirosin kinasa  
421 Axl en complejo con un inhibidor macrocíclico, se descargaron del Protein Data Bank (PDB)  
422 como entrada 4XWH, 1CX8, 1N7D y 5U6B, respectivamente. En el proceso de preparación  
423 de las proteínas, se eliminaron moléculas de agua y otras moléculas presentes en las  
424 cristalografías utilizando el software *free* Maestro 2021-3.

425

426 Para la predicción de la estructura secundaria de los aptámeros, tanto de ADN como de  
427 ARN, se hizo uso del servidor IsRNA en el apartado Vfold 2D  
428 <http://rna.physics.missouri.edu/vfold2D/>. A los aptámeros de ADN se les modificó su  
429 secuencia cambiando las timinas por uracilos, en pro de la compatibilidad con el servidor. A  
430 partir de esta estructura predicha, se hizo la predicción de la estructura tridimensional usando  
431 el mismo servidor, pero en el apartado Vfold3D  
432 (<http://rna.physics.missouri.edu/vfold3D/>). De las predicciones, se seleccionó el primer  
433 modelo sugerido por el software. Para el caso de los aptámeros de ADN, las estructuras  
434 fueron exportadas a el paquete *free* Maestro 2021-3 para realizar el cambio estructural de  
435 ARN a ADN, haciendo el cambio en los azúcares y las bases nitrogenadas.

436

437 La construcción de las quimeras, NAGLU-aptámero, también fue llevada a cabo en el  
438 paquete Maestro. Para ello y haciendo uso del 2Dsketcher, primero se construyó el complejo  
439 tiol-linker que fue enlazado al extremo 3' de los aptámeros. Posteriormente, este complejo y  
440 la proteína tratada se unieron en un mismo espacio de trabajo para enlazar el carbono libre  
441 del linker con el extremo N terminal de la proteína, correspondiente a la asparagina 24 (25).  
442 Acá, fue importante el llevar el complejo aptámero-tiol-linker hacia la proteína y no de  
443 manera contraria, esto en aras de conservar las mismas coordenadas de las quimeras y la  
444 proteína nativa para los acoplamiento. La validación de la estructura de las quimeras, para  
445 asegurar la identidad del componente proteico, se hizo sometiendo la construcción frente a  
446 la estructura nativa en el servidor <https://zhanggroup.org/> en el apartado de Tm score,  
447 donde se tuvo en cuenta el RMSD y el propio Tm para asegurar que el componente proteico  
448 de la quimera, estructuralmente hablando, fuese el mismo que el de la proteína nativa.

449

### 450 **5.2.2. Acoplamiento molecular**

451

452 Los archivos de ligando, proteína y quimeras se convirtieron de formato pdb a pdbqt usando  
453 Autodock Tools, y solamente se adicionaron los hidrógenos polares de la enzima. El  
454 acoplamiento con los ligandos se realizó utilizando Autodock vina (48), lo que permitió la

455 definición de un gridbox, en el sitio activo de la enzima, con un tamaño  $x = 30$ ,  $y = 40$ ,  $z =$   
456  $30$ , en las coordenadas  $x = 17,176$ ;  $y = 90,489$ ;  $z = 40,674$ , de acuerdo a los parámetros  
457 previamente reportados (51). Se evaluaron las mejores 20 conformaciones para cada uno de  
458 los ligandos dentro de la cavidad activa de NAGLU y los resultados de la interacción sustrato-  
459 proteína y sustrato-quimera, se informaron como energía de afinidad (kcal/mol). Pymol 2.0.7  
460 fue usado para determinar la conformación más probable de cada acople, aquella con el grupo  
461 N-acetil-glucosamina orientado hacia el interior del bolsillo catalítico y cerca de los  
462 glutamatos 316 y 446. El análisis de interacción de los diferentes acoplamientos se realizó  
463 con el software *free* Maestro 2021-3.

464

465 Para los acoplamientos de aptámero-receptor y quimera-receptor se hizo uso del servidor  
466 HDOCK <http://hdock.phys.hust.edu.cn/>, que permite hacer estudios de docking proteína-  
467 proteína y proteína-ácido nucleico. Al no tener un respaldo que describiera de manera  
468 explícita el sitio de unión de los aptámeros frente a su receptor, se optó por delimitar la  
469 interacción a los sitios de unión del receptor con su ligando natural. Para el caso del receptor  
470 de transferrina, su estructura se truncó a las dos cadenas implicadas en la interacción con la  
471 transferrina. Luego, el resultado se sobrepuso con la estructura completa para así tener el  
472 panorama entero de la interacción. Para el caso del receptor de tirosin quinasa, al ser un  
473 homotetrámero, se trabajó con la unidad monomérica del mismo. Los resultados de  
474 acoplamiento se informaron como Docking Score (DS), un valor adimensional entendido  
475 como la energía de unión que el servidor provee una vez finalizada la simulación. Dicha  
476 energía de unión es el producto del algoritmo híbrido de acoplamiento basado en y sin  
477 plantillas. Este utiliza las estructuras individuales de dos moléculas de interés para que luego  
478 el acoplamiento molecular muestrea los modos de unión putativos a través de un algoritmo  
479 de búsqueda y los evalúa con una función de puntuación de energía. Luego, todos los modos  
480 de unión putativos se clasifican de acuerdo con sus puntuaciones de energía de unión, en las  
481 que los modelos mejor puntuados se seleccionan como las estructuras complejas predichas  
482 (52).

483

### 484 **5.3. Producción de NAGLU recombinante humana (rhNAGLU) a escala de 400 mL**

485

486 Para la producción de la enzima recombinante, se usó la cepa *Komagataella phaffii* GS115/  
487 pPICZ $\alpha$ A-NAGLU obtenida por Triana, 2021 (34). A partir de los viales conservados, se  
488 prepararon 3 inóculos de 40 mL en medio YPD (extracto de levadura 1 % p/v; peptona 2  
489 % p/v; D-glucosa 2 % p/v) que se incubaron durante 24 horas a 30 °C y 200 rpm. Pasado  
490 el tiempo de incubación, cada inóculo se adicionó a 360 mL de medio BMGY (buffer fosfato  
491 de potasio 100 mM pH 6,0; base nitrogenada de levadura (YNB) 1,34 %; biotina  $4 \times 10^{-5}$  %;  
492 glicerol 1 %; extracto de levadura 1 %) y se incubó por 24 horas a 30 °C y 200 rpm. Una vez  
493 se obtuvo una  $DO_{600nm}$  mayor a 2, medida en espectrofotómetro BioSpectrometer  
494 (Eppendorf), los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm por 20 minutos a 20 °C. Los pellets  
495 fueron resuspendidos en 400 mL de medio BMMY (buffer fosfato de potasio 100 mM pH  
496 6,0; YNB 1,34 %; biotina  $4 \times 10^{-5}$  %; metanol 0,5 %; extracto de levadura 1 %) para su  
497 posterior cultivo durante 72 horas a 30 °C y 200 rpm. Cada 12 horas se adicionó metanol  
498 para mantener la concentración de este en 0,5 %.

499

### 500 **5.4. Clarificación y concentración del extracto crudo**

501

502 La biomasa producto de la inducción, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C  
503 para obtener el extracto crudo. Este, fue filtrado secuencialmente a través de una unidad de  
504 filtración de 0,45/0,22  $\mu$ m Sartopore 150 (Sartorius Stedim). Posteriormente, el filtrado fue

505 concentrado en un Amicon Ultra-15 membrana PLTK Ultracel-PL de 30 kDa (Merck) hasta  
506 un volumen de 20 mL.

507

### 508 **5.5. Cuantificación de proteína total por BCA**

509

510 La cuantificación de proteínas se realizó usando el estuche de ensayo de cuantificación de  
511 proteínas Pierce™ BCA (Thermo Scientific™). Se mezclaron 25 µL de muestra con 200  
512 µL de la solución de trabajo (50 partes del reactivo A y 1 parte de reactivo B). La mezcla se  
513 incubó por 30 min y las muestras se analizaron a una absorbancia de 562 nm en  
514 espectrofotómetro BioSpectrometer Basic (Eppendorf). La curva patrón se preparó con  
515 albúmina sérica bovina estándar siguiendo las indicaciones del fabricante, utilizando  
516 concentraciones desde 0,0625 hasta 2 mg/mL.

517

### 518 **5.6. Determinación de actividad enzimática**

519

520 Se empleó el sustrato 4-metilumbeliferil-2-acetamida-2-desoxi-alfa-D-glucopiranosido 2 mM  
521 (ab144785 4 ABCAM), resuspendido en acetato de sodio 0,2M pH 4,5 y Triton X100 al 0,5  
522 %, para determinar la actividad enzimática de NAGLU recombinante. La medición de la  
523 actividad se realizó adaptando protocolos previamente descritos (16, 33). En una placa de 96  
524 pozos (Corning 96 Well Black Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate, Corning) se  
525 adicionaron 50 µL de muestra y 50 µL de sustrato. La reacción se incubó durante una hora  
526 a 37 °C en oscuridad. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo adicionando 150 µL de  
527 solución de parada glicina-carbonato 0,17 M pH 9,8 (composición por litro: glicina 12,6 g,  
528 Na2CO3 18 g). La fluorescencia se midió empleando un fluorómetro Berthold Technologies  
529 Twinkle LB 970 a una longitud de onda de 350/450 nm excitación/emisión. Para cada  
530 medición se realizó simultáneamente una curva patrón de 4-metilumbeliferona (4MU, Sigma-  
531 Aldrich) entre 0,0625 y 2 µM disuelta en solución de parada glicina-carbonato 0,17 M pH  
532 9,8. En todos los casos se empleó un blanco de muestra correspondiente al solvente en el  
533 cual se encontraron las muestras a analizar. Una unidad enzimática (U) fue definida como la  
534 cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 nmol de sustrato por hora.

535

536 El cálculo de la actividad volumétrica (U/mL) y la específica (U/mg), se realizó empleando  
537 las siguientes ecuaciones:

538

$$539 \quad \frac{U}{mL} = \frac{((F_{mx} - F_b) - b)}{mL \text{ muestra} * m} \quad \frac{U}{mg} = \frac{((F_{mx} - F_b) - b)}{mg \text{ proteína} * m}$$

540

541 donde  $F_{mx}$ : fluorescencia muestra;  $F_b$ : fluorescencia blanco;  $b$  y  $m$ : intercepto y pendiente de  
542 la curva de 4MU, respectivamente.

543

### 544 **5.7. Conjugación de aptámeros**

545

546 Para realizar el proceso de conjugación se siguió la metodología propuesta por Du y  
547 colaboradores (53) y empleada previamente en el Instituto de Errores Innatos del  
548 Metabolismo por Villada, 2021 (54). Para ello, se disolvieron 2,5 mg de proteína presente en  
549 el extracto crudo y 1 mg del enlazador sulfosuccinimidil 4- (N-maleimidometil) ciclohexano-  
550 1-carboxilato (sulfo-SMCC Thermo Scientific™, 22322) en 1 ml de buffer PBS 1X (fosfato  
551 de sodio 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4). Esta solución se agitó a 750 rpm  
552 durante 2,5 horas a temperatura ambiente (TA, 25 °C). Posteriormente, los reactivos sin  
553 reaccionar se eliminaron mediante filtración a través en un Amicon Ultra-15 membrana

554 PLTK Ultracel-PL de 30 kDa (Merck) y el conjugado extracto-SMCC se sometió a seis  
 555 lavados con PBS antes de la resuspensión en 850 µL de PBS.

556

557 Por otro lado, se realizó el plegamiento del aptámero siguiendo el protocolo descrito por  
 558 Henri y colaboradores (55), se sometió el aptámero a 85 °C durante 5 minutos, seguido de  
 559 10 minutos a temperatura ambiente y 15 minutos a 37 °C. Una vez plegado el aptámero se  
 560 activaron 120 µl del mismo marcado con tiol 3' (resuspendido a una concentración de 125  
 561 µM en agua) durante 1 hora a temperatura ambiente mezclando continuamente con 15 µl de  
 562 Tris- (2-carboxietil) fosfina, clorhidrato (TCEP, Invitrogen™, T2556) 100 mM. El exceso de  
 563 TCEP y las sales se eliminaron posteriormente mediante filtración a través de Sephadex ®  
 564 G-50 DNA grade (Cytiva, 17057301). A continuación, se mezclaron SH-apta activado y el  
 565 conjugado de extracto-SMCC y se agitaron durante toda la noche a 30 °C. El SH-apta que  
 566 no había reaccionado se eliminó mediante filtración a través de un filtro Amicon-30 kDa y  
 567 el conjugado Extracto-apta se sometió a seis lavados con buffer citrato de sodio (20 mM pH  
 568 5,5). Las mediciones de actividad se realizaron como se describe en el apartado 5.6.

