



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**Departamento de Química Física y Analítica**

Programa de doctorado en análisis químico, bioquímico y  
estructural y modelización computacional

**DETECCIÓN DE CAMBIOS EN LA  
GLICOSILACIÓN DE LA PSA ASOCIADOS  
AL CÁNCER DE PRÓSTATA: SELECCIÓN  
DE APTÁMEROS Y DISEÑO DE  
APTASENORES ELECTROQUÍMICOS**

Tesis Doctoral

**ANA DÍAZ FERNÁNDEZ**

*Oviedo, 2020*



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Detección de cambios en la glicosilación de la PSA asociados al cáncer de próstata: selección de aptámeros y diseño de aptasensores electroquímicos	Inglés: Detection of prostate cancer-related glycosylation changes in PSA: selection of aptamers and design of electrochemical aptasensors
2.- Autor	
Nombre: Ana Díaz Fernández	DNI: :
Programa de Doctorado: Análisis Químico, bioquímico y estructural y modelización computacional	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

### RESUMEN (en español)

El cáncer se asocia con procesos de glicosilación aberrante y en consecuencia cada tipo de cáncer se caracteriza por un cambio distintivo en la estructura de los glicanos enlazados a ciertas proteínas. Por lo tanto, el estudio de las alteraciones en las estructuras de glicanos asociadas al cáncer constituye una herramienta valiosa para el diagnóstico de este conjunto de enfermedades. En concreto, para el cáncer de próstata se han descrito variaciones en la estructura de los glicanos asociados al antígeno específico de la próstata (PSA por sus siglas en inglés), una glicoproteína biomarcadora de este cáncer. Más en detalle, se han descrito cambios en el contenido de ácidos siálicos y fucosa del núcleo en la estructura del glicano, y un aumento de las estructuras multiantenarias.

Actualmente la cuantificación de un azúcar específico de una glicoproteína se lleva a cabo mediante ensayos que usan lectinas o derivados de ácido borónico para su reconocimiento. Estos receptores son genéricos para todas las glicoproteínas debido a que solamente



tienen la capacidad de unirse a los azúcares. Por este motivo estos se utilizan en combinación con un receptor específico (anticuerpo o aptámero) de la proteína de interés, para discriminar entre glicoproteínas que poseen los mismos azúcares en su estructura glucídica. Por lo tanto, hay una clara necesidad de disponer de nuevos receptores para las glicoproteínas que incorporen en el reconocimiento tanto a los azúcares como a su región peptídica (reconocimiento binario). Debido a su naturaleza, los aptámeros podrían ser un buen receptor para lograr este reconocimiento binario de las glicoproteínas.

En la presente Tesis Doctoral se ha diseñado dos metodologías SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) distintas para dirigir la selección de aptámeros hacia el sitio de glicosilación de la PSA.

El primer SELEX se basa en la incorporación de etapas de contra-selección frente a una forma recombinante de la PSA, que carece de la estructura de glicanos. Así se eliminan de la colección de secuencias de ADN aquellas que se unen a la parte peptídica de la proteína. Tras seis rondas de selección, de las cuales dos fueron contra-selecciones, se identificaron los aptámeros de la última ronda mediante secuenciación masiva y se clasificaron en familias empleando herramientas bioinformáticas. Los aptámeros seleccionados de cada familia se caracterizaron mediante ensayos de unión con detección electroquímica y medidas de SPR para evaluar su afinidad por la PSA y la capacidad de reconocimiento de los glicanos. Uno de los aptámeros seleccionados, el PSA-1, es capaz de reconocer los glicanos pero no tiene selectividad frente a otras glicoproteínas con una estructura de glicanos similar.

En el segundo SELEX