569

## 570 6. Resultados

571

### 572 6.1. Búsqueda de los aptámeros

573

574 La búsqueda de los aptámeros se realizó en 4 bases de datos (PubMed, Science Direct, Scopus  
 575 y Embase), arrojando un total de 147 resultados, de los cuales, 18 pertenecían a Science  
 576 Direct, 27 a PubMed, 77 a Scopus y 26 a Embase. Posterior a eliminar los duplicados, la  
 577 cantidad de artículos se redujo a 88. Con esto se procedió a eliminar aquellos artículos cuyo  
 578 título y resumen no estuviesen directamente relacionados con el uso de aptámeros como  
 579 estrategia de entrega de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Luego de este  
 580 proceso de tamizaje se obtuvieron 29 artículos. Una revisión fue realmente importante, ya  
 581 que agrupaba los aptámeros que potencialmente podrían servir como mecanismos de entrega  
 582 (56). Estos mismos aptámeros se reportaban en 12 de los 29 artículos resultado de la  
 583 búsqueda en bases de datos. Estos 12 artículos reportaban 10 aptámeros cuyas principales  
 584 características se resumen a continuación:

585

586 **Tabla 1.** Aptámeros reportados como potenciales para el cruce a través de barrera hematoencefálica,  
 587 comunes a la búsqueda y al artículo de revisión (56).

Nombre del aptámero	Estructura	Blanco molecular	Internalización/Transcitosis/ Localización cerebral	Referencia
A15	ARN – 70 nt	No identificado	Transcitosis observada <i>in vitro</i>	(57)
C2.min	ARN – 43 nt	RTf-H*	Internalización observada para líneas celulares de linfocitos T y tumores cervicales	(58)
Dw4	ARN – 50 nt	RTf-H/	Internalización observada en fibroblastos de ratón NIH3T3 y células de carcinoma pancreático	(59)
GL21.T	ARN – 32 nt	Axl**	Transcitosis observada <i>in vitro</i>	(60)

Gint4.T	ARN – 34 nt	PDGFR $\beta$ ****	Transcitosis observada <i>in vitro</i>	(61, 62)
GL56	ARN – 91 nt	Receptor de insulina	Sin confirmación experimental	(63)
RNV-L7	ADN – 81 nt	RLDL***	Sin confirmación experimental	(64)
TfRA4	ADN – 14 nt	RTf-H*	Transcitosis y localización cerebral observada <i>in vitro e in vivo</i>	(65)
TEPP	ADN – 40 nt	RTf-H* y EpCAM*****	Transcitosis y localización cerebral observada <i>in vitro e in vivo</i>	(10, 66)
Waz	ARN – 48 nt	RTf-H*	Internalización observada en fibroblastos de ratón NIH3T3 y células de carcinoma pancreático	(67)

588 \*Receptor de Transferrina humana, \*\*Receptor de Tirocin quinasa, \*\*\*Receptor de Lipoproteína de  
589 baja densidad, \*\*\*\*Receptor  $\beta$  del factor de crecimiento derivado de plaquetas, \*\*\*\*\*Molécula de  
590 adhesión de células epiteliales

591

592 Ahora bien, de manera más detallada se enumeran y exponen las características de los  
593 aptámeros descritos anteriormente. Esto, para proveer del contexto necesario que justifica la  
594 elección de los aptámeros objeto de estudio en este trabajo, tanto computacional como *in*  
595 *vitro*.

596

### 597 **6.1.1. Aptámero A15**

598

599 En un intento por aislar y desarrollar aptámeros de ARN capaces de cruzar la BHE, Cheng  
600 y colaboradores (57), en el 2013, desarrollaron el aptámero A15, el cual no tiene una proteína  
601 diana específica. Este proceso se realizó a través de un proceso SELEX *in vivo*. Dicho proceso  
602 consistió en la administración de una inyección que contenía secuencias de ARN de cadena  
603 sencilla en la cola del ratón. Para mejorar la viabilidad de las secuencias *in vivo*, estas se  
604 modificaron incorporando trifosfatos 2-fluoronucleares. Posterior a las 3 horas de inyección,  
605 se extrajo el cerebro y se recuperaron los ARNs para de manera secuencial amplificarlos  
606 mediante una PCR de transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR). Este ciclo de  
607 selección *in vivo*, se repitió 22 veces. Haciendo uso de esta aproximación metodológica  
608 lograron identificar una secuencia de ARN afín por cerebro de ratón. Esta secuencia la  
609 denominaron A15 y aunque no se identificó el blanco terapéutico del aptámero, los  
610 resultados de los estudios de hibridación *in situ* permitieron a los autores confirmar la  
611 capacidad de este aptámero para penetrar BHE (57). Dado que el aptámero se desarrolló en  
612 un modelo murino, faltaría evaluar la capacidad de este para penetrar la BHE humana.

613

### 614 **6.1.2. Aptámeros C2.min y Waz**

615

616 El aptámero de ARN C2.min, tiene como objetivo de unión el receptor de transferrina  
617 humana y fue generado en 2012 por Wilner y colaboradores (58). Su desarrollo fue llevado a  
618 cabo utilizando una combinación de métodos SELEX de proteínas y células. Es importante  
619 señalar que, si bien el aptámero se desarrolló contra RTf-H y se observó la internalización  
620 celular; en su estudio, los autores hicieron uso de las células de tumor cervical HeLa, en

621 contraposición a las células endoteliales (CE) de la BHE (67). El otro aptámero de ARN que  
622 reconoce RTf-H, Waz, también fue desarrollado por el mismo grupo. Este nuevo aptámero  
623 tenía una mejor constante de disociación que C2.min y se observó la internalización celular  
624 en linfocitos T, pero no en células endoteliales de BHE, demostrando así la captación celular  
625 de los aptámeros.

626

### 627 **6.1.3. Aptámeros DW4, TfRA4 y TEPP**

628

629 El desarrollo del aptámero Dw4 es derivado del aptámero GS24, primer aptámero  
630 desarrollado para reconocer el receptor de transferrina (13). Porciani y colaboradores,  
631 realizaron modificaciones sobre GS24 para generar nuevas versiones con afinidades de unión  
632 más altas, dichas versiones se nombraron GS24min y DW4. Los autores descubrieron que  
633 GS24min no podía unirse a RTf-H, mientras que DW4 sí tenía afinidad hacia el receptor de  
634 transferrina de ratón y humano expresado en una línea de fibroblastos de ratón NIH3T3 y  
635 células pancreáticas humanas cancerosas MIA PaCA-2, respectivamente (59).  
636 Posteriormente, Macdonald y colaboradores realizaron modificaciones sobre GS24 y  
637 generaron un nuevo aptámero llamado TfRA4. TfRA4 tiene una mayor afinidad por el  
638 receptor de transferrina. Fue con este aptámero que se observó por primera vez la  
639 internalización en células endoteliales de cerebro de ratón, bEnd.3 (65). A partir de este  
640 descubrimiento, el mismo grupo desarrolló un constructo bifuncional en la que el aptámero  
641 TfRA4 se conjugó con otro aptámero llamado Epa, que se dirige específicamente a la  
642 molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) (66). Para este estudio, se eligió  
643 EpCAM como la otra proteína diana transmembranal debido a que está sobreexpresada en  
644 células tumorales sólidas (68). El aptámero resultante, llamado TEPP, ha demostrado no  
645 solamente su internalización, sino también la capacidad de atravesar un modelo de BHE *in*  
646 *vitro* (10, 66). Adicionalmente, cuando el constructo bifuncional se introdujo en un modelo  
647 murino de metástasis cerebral de cáncer de mama, se observó su acumulación en las células  
648 tumorales.

649

### 650 **6.1.4. Aptámero GL21.T**

651

652 En 2012, Cerchia y colaboradores, mediante el método SELEX de células completas,  
653 desarrollaron un aptámero de RNA llamado GL21.T que dilucidaron podría unirse a Axl,  
654 que es un receptor de tirosin kinasa con funciones establecidas en la tumorigénesis y la  
655 sobreexpresión en células tumorales (60). El grupo italiano se propuso originalmente utilizar  
656 el aptámero GL21.T para interrumpir la actividad de Axl y, por lo tanto, detener la progresión  
657 del cáncer. El trabajo de seguimiento realizado por el mismo grupo en 2016 reveló que el  
658 GL21.T podía moverse, a través de un modelo tricultivo de BHE *in vitro*, en su forma de  
659 aptámero original o cuando está unido con miARN terapéuticos (69); y al interactuar con  
660 Axl expresado en células endoteliales y pericitos, para luego migrar hacia el compartimento  
661 basolateral del ensayo. Sin embargo, un punto de preocupación es el hecho de que tras la  
662 introducción del aptámero, la permeabilidad de la barrera aumentó y el modelo *in vitro* tardó  
663 6 h en recuperar su perfil de permeabilidad. Una de las limitaciones de ultrasonido focalizado  
664 es que el aumento de la permeabilidad podría permitir la entrada no específica de agentes  
665 biológicos o patógenos extraños en el cerebro y causar efectos secundarios no deseados.  
666 Queda por verse si esta observación es válida también para los modelos *in vivo*, ya que hasta  
667 la fecha no se ha publicado un estudio de seguimiento sobre este tema.

668

669

670

671

### 6.1.5. Aptámero Gint4.T

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

El aptámero Gint4.T fue desarrollado originalmente por Camorani y colaboradores en el 2014 como modalidad terapéutica contra el glioblastoma (GBM). El aptámero de ARN tiene como diana el ectodominio del receptor  $\beta$  del factor de crecimiento derivado de plaquetas humano (PDGFR $\beta$ ). Este receptor está sobreexpresado en las células madre del glioma y se ha relacionado previamente con el crecimiento tumoral (70). El grupo informó que en su estudio *in vivo*, Gint4.t pudo obstaculizar la proliferación y migración de GBM. Sugirieron que el aptámero actúa inhibiendo la actividad de PDGFR $\beta$ , que se ha documentado como crucial para la tumorigénesis. Los autores señalaron que por sí solo, el aptámero no podía cruzar la BHE (71). Sin embargo, en un artículo de seguimiento publicado por Monaco y colaboradores, la conjugación del aptámero Gint4.T con nanopartículas poliméricas (NPP) permitió que el complejo penetrara en la BHE *in vivo* (61). Curiosamente, mientras que el aptámero-NPP exhibió propiedades de transcitosis, un complejo de la secuencia codificada-NPP no pudo cruzar el BHE, lo que sugiere que tanto el aptámero Gint4.T como las NPP, en conjunto, son necesarios para traficar ellos mismos a través de la BHE. El desarrollo de este aptámero fue llevado adelante por otro grupo de China en 2019. Shi y colaboradores llevaron más allá las modificaciones del aptámero Gint4.T conjugándolo con otro aptámero llamado GMT8, que se dirige a la línea celular del glioma U87, y otro nanoportador novedoso llamado ácido nucleico marco tetraédrico (tFNA) (62). En su experimento, han demostrado que la construcción utilizada fue capaz de cruzar un modelo BHE *in vitro* y un objetivo en la línea celular U87, destacando su potencial para la administración de fármacos dirigida al glioblastoma (62).

### 6.1.6. Aptámero GL56

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

Es conocido que el receptor de insulina es una de las proteínas transmembranales implicadas en el transporte transcelular mediado por receptores que se puede encontrar en la BHE (72). Hasta la fecha, dos grupos de investigación de Corea del Sur e Italia han informado de dos aptámeros dirigidos al receptor de insulina (RI), IR-A48 y GL56, respectivamente (63, 73). Se encontró que el aptámero IR-A48 se une al IR con una afinidad muy alta y fue capaz de internalizarse en la línea celular de adipocitos 3T3-L1 (73). De manera similar, el aptámero GL56 también puede internalizarse tras la incubación con la línea celular de glioblastoma humano U87MG y ha demostrado tener propiedades inhibitorias contra la vía de señalización del receptor de insulina que condujo a la reducción de la viabilidad celular (63). Aunque en su estudio Iaboni y colaboradores utilizaron el aptámero de ARN contra una línea celular de glioblastoma para examinar su capacidad de internalización, el receptor de insulina también se expresa en gran medida en la BHE y se ha demostrado que sufre transcitosis endógena (74). Además, se ha informado de que el receptor de insulina se puede utilizar como un objetivo para los anticuerpos monoclonales para ayudar a los agentes terapéuticos a atravesar la BHE, lo que sugiere que un enfoque similar utilizando aptámeros también podría funcionar (75). Aún se requieren estudios de validación, ya que IR-A48 y GL56 se han investigado en configuraciones experimentales de transcitosis en BHE *in vitro* o *in vivo*.

### 6.1.7. Aptámero RNV-L17

716

717

718

719

720

721

722

Al igual el receptor de insulina, se ha demostrado que el receptor de lipoproteínas de baja densidad (RLDL) se expresa en la superficie luminal y abluminal de las células epiteliales de la BHE (76). Wang y colaboradores informaron sobre la generación del aptámero RNV-L7 cuya diana es el RLDL. En el estudio, se conjugó el aptámero con una ADNzima para inhibir la expresión de miR-21 en células de cáncer de hígado Huh-7 haciendo uso del conjugado

723 (64). La expresión de miR-21 logró reducirse utilizando el complejo, esto sugiere que se pudo  
 724 aprovechar la endocitosis mediada por RLDL para ingresar a la células cancerosas (64). Al  
 725 día de hoy no existe reporte sobre si es posible la internalización y tránsito del aptámero a  
 726 través de la BHE, por ende, sería de interés conocer si este fenómeno es o no posible  
 727 haciendo uso de este aptámero.

728  
 729 Una vez proporcionada la información sobre los aptámeros y su actuar como potenciales  
 730 candidatos para cruzar la BHE, se seleccionaron los aptámeros TfRA4, GL21.T y RNV-L17.  
 731 Para los estudios computacionales se escogieron estos aptámeros por las características de su  
 732 secuencia, es decir, se tuvo en cuenta que los aptámeros tuviesen tamaños de secuencia  
 733 diversos, de 14 a 81 nucleótidos, y una naturaleza diferente (ADN o ARN). Adicionalmente  
 734 también es importante recalcar que la selección se hizo teniendo en cuenta la información  
 735 experimental asociada al cruce de BHE o su potencial uso.

736  
 737 **6.2. Obtención de modelos**

738  
 739 Una vez identificados los aptámeros de interés, haciendo uso de sus secuencias se obtuvieron  
 740 los modelos que servirían para los posteriores ensayos de acoplamiento.

741  
 742 **6.2.1. Predicción de las estructuras 2D y 3D de los aptámeros.**

743  
 744 Teniendo en cuenta que el servidor empleado para la generación de las estructuras tanto 2D  
 745 como 3D solamente reconoce secuencias de ARN, se modificó la secuencia de los aptámeros  
 746 de ADN reemplazando las timinas (T) por uracilos (U) (**Tabla 2**).

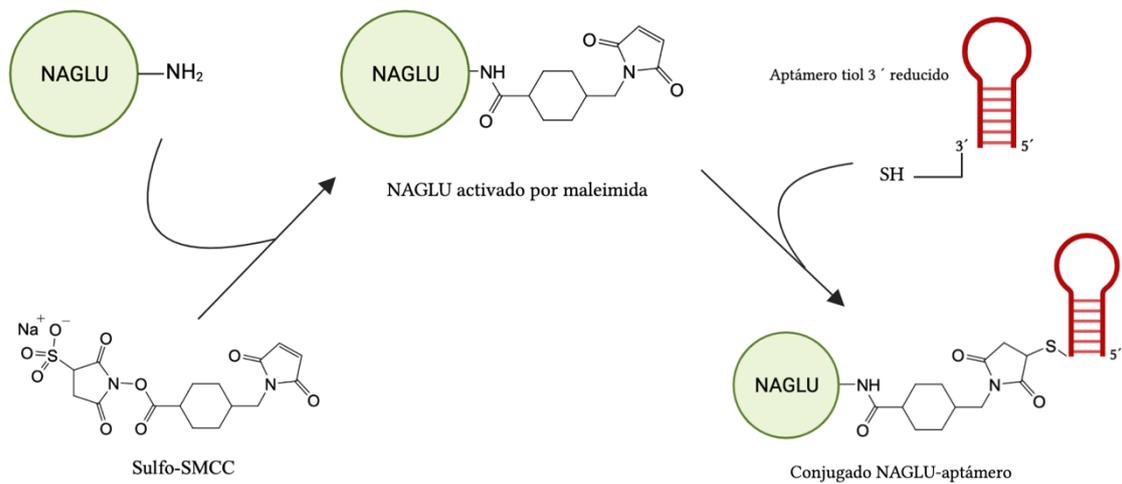
747  
 748 **Tabla 2.** Secuencias de los aptámeros escogidos, se muestra la secuencia original y la secuencia que  
 749 se introdujo al servidor IsRNA 2DVFold.

Aptámero	Secuencia nativa	Secuencia en IsRNA 2DVFold
TfRA4	5'-GCG TGG TAC CAC GC- 3'	5'-GCG UGG UAC CAC GC- 3'
GL21.T	5'-AUG AUC AAU CGC CUC AAU UCG ACA GGA GGC UCA C- 3' 5'-GGA CAG GAC CAC ACC CAG CGC GGT CGG CGG GTG GGC GGG GGG AGA ACG	5'-AUG AUC AAU CGC CUC AAU UCG ACA GGA GGC UCA C- 3' 5'-GGA CAG GAC CAC ACC CAG CGC GGU CGG CGG GUG GGC GGG GGG AGA ACG AGG
RNV-L7	AGG TAG GGG TCA GGC TCC TGT GTG TCGCTT TGT- 3'	UAG GGG UCA GGC UCC UGU GUG UCG CUU UGU- 3'

750  
 751 Una vez el servidor culminó la tarea se obtuvieron las estructuras predichas y su respectiva  
 752 energía de plegamiento (**Figura 3**). Donde para TfRA4 se obtuvo una energía de  
 753 plegamiento de -4,81 kcal/mol, para GL21.T una energía de -8,56 kcal/mol y para RNV-L7  
 754 una energía de -23,34 kcal/mol.

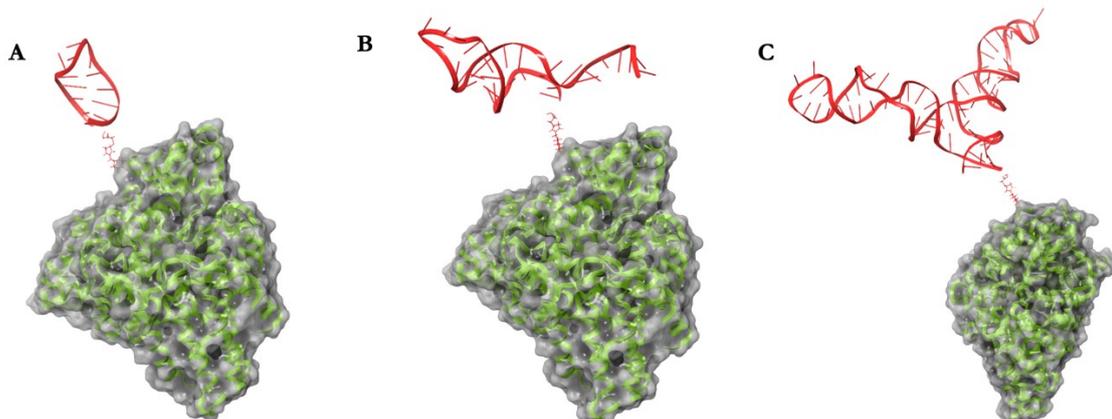


779 sulfhidrilo a pH 6,5-7,5 para formar enlaces tioéter estables. En soluciones acuosas, la  
 780 degradación hidrolítica del éster NHS es una reacción competitiva cuya velocidad aumenta  
 781 con el pH. El grupo maleimida es más estable que el grupo éster NHS, pero se hidrolizará  
 782 lentamente y perderá su especificidad de reacción para los sulfhidrilos a valores de pH > 7,5.  
 783 Por estas razones, las conjugaciones con estos reticulantes se realizan normalmente a pH 7,2  
 784 7,5, reaccionando el éster NHS (dirigido a amina) antes o simultáneamente con la reacción  
 785 de maleimida (dirigida a sulfhidrilo) (77). De esta forma, el esquema de la reacción en dos  
 786 pasos para la conjugación de los aptámeros a NAGLU es el siguiente:  
 787



788 **Figura 5.** Esquema de reacción de dos pasos para conjugar anticuerpos y proteínas enzimáticas con  
 789 Sulfo-SMCC. El reticulante se hace reaccionar primero con NAGLU para producir una proteína  
 790 activada por maleimida. Después de eliminar el exceso de reticulante sin reaccionar y los  
 791 subproductos, la proteína activada con maleimida se hace reaccionar con la proporción molar  
 792 apropiada del aptámero que tiene grupos sulfhidrilo. Por lo general, se producen varias o múltiples  
 793 activaciones de maleimida por molécula de proteína, lo que permite conjugar varias moléculas de  
 794 enzima con cada molécula de anticuerpo. Adaptado de (78).  
 795  
 796

797 Para la construcción de las quimeras fue importante tener en cuenta la adición del grupo tiol  
 798 reducido en el extremo 3' del ADN, para así simular la reacción con el linker. Una vez se  
 799 realizó esto, se hizo la unión a la proteína que fue previamente tratada como se describe en  
 800 la metodología 5.2.1 (Figura 6). La posterior evaluación del T<sub>m</sub> de las quimeras NAGLU-  
 801 TfRA4, NAGLU-GL21.T y NAGLU-RNV-L7, frente a la proteína sin conjugar, dio como  
 802 resultado valores de 0,9975, 0,9976 y 0,9978, respectivamente.  
 803



804

805 **Figura 6.** Construcción de las quimeras, en verde la estructura cristalográfica de NAGLU. A)  
806 NAGLU-TfRA4. B) NAGLU-GL21.T. C) NAGLU-RNV-L7. Los valores tanto de Tm como de  
807 RMSD indican variaciones estructurales que no comprometen la identidad del componente proteico  
808 de la quimera.  
809

810 Ahora bien, cuando se hizo la evaluación del RMSD, los valores obtenidos para las quimeras  
811 NAGLU-TfRA4, NAGLU-GL21.T y NAGLU-RNV-L7, frente a la proteína sin conjugar,  
812 fueron de 0.465, 0.455 y 0.438 Å, respectivamente. Indicando así diferencias estructurales  
813 que no comprometen la identidad del componente proteico de las quimeras.  
814

### 815 6.3. Acoplamiento molecular

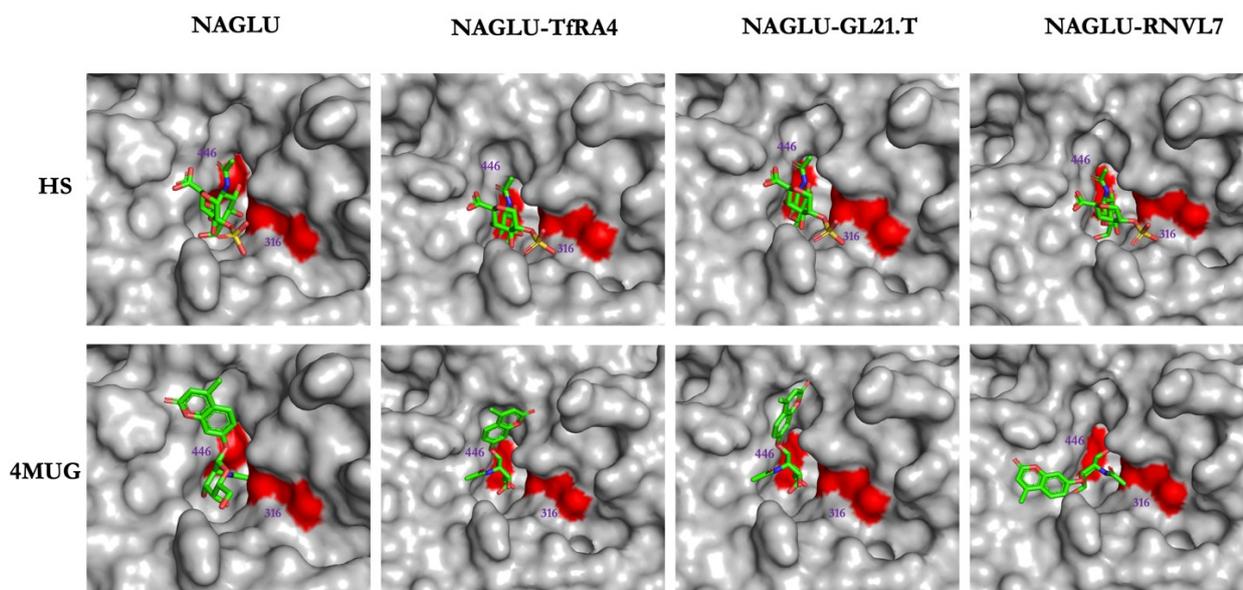
816

#### 817 6.3.1. Quimeras-sustratos

818

819 Una vez obtenidos los modelos, se hicieron los ensayos de acoplamiento molecular donde el  
820 punto de comparación para las quimeras fue la proteína nativa sin ningún tipo de  
821 conjugación. Tanto para las quimeras como para la proteína nativa, se utilizaron las  
822 coordenadas de la grilla informadas en la metodología. De las 20 conformaciones evaluadas,  
823 se seleccionó aquella con el menor valor de energía pero que también tuviese el mayor sentido  
824 biológico, es decir, que la parte del ligando correspondiente a la N-acetilglucosamina quedase  
825 orientada hacia el bolsillo catalítico (**Figura 7**).  
826

826



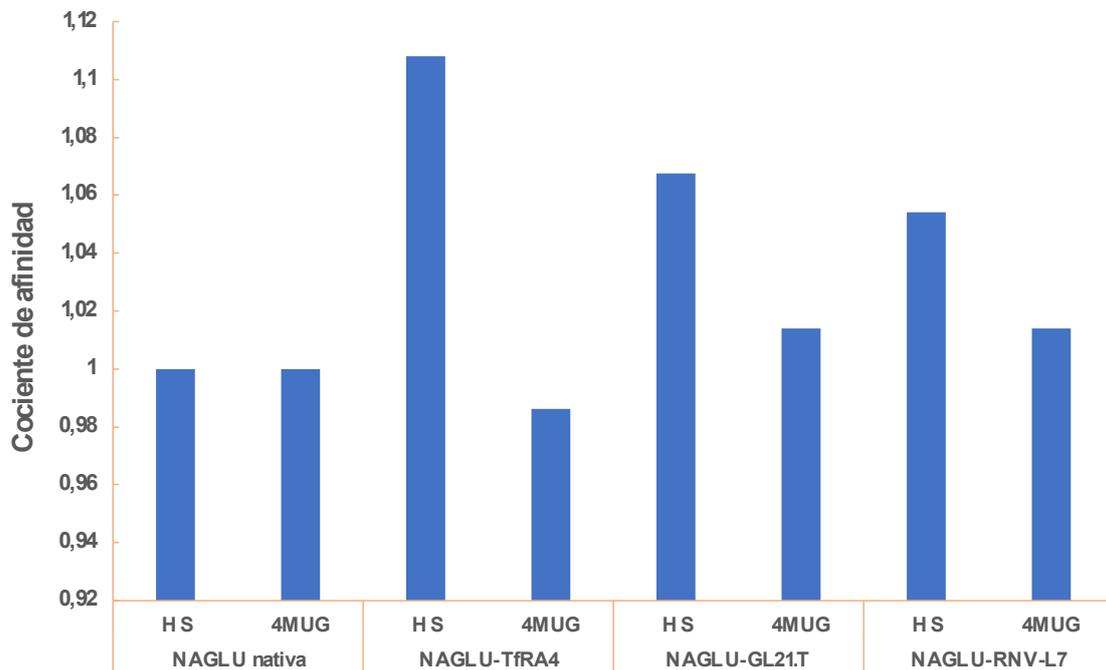
827

828 **Figura 7.** Posiciones de docking para los sustratos 4MUG y HS para los modelos de quimera y  
829 proteína nativa. En rojo se señalan los glutamatos catalíticos 316 y 446.  
830

830

831 La energía afinidad para el HS, en el modelo de NAGLU nativa fue de -7.4 kcal/mol, para  
832 NAGLU-TfRA4 fue de -8.2 kcal/mol, para NAGLU-GL21.T fue de -7.9 kcal/mol y  
833 finalmente para NAGLU-RNV-L7 fue de -7.8 kcal/mol. Para el caso de las energías  
834 obtenidas para el sustrato 4MUG, los modelos arrojaron los siguientes valores: -7.2 kcal/mol  
835 en NAGLU nativa, -7.1 kcal/mol en NAGLU-TfRA4, -7.3 kcal/mol en NAGLU-GL21.T y  
836 -7.3 kcal/mol en NAGLU-RNV-L7. Estas variaciones en la afinidad podrían llegar a  
837 representar mejoras y/o pérdidas en la misma. Por esto fue necesario hacer una relación de  
838 las afinidades de las quimeras respecto a la proteína nativa, de manera que se obtuvo un

839 cociente con el cual se pudo predecir el efecto de la conjugación de los aptámeros sobre la  
 840 afinidad hacia el HS y 4MUG (**Figura 8**).  
 841



842  
 843  
 844 **Figura 8.** Cociente de afinidad entre las quimeras y NAGLU nativa en función de los sustratos  
 845 4MUG y HS. Los valores de afinidad son reportados como veces contra los valores predichos para  
 846 cada sustrato acoplado con la proteína NAGLU nativa.

847  
 848 De esta forma, el comportamiento generalizado de la conjugación de los aptámeros sobre la  
 849 afinidad de los modelos hacia el HS, fue de pequeños incrementos en la afinidad en todos  
 850 los casos, excepto para TfR4 con 4MUG. Para la conjugación del aptámero TfR4 a  
 851 NAGLU se observó una mejoría de 1,11 veces en la afinidad por el HS pero también una  
 852 disminución en la afinidad de 0,99 veces por el 4MUG. Del mismo modo, la conjugación a  
 853 GL21.T representó una mejoría tanto para el HS como para 4MUG de 1,07 y 1,01 veces  
 854 respectivamente. Finalmente, para la conjugación con RNV-L7 la afinidad por el HS se vio  
 855 mejorada 1,05 veces, y por el 4MUG se mejoró 1,01 veces.

856  
 857 Para obtener información sobre el porqué en los cambios de las afinidades, de las posiciones  
 858 de docking obtenidas, fue posible dilucidar el diagrama de interacciones de cada sustrato en  
 859 los modelos. De manera inesperada, en cada uno de los modelos, no fue posible observar  
 860 interacción alguna entre los sustratos y los glutamatos 316 y 446, sin embargo fue posible  
 861 encontrar interacción con otros aminoácidos circundantes al sitio activo (**Tabla 3**).

862  
 863 **Tabla 3.** Interacciones presentes en los modelos. Se muestran las interacciones de cada modelo con  
 864 los respectivos sustratos, predominan las interacciones de tipo hidrofóbico.

Modelo	Sustrato	Tipo de interacción	Aminoácidos
NAGLU nativa	HS	Hidrofóbica	GLN350, TYR 644, GLN 645, LEU646, THR 647, LEU 648 GLY, 650.
		Puente de hidrógeno	TRP 201, GYL 269, ARG 514.

		Polar	ARG 514, GLN 645.
4MUG		Puente de hidrógeno	ARG 514
		Hidrofóbica	TYR 658, ASP 657, LEU 656, ILE 665 ASN 654, GLY 653.
HS		Hidrofóbica	TRP 649, LEU 648, THR 647, LEU 646, GLN 645.
		Puente de hidrógeno	TRP 201, GLY 269, ARG 514
NAGLU-TfRA4		Hidrofóbica	GLN 350.
	4MUG	Polar	TRP 352, LEU 353, PHE 354, GLN 355.
		Puente de hidrógeno	GLN 355, TRP 201.
NAGLU-GL21.T		Puente de hidrógeno	GLY 269, TRP 201, TYR 658, ARG 514.
	HS	Hidrofóbica	ASN 654, ILE 655, LEU 656, ASP 657, TYR 658, GLY 650 TRP 649.
4MUG		Puente de hidrógeno	GLN 355, ARG 510, TRP 201.
		Puente de hidrógeno	GLY 269, TRP 201, ARG 514
NAGLU-RNV-L7		Hidrofóbica	TYR 644, GLN 645, LEU 646, THR 647, LEU 648, TRP 649, GLY 650, GLY 653.
	4MUG	Hidrofóbica	ALA 659, ASN 660 TYT 140.

865

866 Las quimeras presentaron diferencias, respecto a la proteína nativa, en los aminoácidos que  
867 interactuaban con los ligandos y el tipo de interacción que estos tenían. También se observó  
868 un cambio en el número de interacciones donde la quimera TfRA4, con HS como ligando,  
869 presentó 5 interacciones de tipo hidrofóbico, dos interacciones menos que la proteína nativa.  
870 Caso contrario se presentó con la quimera NAGLU-RNV-L7 que generó 1 interacción más  
871 de tipo hidrofóbica respecto a la proteína nativa, en su interacción con el HS. En todos los  
872 modelos fue constante la formación de puentes de hidrógeno entre los aminoácidos GLY  
873 269, TRP 201, ARG 514 y el HS. Mientras que para el caso del 4MUG, las interacciones de  
874 tipo puente de hidrógeno no fueron constantes en todos los modelos. Para el caso de las  
875 interacciones hidrofóbicas, aunque fueron las más abundantes no se mantuvieron contantes,  
876 es decir, las regiones que presentaban este tipo de interacción no eran las mismas en todos  
877 los modelos.

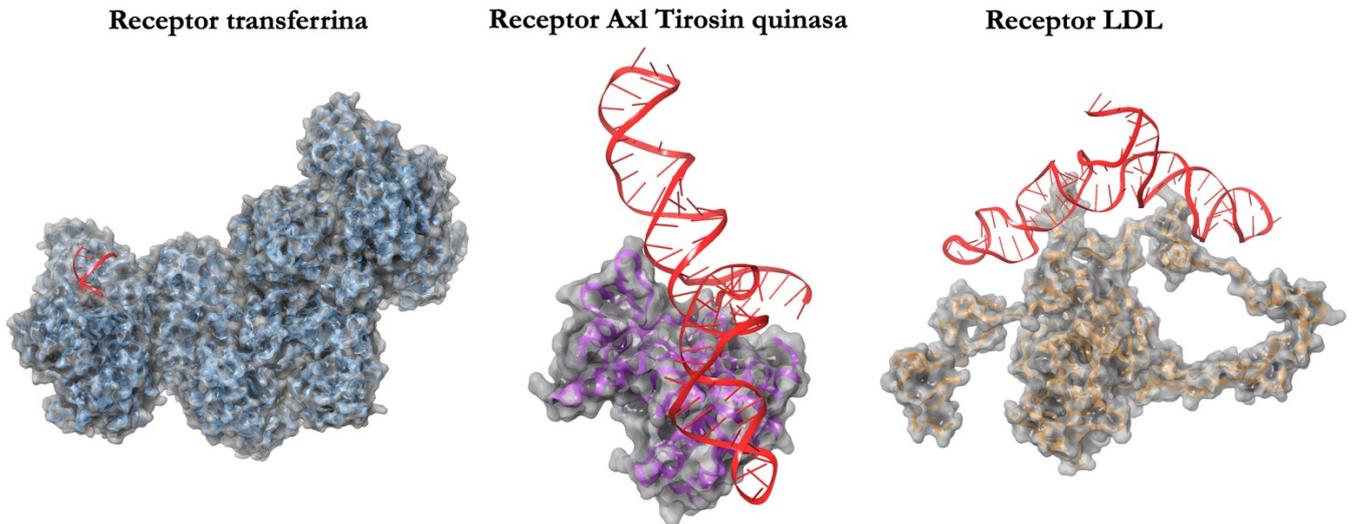
878

### 879 6.3.2. Quimeras-receptores

880

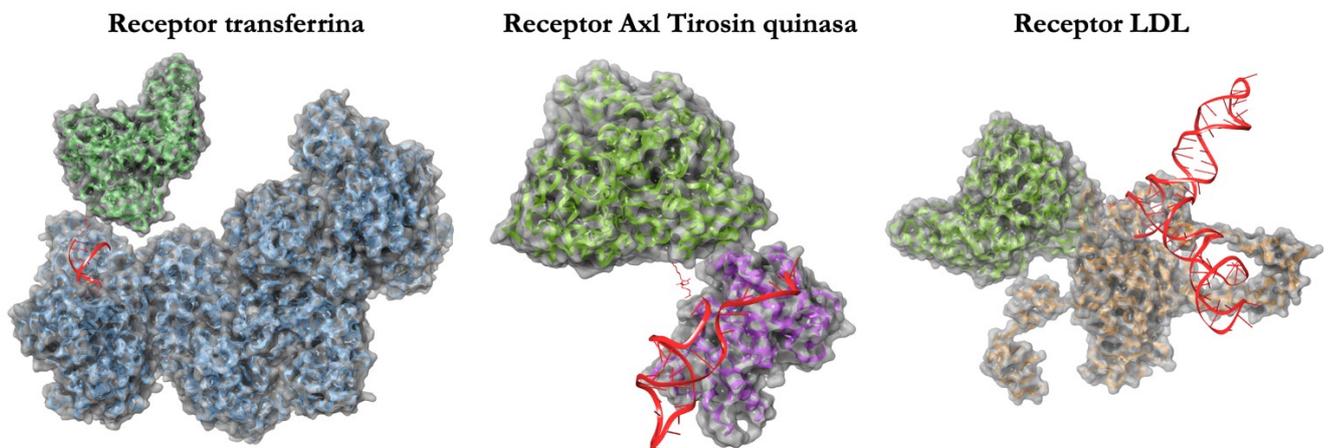
881 Para predecir como se vería afectada la afinidad de cada aptámero por su respectivo receptor  
882 tras la conjugación con la enzima NAGLU, en el servidor HDOCK y en vista de que no

883 existe información detallada de la interacción aptámero receptor, se eligieron los sitios de  
884 interacción del sustrato natural para cada receptor (**Figura 9**). De modo tal que para la  
885 evaluación de afinidad de TfRA4 frente al receptor de transferrina se eligió el dominio apical  
886 y el dominio similar a proteasa(79), para la evaluación de GL21.T frente al receptor Axl de  
887 tirosin quinasa se eligieron los aminoácidos 621, 622 y 623 (80), y para la evaluación de RNV-  
888 L7 frente al receptor de LDL se eligieron los aminoácidos que van desde el número 65 hasta  
889 el 277 (81).  
890



892  
893 **Figura 9.** Acoplamiento molecular aptámero-receptor realizado en el servidor HDOCK. Para cada  
894 acoplamiento se obtuvo un valor, de izquierda a derecha, de *Docking Score* de -245,57, -269,52 y -  
895 237,86, respectivamente.  
896

897 Una vez se completaron los acoplamientos se obtuvo que el *Docking Score* para cada aptámero  
898 y su respectivo receptor fue de -245,57, -26,52 y -237,86, respectivamente. Con este  
899 acoplamiento fue posible predecir los sitios de interacción entre los aptámeros y los  
900 receptores (**Anexo 1**) y así, fue posible lanzar el acoplamiento de las quimeras frente al  
901 receptor contra estas mismas regiones de los receptores (**Figura 10**) sin tener una  
902 interferencia mayor del componente proteico de la quimera sobre la interacción aptámero-  
903 receptor.  
904



906 **Figura 10.** Docking quimera-receptor realizado en HDOCK. Para cada docking se obtuvo un valor  
907 de *Docking Score*, de izquierda a derecha, de -122.35, -105.46 y -130.71, respectivamente.  
908

909 Para cada caso, se seleccionaron los modelos con el mejor valor de *Docking Score*. En este  
 910 sentido, los resultados predijeron que la adición del componente proteico afectó la afinidad  
 911 de los aptámeros por su receptor. Así entonces, los valores de *Docking Score* obtenidos para  
 912 las quimeras TfRA4, GL21.T y RNV-L7 fueron de -122.35, -105.46 y -130.71,  
 913 respectivamente, los cuales fueron 0,5, 0,39 y 0,55 veces menores que los predichos para los  
 914 aptámeros sin conjugar. Los residuos involucrados en el docking de las quimeras, así como  
 915 los del aptámero sin conjugar, se consignan en el **Anexo 2**.

916

917 Una vez concluidos los ensayos de acoplamiento, se adquirió el aptámero TfRA4 tiol 3' de  
 918 *Integrated DNA Technologies* (IDT, Coralville, IA) para la evaluación *in vitro* de la actividad  
 919 enzimática del conjugado. Se seleccionó este aptámero ya que este es este el que tiene la  
 920 evidencia experimental más robusta. Adicionalmente, los estudios computacionales con este  
 921 aptámero mostraron que la afinidad por los sustratos no se veía afectada en gran medida.

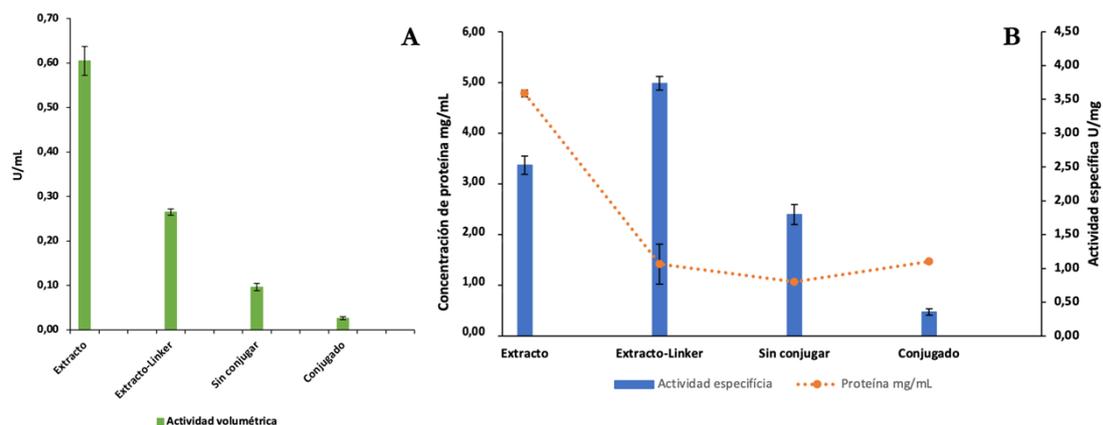
922

#### 923 6.4. Conjugación de aptámeros

924

925 Partiendo del extracto crudo se siguió la metodología de conjugación del aptámero. Se midió  
 926 proteína y actividad enzimática al inicio y final del proceso de cada uno de los tratamientos.  
 927 Se informó la actividad volumétrica (U/mL) y específica (U/mg) a partir de las proteínas  
 928 totales, los valores mostrados corresponden a triplicados (**Figura 11**).

929



930

931

932 **Figura 11.** Actividades volumétricas y específicas de las diferentes etapas del proceso de conjugación.  
 933 **A)** La actividad enzimática volumétrica al inicio del proceso fue de  $0,6 \pm 0,03$  U/mL, al final del  
 934 proceso se obtuvieron valores de actividad volumétrica de  $0,03 \pm 0,01$  U/mL. **B)** La actividad  
 935 enzimática específica al inicio del proceso fue de  $2,53 \pm 0,14$  U/mg, al final del proceso esta actividad  
 936 mostró un valor de  $0,36 \pm 0,04$  U/mg.

937

938 La actividad enzimática volumétrica y específica del extracto, que estuvo todo el tiempo a 4  
 939 °C, fue de  $0,6 \pm 0,03$  U/ml y  $2,53 \pm 0,14$  U/mg, respectivamente. Luego de las 2,5 horas a  
 940 temperatura ambiente, cuando se pusieron en contacto el sulfo-SMCC con la proteína, se  
 941 obtuvo una actividad de  $0,26 \pm 0,01$  U/mL y  $3,74 \pm 0,10$  U/mg, respectivamente. Cuando  
 942 se inició el proceso de conjugación, a la par se montó un control con la proteína sin ningún  
 943 tipo de tratamiento más allá de la exposición a las condiciones ambientales a las que se  
 944 sometió el conjugado. De esta manera para dicho control se obtuvo una actividad de  $0,06 \pm$   
 945  $0,01$  U/mL y  $1,80 \pm 0,15$  U/mg, respectivamente, mientras que para el conjugado se obtuvo  
 946 una actividad de  $0,03 \pm 0,01$  U/mL y  $0,36 \pm 0,04$  U/mg. Para confirmar la conjugación de  
 947 TfRA4 a NAGLU se hizo la medición de la relación de absorbancia 260/280 para ADN de  
 948 cadena sencilla en NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) (**Tabla 4**).

949  
950  
951  
952

**Tabla 4.** Verificación de conjugación en NanoDrop. Se obtuvo la relación 260/280 para ADN de cadena sencilla, donde el conjugado arrojó un valor de 1,19 y el control negativo de conjugación presentó un valor de 1,16.

Tratamiento	Absorbancia 260	Absorbancia 280	Relación 260/280
Conjugado	6,5	5,5	1,19
Control negativo de conjugación	11,1	9,6	1,16

953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961

En la verificación de conjugación se obtuvo que dicha relación para el conjugado era de 1,19 mientras que para el control negativo de conjugación era de 1,16. A pesar que el conjugado mostró una mayor relación 260/280, que podría ser un indicativo de la presencia del aptámero en el conjugado, dado que la diferencia con el control negativo no es muy grande, no es posible concluir de manera definitiva si el aptámero se encuentra unido o no a las proteínas presentes en el extracto, de ahí la necesidad de continuar con los esfuerzos por purificar la proteína y así evaluar el efecto que tiene la conjugación sobre NAGLU pura.

962

## 7. Discusión

963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980

Los estudios computacionales mostrados en el presente trabajo permiten predecir el efecto que tiene la conjugación de aptámeros sobre la afinidad de la proteína NAGLU por los sustratos 4MUG y HS. Los alineamientos estructurales realizados permitieron predecir que la conjugación de los aptámeros no afectó de forma importante la estructura de la proteína, considerando que los valores de Tm y RMSD estuvieron muy cercanos a 1 y por debajo de 2 Å, respectivamente (82). Estos resultados se ven respaldados por los estudios de Kozani, quien haciendo uso de estrategias de acoplamiento molecular demostró que la conjugación de un anticuerpo a una proteína asociada a cáncer, no representó un cambio estructural significativo sobre el anticuerpo y su capacidad de unión a su diana natural (83). La ausencia de interacción de los glutamatos 316 y 446, claves en la actividad catalítica de NAGLU, puede estar asociada a la diversidad de softwares utilizados en el tratamiento de las moléculas. Se plantea esta hipótesis porque al hacer toda la construcción y tratamiento de las moléculas en el paquete Maestro, los resultados de acoplamiento producto del software Autodock vina no mostraban ninguna posición biológicamente acertada, esto porque el bolsillo catalítico no tenía espacio suficiente para que las moléculas se acoplaran. Sería deseable la adquisición de una licencia que posibilite el uso sin restricción del software Maestro, ya que es aquí donde se hizo el tratamiento y construcción de todas las moléculas.

981  
982  
983  
984  
985  
986

Estudios previos realizados en el Instituto de Errores Innatos, donde las condiciones de acoplamiento fueron iguales a las del presente trabajo, mostraron que las interacciones que predominaban entre los glutamatos 316 y 446 y los sustratos HS y 4MUG eran las de tipo hidrofóbico (51), dando así una posible explicación a la presencia de las numerosas interacciones hidrofóbicas identificadas (Tabla 3).

987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995

Cuando se abordan los cambios en la afinidad de las quimeras por los sustratos, sería prácticamente intuitivo decir que la conjugación de los aptámeros representó una mejoría en la misma. Sin embargo, esto no es del todo así. Este efecto se debe a la escala con la que se presentan los resultados del cociente de afinidad (Figura 8). Si la escala se cambiara por ejemplo, de 0 a 10, dichos cambios que se percibían como una mejoría ahora serían prácticamente imperceptibles. Es por esto, que estos datos es mejor interpretarlos como una no afectación en la afinidad de la proteína por sus sustratos.

996 Ahora bien, la evaluación de acoplamiento de los aptámeros y quimeras frente a su receptor  
997 son valiosas porque simular la interacción de aptámeros, y en este caso, complejos proteína-  
998 aptámero conlleva a la obtención de información preliminar sobre los sitios de unión a la  
999 molécula diana y como estos se ven afectados por la conjugación de un componente proteico  
1000 de cara a que esta información pueda soportar y llegar a explicar tendencias en experimentos  
1001 *in vitro*. El modelado y posterior acoplamiento se han convertido en herramientas que han  
1002 demostrado aproximarse con efectividad a las resoluciones experimentales (50),  
1003 convirtiéndose así en un método que puede servir como de punto de partida para el  
1004 entendimiento de las interacciones de los aptámeros.  
1005

1006 En este estudio se predijo que los sitios de unión de los aptámeros a sus receptores diana son  
1007 distintos al sitio de unión de sus ligandos naturales (**Anexo 1**), esto conllevaría a la no  
1008 competencia de los aptámeros con los ligandos y de esta manera no se alteraría la función  
1009 normal de las células. Esto ya ha sido demostrado para versiones anteriores de TfRA4 (13).  
1010 Es importante resaltar que los cambios observados en los sitios de unión de las quimeras  
1011 respecto a los aptámeros libres pueden estar dados por el ruido que genera el componente  
1012 proteico y el linker sobre el receptor. El ejemplo más claro de esto es el acoplamiento sobre  
1013 los respectivos receptores de NAGLU-GL21.T y NAGLU-RNV-L7 comparado con los  
1014 aptámeros libres. El acoplamiento de las quimeras arrojó como resultado la interacción de  
1015 residuos del ligando, como aminoácidos de NAGLU y componentes del linker (**Anexo 2**),  
1016 mientras que los dockings de los aptámeros libres muestran únicamente interacción de los  
1017 nucleótidos con el receptor.  
1018

1019 Seleccionar el aptámero TfRA4 para las evaluaciones *in vitro*, no se sustentó únicamente en  
1020 la evidencia experimental que demuestra su uso, sino también en su diana, el receptor de  
1021 transferrina. La expresión de este receptor en la superficie de la BHE ha sido motivo de  
1022 estudio por sus implicaciones en los fenómenos de transporte a través de la barrera  
1023 hematoencefálica, específicamente en la transcitosis (72). El receptor de transferrina ha sido  
1024 el objetivo de numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* con el objetivo de administrar fármacos al  
1025 cerebro. Las estrategias utilizadas incluyen liposomas conjugados con transferrina utilizados  
1026 para la administración de ADN (84) o el uso de péptidos miméticos de hierro como ligando  
1027 (85). Ya que la transferrina en sangre tiene un elevado nivel, cuando se emplean estrategias  
1028 como las mencionadas anteriormente, la competencia con el ligando nativo por el receptor  
1029 es un fenómeno poco deseable; por esto se han desarrollado metodologías que involucran  
1030 anticuerpos anti-receptor de transferrina (anti-RTf) (86).  
1031

1032 Los retos que supone el uso de anti-RTf para la administración de fármacos al cerebro  
1033 incluyen la especificidad del tejido cerebral y la posible degradación lisosomal. El empleo de  
1034 ingeniería de proteínas ha demostrado que una reducción en la afinidad del anticuerpo por  
1035 la transferrina, resulta en menor degradación lisosomal (87). Sin embargo, para el caso de las  
1036 proteínas lisosomales este direccionamiento al lisosoma, derivado de una alta afinidad por el  
1037 receptor, es el fenómeno deseado. La evaluación de una proteína de fusión compuesta por  
1038 anti-RTf e iduronato-2-sulfatasa (IDS), denominada JR-141, demostró la reducción en la  
1039 acumulación de GAGs en los tejidos periféricos y en el cerebro de ratones deficientes de  
1040 IDS, demostrando así una prueba de concepto para el uso de esta proteína de fusión como  
1041 una terapia para MPSII (88). El uso de aptámeros, que reconozcan el receptor de transferrina,  
1042 conjugados a proteínas lisosomales solo ha sido probado una vez con el predecesor de  
1043 TfRA4, GS24. Dicho trabajo demostró que la conjugación de GS24 a la enzima alfa-L-  
1044 iduronidasa resultó en la corrección de la acumulación de GAGs (13), demostrando así el  
1045 direccionamiento hacia el lisosoma y la funcionalidad del conjugado dentro del organelo.  
1046

1047 Con la evidencia que respalda un enfoque hacia el receptor de transferrina, y de los aptámeros  
1048 como alternativa de los anticuerpos, se evaluó de manera *in vitro* el efecto que tenía la  
1049 conjugación de TfRA4 a NAGLU (**Figura 11**). Una vez realizada la conjugación se evidenció  
1050 la pérdida en la actividad volumétrica, lo cual podría estar asociado a la estabilidad que tiene  
1051 la proteína cuando se expone a 30 °C. La literatura reporta que la proteína expresada en el  
1052 ser humano es estable entre 0 y 23 °C, pero a 37 °C pierde el 45 % de actividad (89). No  
1053 existe reporte alguno de la estabilidad de la proteína cuando se expresa en *K. phaffii*, por lo  
1054 que los resultados aquí mostrados podrían configurarse como el primer reporte que aporta  
1055 información acerca de la estabilidad de la proteína expresada en *K. phaffii*. Respecto a la  
1056 actividad específica, determinada en función de las proteínas totales, es notorio que el punto  
1057 asociado al extracto-linker tiene un comportamiento anómalo, debido probablemente al  
1058 exceso de linker y linker no unido en la solución. La disminución está asociada a la pérdida  
1059 de proteínas en los procesos de lavado en el centrífugo de 30 kDa. Es pertinente recordar que  
1060 se trabajó con el extracto previamente concentrado a 30 kDa, donde no solo estaba NAGLU  
1061 y las proteínas secretadas por *K. phaffii*, teóricamente pocas (90), sino también las proteínas  
1062 del medio de cultivo. Podría considerarse que las pérdidas en actividad enzimática también  
1063 estarían asociadas al efecto que tienen los reactivos implicados en la conjugación. Sin  
1064 embargo, tanto el sulfo-SMCC como el TCEP no deberían tener un efecto nocivo sobre la  
1065 actividad ya que el primero, únicamente se une al extremo N-terminal de las proteínas que  
1066 para NAGLU es el Asp24. Y el TCEP como agente reductor afectaría los enlaces S-S, enlaces  
1067 que según la estructura cristalográfica no están presente en la proteína (25). Adicionalmente,  
1068 el uso de esta estrategia de conjugación ácido nucleico-proteína fue recientemente empleada  
1069 en nuestro grupo de investigación para la enzima fructosiltransferasa, demostrando que los  
1070 reactivos implicados durante la conjugación no afectaron la actividad de la enzima (54).

1071

## 1072 **8. Conclusiones**

1073

1074 Se lograron identificar 3 aptámeros como potenciales candidatos facilitadores del cruce a  
1075 través de la BHE para NAGLU. Las simulaciones computacionales permitieron predecir que  
1076 la conjugación de los aptámeros, de manera general, tuvo un efecto positivo sobre la afinidad  
1077 de NAGLU hacia el HS y el 4MUG. Efecto contrario se predijo sobre la afinidad de los  
1078 aptámeros hacia sus receptores. Del mismo modo, y de manera parcial, la evaluación *in vitro*  
1079 mostró un efecto negativo de la conjugación sobre la actividad enzimática de NAGLU. Sin  
1080 embargo, también es importante resaltar que las condiciones de conjugación no fueron las  
1081 adecuadas considerando la baja estabilidad de la proteína a temperatura ambiente.

1082

1083 Los resultados mostrados en este trabajo de grado, se configuran como el resultado del  
1084 aprovechamiento de las herramientas computacionales para afrontar una nueva idea donde  
1085 la información específica, como estructuras y sitios de unión, no está disponible. Del mismo  
1086 modo también significan una oportunidad de refinamiento para las metodologías empleadas,  
1087 por ejemplo, las condiciones de conjugación o el uso de softwares para seguir una misma  
1088 línea de condiciones. Los esfuerzos por conjugar la proteína purificada deben continuar en  
1089 pro de las evaluaciones *in vitro*.

1090

1091

1092

1093

## 1094 **9. Bibliografía**

1095

- 1096 1. Seker Yilmaz B, Davison J, Jones SA, Baruteau J. Novel therapies for mucopolysaccharidosis type  
1097 III. J Inherit Metab Dis. 2021;44(1):129-47.

- 1098 2. Harmatz P, Whitley CB, Wang RY, Bauer M, Song W, Haller C, et al. A novel Blind Start study  
1099 design to investigate vestronidase alfa for mucopolysaccharidosis VII, an ultra-rare genetic  
1100 disease. *Mol Genet Metab.* 2018;123(4):488-94.
- 1101 3. Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, function,  
1102 impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS.* 2020;17(1):69.
- 1103 4. Kan SH, Aoyagi-Scharber M, Le SQ, Vincelette J, Ohmi K, Bullens S, et al. Delivery of an enzyme-  
1104 IGFII fusion protein to the mouse brain is therapeutic for mucopolysaccharidosis type IIIB. *Proc*  
1105 *Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(41):14870-5.
- 1106 5. Zhou QH, Boado RJ, Lu JZ, Hui EK, Pardridge WM. Monoclonal antibody-glial-derived  
1107 neurotrophic factor fusion protein penetrates the blood-brain barrier in the mouse. *Drug Metab*  
1108 *Dispos.* 2010;38(4):566-72.
- 1109 6. Diamond B, Honig G, Mader S, Brimberg L, Volpe BT. Brain-reactive antibodies and disease.  
1110 *Annu Rev Immunol.* 2013;31:345-85.
- 1111 7. Farber SH, Elsamadicy AA, Atik AF, Suryadevara CM, Chongsathidkiet P, Fecci PE, et al. The  
1112 Safety of available immunotherapy for the treatment of glioblastoma. *Expert Opin Drug Saf.*  
1113 2017;16(3):277-87.
- 1114 8. Jayasena SD. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin*  
1115 *Chem.* 1999;45(9):1628-50.
- 1116 9. Zhou G, Latchoumanin O, Hebbard L, Duan W, Liddle C, George J, et al. Aptamers as targeting  
1117 ligands and therapeutic molecules for overcoming drug resistance in cancers. *Adv Drug Deliv*  
1118 *Rev.* 2018;134:107-21.
- 1119 10. Macdonald J, Denoyer D, Henri J, Jamieson A, Burvenich IJG, Pouliot N, et al. Bifunctional  
1120 Aptamer-Doxorubicin onjugate Crosses the Blood-Brain Barrier and Selectively Delivers Its  
1121 Payload to EpCAM-Positive Tumor Cells. *Nucleic Acid Ther.* 2020;30(2):117-28.
- 1122 11. Zhang Y, He J, Shen L, Wang T, Yang J, Li Y, et al. Brain-targeted delivery of obidoxime, using  
1123 aptamer-modified liposomes, for detoxification of organophosphorus compounds. *J Control*  
1124 *Release.* 2021;329:1117-28.
- 1125 12. Li X, Yang Y, Zhao H, Zhu T, Yang Z, Xu H, et al. Enhanced in Vivo Blood-Brain Barrier  
1126 Penetration by Circular Tau-Transferrin Receptor Bifunctional Aptamer for Tauopathy Therapy.  
1127 *J Am Chem Soc.* 2020;142(8):3862-72.
- 1128 13. Chen CH, Dellamaggiore KR, Ouellette CP, Sedano CD, Lizadjohry M, Chernis GA, et al.  
1129 Aptamer-based endocytosis of a lysosomal enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.*  
1130 2008;105(41):15908-13.
- 1131 14. Khan SA, Peracha H, Ballhausen D, Wiesbauer A, Rohrbach M, Gautschi M, et al. Epidemiology  
1132 of mucopolysaccharidoses. *Mol Genet Metab.* 2017;121(3):227-40.
- 1133 15. Puentes-Tellez MA, Lerma-Barbosa PA, Garzón-Jaramillo RG, Suarez DA, Espejo-Mojica AJ,  
1134 Guevara JM, et al. A perspective on research, diagnosis, and management of lysosomal storage  
1135 disorders in Colombia. *Heliyon.* 2020;6(3):e03635.
- 1136 16. Kan SH, Troitskaya LA, Sinow CS, Haitz K, Todd AK, Di Stefano A, et al. Insulin-like growth  
1137 factor II peptide fusion enables uptake and lysosomal delivery of  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase to  
1138 mucopolysaccharidosis type IIIB fibroblasts. *Biochem J.* 2014;458(2):281-9.
- 1139 17. Das SK. Inborn errors of metabolism: challenges and management. *Indian journal of clinical*  
1140 *biochemistry : IJCB.* 2013;28(4):311-3.
- 1141 18. Waters D, Adeloye D, Woolham D, Wastnedge E, Patel S, Rudan I. Global birth prevalence and  
1142 mortality from inborn errors of metabolism: a systematic analysis of the evidence. *Journal of*  
1143 *global health.* 2018;8(2):021102-.
- 1144 19. Rice GM, Steiner RD. Inborn Errors of Metabolism (Metabolic Disorders). *Pediatr Rev.*  
1145 2016;37(1):3-15; quiz 6-7, 47.

- 1146 20. Gambello MJ, Li H. Current strategies for the treatment of inborn errors of metabolism. *J Genet*  
1147 *Genomics*. 2018;45(2):61-70.
- 1148 21. Stockler-Ipsiroglu S, Potter BK, Yuskiv N, Tingley K, Patterson M, van Karnebeek C.  
1149 Developments in evidence creation for treatments of inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab*  
1150 *Dis*. 2021;44(1):88-98.
- 1151 22. Winchester B, Vellodi A, Young E. The molecular basis of lysosomal storage diseases and their  
1152 treatment. *Biochem Soc Trans*. 2000;28(2):150-4.
- 1153 23. Nakato H, Li JP. Chapter Seven - Functions of Heparan Sulfate Proteoglycans in Development:  
1154 Insights From *Drosophila* Models. In: Jeon KW, editor. *International Review of Cell and*  
1155 *Molecular Biology*. 325: Academic Press; 2016. p. 275-93.
- 1156 24. Ficko-Blean E, Stubbs KA, Nemirovsky O, Vocadlo DJ, Boraston AB. Structural and mechanistic  
1157 insight into the basis of mucopolysaccharidosis IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A*.  
1158 2008;105(18):6560-5.
- 1159 25. Birrane G, Dassier AL, Romashko A, Lundberg D, Holmes K, Cottle T, et al. Structural  
1160 characterization of the  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase, a key enzyme in the pathogenesis of Sanfilippo  
1161 syndrome B. *J Struct Biol*. 2019;205(3):65-71.
- 1162 26. Jakobkiewicz-Banecka J, Gabig-Ciminska M, Kloska A, Malinowska M, Piotrowska E, Banecka-  
1163 Majkutewicz Z, et al. Glycosaminoglycans and mucopolysaccharidosis type III. *Front Biosci*  
1164 (Landmark Ed). 2016;21:1393-409.
- 1165 27. Zelei T, Csetneki K, Vokó Z, Siffel C. Epidemiology of Sanfilippo syndrome: results of a  
1166 systematic literature review. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(1):53.
- 1167 28. Andrade F, Aldámiz-Echevarría L, Llarena M, Couce ML. Sanfilippo syndrome: Overall review.  
1168 *Pediatr Int*. 2015;57(3):331-8.
- 1169 29. Wilkinson FL, Holley RJ, Langford-Smith KJ, Badrinath S, Liao A, Langford-Smith A, et al.  
1170 Neuropathology in mouse models of mucopolysaccharidosis type I, IIIA and IIIB. *PLoS One*.  
1171 2012;7(4):e35787.
- 1172 30. Leal AF, Espejo-Mojica AJ, Sánchez OF, Ramírez CM, Reyes LH, Cruz JC, et al. Lysosomal  
1173 storage diseases: current therapies and future alternatives. *J Mol Med (Berl)*. 2020;98(7):931-46.
- 1174 31. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and  
1175 challenges. *Front Microbiol*. 2014;5:172.
- 1176 32. Zhao KW, Neufeld EF. Purification and characterization of recombinant human alpha-N-  
1177 acetylglucosaminidase secreted by Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif*.  
1178 2000;19(1):202-11.
- 1179 33. Weber B, Hopwood JJ, Yogalingam G. Expression and Characterization of Human Recombinant  
1180 and  $\alpha$ -N-Actylglucosaminidase. *Protein Expression and Purification*. 2001;21(2):251-9.
- 1181 34. Triana H. Evaluación de la enzima alfa-N-acetilglucosaminidasa humana recombinante obtenida  
1182 en *Komagataella phaffii* GS115 en un modelo in vitro de fibroblastos MPS IIIB.: Pontificia Universidad  
1183 Javeriana; 2021.
- 1184 35. Muenzer J, Beck M, Giugliani R, Suzuki Y, Tyłki-Szymanska A, Valayannopoulos V, et al.  
1185 Idursulfase treatment of Hunter syndrome in children younger than 6 years: results from the  
1186 Hunter Outcome Survey. *Genet Med*. 2011;13(2):102-9.
- 1187 36. Yogalingam G, Luu AR, Prill H, Lo MJ, Yip B, Holtzinger J, et al. BMN 250, a fusion of lysosomal  
1188 alpha-N-acetylglucosaminidase with IGF2, exhibits different patterns of cellular uptake into  
1189 critical cell types of Sanfilippo syndrome B disease pathogenesis. *PLoS One*. 2019;14(1):e0207836.
- 1190 37. Cleary M, Muschol N, Couce ML, Harmatz P, Lee J, Lin S-P, et al. ICV-administered traletsinidase  
1191 alfa (BMN 250 NAGLU-IGF2) is well-tolerated and reduces heparan sulfate accumulation in the  
1192 CNS of subjects with Sanfilippo syndrome type B (MPS IIIB). *Molecular Genetics and*  
1193 *Metabolism*. 2019;126(2):S40.

- 1194 38. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*.  
1195 1990;346(6287):818-22.
- 1196 39. Sakamoto T, Ennifar E, Nakamura Y. Thermodynamic study of aptamers binding to their target  
1197 proteins. *Biochimie*. 2018;145:91-7.
- 1198 40. Pulgar VM. Transcytosis to Cross the Blood Brain Barrier, New Advancements and Challenges.  
1199 *Front Neurosci*. 2018;12:1019.
- 1200 41. Lu W. Adsorptive-mediated brain delivery systems. *Current pharmaceutical biotechnology*.  
1201 2012;13(12):2340-8.
- 1202 42. Stewart PA. Endothelial vesicles in the blood–brain barrier: are they related to permeability?  
1203 *Cellular and molecular neurobiology*. 2000;20(2):149-63.
- 1204 43. Bayat P, Nosrati R, Alibolandi M, Rafatpanah H, Abnous K, Khedri M, et al. SELEX methods  
1205 on the road to protein targeting with nucleic acid aptamers. *Biochimie*. 2018;154:132-55.
- 1206 44. Song Y, Zhu Z, An Y, Zhang W, Zhang H, Liu D, et al. Selection of DNA aptamers against  
1207 epithelial cell adhesion molecule for cancer cell imaging and circulating tumor cell capture. *Anal*  
1208 *Chem*. 2013;85(8):4141-9.
- 1209 45. Lollo B, Steele F, Gold L. Beyond antibodies: new affinity reagents to unlock the proteome.  
1210 *Proteomics*. 2014;14(6):638-44.
- 1211 46. Shao K, Ding W, Wang F, Li H, Ma D, Wang H. Emulsion PCR: a high efficient way of PCR  
1212 amplification of random DNA libraries in aptamer selection. *PLoS One*. 2011;6(9):e24910.
- 1213 47. Horn AHC. *Essentials of Computational Chemistry, Theories and Models* By Christopher J.  
1214 Cramer. Wiley: Chichester, England. 2002. 562 pp. ISBN 0-471-48551-9 (hardcover). \$110. ISBN  
1215 0-471-48552-7 (paperback). \$45. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*.  
1216 2003;43(5):1720-.
- 1217 48. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new  
1218 scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*.  
1219 2010;31(2):455-61.
- 1220 49. Kontoyianni M. Docking and Virtual Screening in Drug Discovery. *Methods Mol Biol*.  
1221 2017;1647:255-66.
- 1222 50. Albada HB, Golub E, Willner I. Computational docking simulations of a DNA-aptamer for  
1223 argininamide and related ligands. *J Comput Aided Mol Des*. 2015;29(7):643-54.
- 1224 51. Camilo LJ. In silico identification and characterization of potential orthosteric and allometr  
1225 pharmacological chaperones of the NAGLU enzyme and evaluation of their chaperone effect in  
1226 vitro: Pontificia Universidad Javeriana; 2021.
- 1227 52. Yan Y, Tao H, He J, Huang S-Y. The HDOCK server for integrated protein–protein docking.  
1228 *Nature Protocols*. 2020;15(5):1829-52.
- 1229 53. Du Y, Hughes RA, Bhadra S, Jiang YS, Ellington AD, Li B. A Sweet Spot for Molecular  
1230 Diagnostics: Coupling Isothermal Amplification and Strand Exchange Circuits to Glucometers.  
1231 *Scientific Reports*. 2015;5(1):11039.
- 1232 54. Villada S. Uso de la enzima Fructosiltransferasa de *Aspergillus oryzae* N74 como parte de  
1233 un conjugado para cuantificación indirecta de ADN con glucosa como variable de  
1234 respuesta . . 2021.
- 1235 55. Henri J, Bayat N, Macdonald J, Shigdar S. A guide to using nucleic acid aptamers in cell based  
1236 assays. 2019.
- 1237 56. Bukari B, Samarasinghe RM, Noibanchong J, Shigdar SL. Non-Invasive Delivery of Therapeutics  
1238 into the Brain: The Potential of Aptamers for Targeted Delivery. *Biomedicines*. 2020;8(5).
- 1239 57. Cheng C, Chen YH, Lennox KA, Behlke MA, Davidson BL. In vivo SELEX for Identification  
1240 of Brain-penetrating Aptamers. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2013;2:e67.

- 1241 58. Wilner SE, Wengerter B, Maier K, de Lourdes Borba Magalhães M, Del Amo DS, Pai S, et al. An  
1242 RNA Alternative to Human Transferrin: A New Tool for Targeting Human Cells. *Molecular*  
1243 *Therapy - Nucleic Acids*. 2012;1:e21.
- 1244 59. Porciani D, Signore G, Marchetti L, Mereghetti P, Nifosi R, Beltram F. Two Interconvertible  
1245 Folds Modulate the Activity of a DNA Aptamer Against Transferrin Receptor. *Molecular Therapy*  
1246 *- Nucleic Acids*. 2014;3.
- 1247 60. Cerchia L, Esposito CL, Camorani S, Rienzo A, Stasio L, Insabato L, et al. Targeting Axl with an  
1248 high-affinity inhibitory aptamer. *Mol Ther*. 2012;20(12):2291-303.
- 1249 61. Monaco I, Camorani S, Colecchia D, Locatelli E, Calandro P, Oudin A, et al. Aptamer  
1250 Functionalization of Nanosystems for Glioblastoma Targeting through the Blood-Brain Barrier.  
1251 *J Med Chem*. 2017;60(10):4510-6.
- 1252 62. Shi S, Fu W, Lin S, Tian T, Li S, Shao X, et al. Targeted and effective glioblastoma therapy via  
1253 aptamer-modified tetrahedral framework nucleic acid-paclitaxel nanoconjugates that can pass the  
1254 blood brain barrier. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2019;21:102061.
- 1255 63. Iaboni M, Fontanella R, Rienzo A, Capuozzo M, Nuzzo S, Santamaria G, et al. Targeting Insulin  
1256 Receptor with a Novel Internalizing Aptamer. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2016;5:e365.
- 1257 64. Wang T, Rahimizadeh K, Veedu RN. Development of a Novel DNA Oligonucleotide Targeting  
1258 Low-Density Lipoprotein Receptor. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;19:190-8.
- 1259 65. Macdonald J, Houghton P, Xiang D, Duan W, Shigdar S. Truncation and Mutation of a  
1260 Transferrin Receptor Aptamer Enhances Binding Affinity. *Nucleic Acid Ther*. 2016;26(6):348-54.
- 1261 66. Macdonald J, Henri J, Goodman L, Xiang D, Duan W, Shigdar S. Development of a Bifunctional  
1262 Aptamer Targeting the Transferrin Receptor and Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM)  
1263 for the Treatment of Brain Cancer Metastases. *ACS Chem Neurosci*. 2017;8(4):777-84.
- 1264 67. Maier KE, Jangra RK, Shieh KR, Cureton DK, Xiao H, Snapp EL, et al. A New Transferrin  
1265 Receptor Aptamer Inhibits New World Hemorrhagic Fever Mammarenavirus Entry. *Molecular*  
1266 *Therapy - Nucleic Acids*. 2016;5.
- 1267 68. Hiraga T, Ito S, Nakamura H. EpCAM expression in breast cancer cells is associated with  
1268 enhanced bone metastasis formation. *Int J Cancer*. 2016;138(7):1698-708.
- 1269 69. Esposito CL, Nuzzo S, Kumar SA, Rienzo A, Lawrence CL, Pallini R, et al. A combined  
1270 microRNA-based targeted therapeutic approach to eradicate glioblastoma stem-like cells. *J*  
1271 *Control Release*. 2016;238:43-57.
- 1272 70. Cantanhede IG, de Oliveira JRM. PDGF Family Expression in Glioblastoma Multiforme: Data  
1273 Compilation from Ivy Glioblastoma Atlas Project Database. *Sci Rep*. 2017;7(1):15271.
- 1274 71. Camorani S, Esposito CL, Rienzo A, Catuogno S, Iaboni M, Condorelli G, et al. Inhibition of  
1275 receptor signaling and of glioblastoma-derived tumor growth by a novel PDGFR $\beta$  aptamer. *Mol*  
1276 *Ther*. 2014;22(4):828-41.
- 1277 72. Lajoie JM, Shusta EV. Targeting receptor-mediated transport for delivery of biologics across the  
1278 blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015;55:613-31.
- 1279 73. Yunn NO, Koh A, Han S, Lim JH, Park S, Lee J, et al. Agonistic aptamer to the insulin receptor  
1280 leads to biased signaling and functional selectivity through allosteric modulation. *Nucleic Acids*  
1281 *Res*. 2015;43(16):7688-701.
- 1282 74. Duffy KR, Pardridge WM. Blood-brain barrier transcytosis of insulin in developing rabbits. *Brain*  
1283 *Res*. 1987;420(1):32-8.
- 1284 75. Coloma MJ, Lee HJ, Kurihara A, Landaw EM, Boado RJ, Morrison SL, et al. Transport across  
1285 the primate blood-brain barrier of a genetically engineered chimeric monoclonal antibody to the  
1286 human insulin receptor. *Pharm Res*. 2000;17(3):266-74.
- 1287 76. Ueno M, Wu B, Nakagawa T, Nagai Y, Onodera M, Huang CL, et al. The expression of LDL  
1288 receptor in vessels with blood-brain barrier impairment in a stroke-prone hypertensive model.  
1289 *Histochem Cell Biol*. 2010;133(6):669-76.

- 1290 77. Brinkley M. A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and  
1291 crosslinking reagents. *Bioconjugate Chemistry*. 1992;3(1):2-13.
- 1292 78. Thermofisher. SMCC and Sulfo-SMCC 2018 [Available from:  
1293 [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011295_SMCC_SulfoSMCC_UG.pdf)  
1294 [connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011295_SMCC_SulfoSMCC_UG.pdf)  
1295 [Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011295\\_SMCC\\_SulfoSMCC\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011295_SMCC_SulfoSMCC_UG.pdf).
- 1296 79. Lawrence CM, Ray S, Babyonyshev M, Galluser R, Borhani DW, Harrison SC. Crystal Structure  
1297 of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor. *Science*. 1999;286(5440):779-82.
- 1298 80. Gajiwala KS, Grodsky N, Bolaños B, Feng J, Ferre R, Timofeevski S, et al. The Axl kinase domain  
1299 in complex with a macrocyclic inhibitor offers first structural insights into an active TAM receptor  
1300 kinase. *J Biol Chem*. 2017;292(38):15705-16.
- 1301 81. Rudenko G, Henry L, Henderson K, Ichtchenko K, Brown MS, Goldstein JL, et al. Structure of  
1302 the LDL Receptor Extracellular Domain at Endosomal pH. *Science*. 2002;298(5602):2353-8.
- 1303 82. Zhang Y, Skolnick J. Scoring function for automated assessment of protein structure template  
1304 quality. *Proteins*. 2004;57(4):702-10.
- 1305 83. Safarzadeh Kozani P. In Silico Designing of a Novel Antibody Conjugate as a Potential  
1306 Immunotherapeutic for the Treatment of CD19-Positive Hematologic Malignancies. *Trends in*  
1307 *Med Sci*. 2021;1(2):e117219.
- 1308 84. Sharma G, Modgil A, Layek B, Arora K, Sun C, Law B, et al. Cell penetrating peptide tethered bi-  
1309 ligand liposomes for delivery to brain in vivo: Biodistribution and transfection. *Journal of*  
1310 *Controlled Release*. 2013;167(1):1-10.
- 1311 85. Staquicini FI, Ozawa MG, Moya CA, Driessen WH, Barbu EM, Nishimori H, et al. Systemic  
1312 combinatorial peptide selection yields a non-canonical iron-mimicry mechanism for targeting  
1313 tumors in a mouse model of human glioblastoma. *The Journal of clinical investigation*.  
1314 2011;121(1):161-73.
- 1315 86. Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated  
1316 endocytosis pathway. *Pharmacological reviews*. 2002;54(4):561-87.
- 1317 87. Yu YJ, Zhang Y, Kenrick M, Hoyte K, Luk W, Lu Y, et al. Boosting brain uptake of a therapeutic  
1318 antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Science translational medicine*.  
1319 2011;3(84):84ra44-84ra44.
- 1320 88. Sonoda H, Morimoto H, Yoden E, Koshimura Y, Kinoshita M, Golovina G, et al. A Blood-Brain-  
1321 Barrier-Penetrating Anti-human Transferrin Receptor Antibody Fusion Protein for  
1322 Neuronopathic Mucopolysaccharidosis II. *Mol Ther*. 2018;26(5):1366-74.
- 1323 89. Den Tandt WR, Scharpé S. Micromethod determination of N-acetyl-alpha-D-glucosaminidase in  
1324 human leukocytes and study of some of its characteristics. *Int J Biochem*. 1993;25(2):209-12.
- 1325 90. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements  
1326 and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*.  
1327 2014;98(12):5301-17.

1328  
1329  
1330  
1331  
1332  
1333  
1334  
1335

## 10. Anexos

1337  
1338

**Anexo 1.** Sitios de unión para el docking aptámero-receptor predichos en HDCK

Aptámero	Residuos de la interfaz del receptor	Residuos de la interfaz del ligando	Residuos pares de la interfaz receptor ligando
<b>TfRA4</b>	LYS 241A, ASP 245A, ASN 251A , ALA 269A, ASN 270A, GLU 272A, SER, 273A, LEU 274A, ASN 275A, LEU 303A, PRO 330A, ASN 331A, VAL 690A, GLU 694A, SER 695A, PRO 696A, PHE 697A, SER 704A, GLY 705A, SER 706A, HIS 707A, ALA 711A, GLN 721A, ASN 722A, ASN 723A, GLY 724A, ALA 725A, ASN 727A, LEU 730A, NAG 761A, NAG 763A.	G 1A, C 2A, G 3A, T 4A, G 5A, G 6A, T 7A, A 8A, C 9A, C 10A, A 11A, C 12A, G 13A, C 14A.	241A - 9A, 241A - 10A, 245A - 1A, 251A - 14A 269A - 10A, 269A - 11A, 270A - 10A, 270A - 11A, 272A - 11A, 272A - 12A, 273A - 11A, 273A - 12A, 274A - 1A, 275A - 12A, 275A - 13A, 275A - 14A, 303A - 9A, 303A - 10A, 330A - 11A, 331A - 12A, 690A - 8A, 694A - 7A, 694A - 9A, 695A - 7A, 695A - 8A, 695A - 9A, 696A - 9A, 697A - 9A, 704A - 9A, 705A - 8A, 705A - 9A, 706A - 7A, 706A - 8A, 706A - 9A, 707A - 8A, 711A - 9A, 721A - 1A, 721A - 2A, 722A - 3A, 723A - 1A, 723A - 2A, 723A - 3A, 724A - 2A, 724A - 3A, 724A - 4A, 725A - 2A, 727A - 6A, 730A - 6A, 761A - 14A, 763A - 4A, 763A - 5A, 763A - 6A, 763A - 8A
	LEU 538A, GLY 539A LYS 540A, THR 541A LEU 542A, GLY 543A GLU 552A, LYS 563A PHE 622A, LYS 624A HIS 625A, GLY 626A ASP 627A, HIS 629A SER 630A, LEU 633A TYR 634A, LEU 637A ASP 639A, GLN 640A ARG 676A, PRO 712A LYS 714A, TRP 715A THR 748A, GLU 754A ASN 755A.	U 2A, G 3A, A 4A, U 5A, C 6A, A 7A, T 9A, C 10A, G 11A C 12A, U 31A, C 32A, A 33A, C 34A	538A - 11A, 538A - 12A, 539A - 10A, 539A - 11A, 539A - 12A, 540A - 10A, 540A - 11A, 540A - 31A, 540A - 32A, 541A - 9A, 541A - 10A, 542A - 9A, 542A - 10A, 542A - 32A, 543A - 9A, 552A - 11A, 552A - 31A, 552A - 32A, 563A - 31A, 563A - 32A, 622A - 31A, 622A - 32A, 624A - 31A, 624A - 32A, 624A - 33A, 625A - 33A, 626A - 33A, 627A - 5A, 627A - 6A, 629A - 5A, 629A - 6A, 630A - 6A, 630A - 7A, 633A - 6A, 634A - 33A, 634A - 34A, 637A - 6A, 639A - 34A, 640A - 34A, 676A - 4A, 676A - 5A, 676A - 6A, 712A - 4A, 712A - 5A, 714A - 3A, 715A - 4A, 715A - 5A, 748A -

			3A, 748A - 4A, 748A - 5A, 754A - 2A, 754A - 3A, 755A - 3A, 755A - 4A .
			135A - 54A, 159A - 53A, 164A - 70A, 165A - 69A, 165A - 70A, 166A - 69A, 166A - 70A, 167A - 48A, 167A - 51A, 167A - 52A, 167A - 53A, 167A - 68A, 167A - 69A, 167A - 70A, 167A - 71A, 168A - 48A, 168A - 50A, 168A - 51A, 168A - 70A, 169A - 47A, 169A - 48A, 169A - 49A, 169A - 70A, 169A - 71A, 169A - 72A, 170A - 49A, 170A - 72A, 171A - 49A, 216A - 14A, 218A - 14A, 218A - 31A, 218A - 32A, 219A - 31A, 220A - 30A, 220A - 31A, 221A - 30A, 229A - 13A, 230A - 32A, 231A - 31A, 231A - 32A, 232A - 12A, 233A - 31A, 233A - 32A, 234A - 30A, 234A - 31A, 234A - 32A, 235A - 32A, 246A - 31A, 247A - 31A, 249A - 30A, 249A - 31A.
<b>RNV-L7</b>	ASP 154A, TRP 159A, ASP 172A, SER 173A, SER 174A, PRO 175A, ALA 178A, HIS 182A, VAL 212A, ALA 213A, THR 214A, CYS 215A, ARG 216A, PRO 217A, ASP 218A, GLU 219A, PHE 220A, GLY 225A, ASN 226A, CYS 227A, ILE 228A, HIS 229A, GLY 230A, SER 231A, ARG 232A, GLN 233A.	C 12A, A 13A, C 14A, G 30A, G 31A, U 32A, C 47A, G 48A, A 49A, G 50A, G 51A, U 52A, A 53A, G 54A, G 68A, U 69A, G 70A, U 71A, G 72A.	

1340

1341

1342

## Anexo 2. Sitios de unión para el docking quimera-receptor predichos en HDock

<b>Aptámero</b>	<b>Residuos de la interfaz del receptor</b>	<b>Residuos de la interfaz del ligando</b>	<b>Residuos pares de la interfaz receptor ligando</b>
<b>NAGLU-TfRA4</b>	LYS 241A, GLU 244A, ASP 245A, LEU 246A, ASN 251A, ALA 269A, ASN 270A, GLU 272A, SER 273A, LEU 274A, ASN 275A, LEU 303A, LEU 329A, PRO 330A, ASN 331A, GLU 694A, SER 695A, SER 704A, GLY 705A, SER 706A, HIS 707A, ASN 727A, LEU 730A, NAG 761A, NAG 763A.	G 1A, C 2A, G 5A, G 6A, T 7A, A 8A, C 9A, C 10A, A 11A, C 12A, G 13A, C 14A, UNK 0.	241A - 1A, 241A - 10A, 244A - 1A, 245A - 1A, 246A - 1A, 251A - 1A, 251A - 14A, 269A - 10A, 269A - 11A, 270A - 10A, 272A - 11A, 272A - 12A, 273A - 1A, 273A - 2A, 273A - 12A, 274A - 1A, 275A - 1A, 275A - 2A, 275A - 12A, 275A - 13A, 275A - 14A, 303A - 9A, 303A - 10A, 329A - 11A, 330A - 11A, 331A - 12A, 694A - 7A, 694A - 9A, 695A - 7A, 695A - 8A, 695A - 9A, 704A - 9A, 705A -

---

**NAGLU-GL21.T**

LYS 540A, LEU 542A,  
GLY 543A, GLU 544A,  
GLY 545A, GLU 546A,  
PHE 547A, GLY 548A,  
ALA 549A, VAL 550A,  
GLU 552A, LYS 563A,  
LYS 567A, PHE 622A,  
LYS 624A, HIS 625A,  
GLY 626A, ASP 627A,  
LEU 628A, HIS 629A,  
LEU 633A, ARG 636A,  
LEU 637A, ASP 639A,  
GLN 640A, PRO 641A,  
ASP 672A, ALA 674A,  
ARG 676A, ASN 677A,  
CYS 678A, MET 679A,  
ASP 690A, PRO 712A,  
GLY 746A, GLN 747A,  
THR 748A, PRO 749A,  
PRO 751A, GLY 752A,  
GLN 770A, ALA 772A.

ALA 26A, ALA 29A,  
ARG 33A, ASP 47A,  
PHE 48A, SER 49A,  
VAL 50A, SER 51A,  
VAL 52A, GLY 70A,  
ALA 72A, ALA 73A,  
ARG 74A, A 1A, U  
2A, G 3A, A 4A, A 7A,  
A 8A, U 9A, C 10A.

8A, 705A - 9A, 706A -  
7A, 706A - 8A, 707A -  
8A, 727A - 6A, 730A -  
8A, 761A - 1A, 761A -  
2A, 761A - 14A, 761A  
- 0, 763A - 5A, 763A -  
6A, 763A - 8A.

540A - 70A, 540A -  
73A, 542A - 1A, 543A  
- 1A, 543A - 2A, 544A  
- 1A, 544A - 2A, 544A  
- 3A, 545A - 1A, 545A  
- 2A, 545A - 3A, 546A  
- 2A, 546A - 3A, 546A  
- 4A, 547A - 2A, 547A  
- 3A, 548A - 1A, 548A  
- 2A, 549A - 1A, 550A  
- 1A, 552A - 72A,  
552A - 73A, 563A -  
72A, 563A - 73A, 567A  
- 1A, 622A - 72A,  
624A - 47A, 624A -  
72A, 624A - 74A, 625A  
- 47A, 625A - 74A,  
626A - 1A, 627A - 1A,  
628A - 1A, 629A - 7A,  
633A - 7A, 636A - 7A,  
636A - 8A, 637A - 7A,  
637A - 8A, 639A -  
26A, 639A - 29A, 639A  
- 33A, 639A - 50A,  
639A - 51A, 639A -  
52A, 640A - 33A, 640A  
- 48A, 640A - 49A,  
640A - 50A, 640A -  
51A, 641A - 33A, 672A  
- 2A, 672A - 3A, 674A  
- 2A, 676A - 1A, 676A  
- 2A, 676A - 3A, 677A  
- 1A, 677A - 2A, 678A  
- 1A, 678A - 2A, 679A  
- 1A, 690A - 1A, 690A  
- 2A, 712A - 2A, 712A  
- 3A, 746A - 7A, 747A  
- 7A, 747A - 8A, 747A  
- 9A, 748A - 7A, 748A  
- 8A, 749A - 8A, 751A  
- 8A, 751A - 9A, 752A  
- 8A, 770A - 10A,  
772A - 10A.

---

---

**NAGLU-RNV-L7**

ASP 154A, TRP 159A,  
ASP 172A, SER 173A,  
SER 174A, PRO 175A,  
ALA 178A, HIS 182A,  
VAL 212A, ALA 213A,  
THR 214A, CYS 215A,  
ARG 216A, PRO 217A,  
ASP 218A, GLU 219A,  
PHE 220A, GLY 225A,  
ASN 226A, CYS 227A,  
ILE 228A, HIS 229A,  
GLY 230A, SER 231A,  
ARG 232A, GLN 233A.

ASP 24A, ALA 26A,  
ARG 27A, ALA 30A,  
ARG 33A, ARG 74A,  
G 1A, A 3A, C 4A, A  
5A, G 6A, G 7A, A 8A,  
C 9A, C 36A, G 37A,  
G 38A, G 39A, UNK  
0.

154A - 74A, 159A -  
74A, 172A - 0, 173A -  
24A, 173A - 26A, 173A  
- 27A, 173A - 30A,  
173A - 0, 174A - 26A,  
174A - 0, 175A - 26A,  
175A - 33A, 178A -  
1A, 182A - 26A, 212A  
- 6A, 213A - 6A, 214A  
- 7A, 215A - 6A, 215A  
- 7A, 216A - 6A, 216A  
- 7A, 216A - 8A  
217A - 9A, 217A -  
36A, 217A - 37A, 218A  
- 7A, 218A - 8A, 218A -  
9A, 218A - 37A, 218A  
- 38A, 218A - 39A,  
219A - 6A, 219A -  
36A, 219A - 37A, 220A  
- 37A, 220A - 38A,  
225A - 6A, 226A - 5A,  
226A - 6A, 227A - 5A,  
227A - 6A, 228A - 5A,  
229A - 7A, 230A -  
38A, 231A - 37A, 231A  
- 38A, 231A - 39A,  
232A - 3A, 232A - 4A,  
233A - 38A.

---

1343

1344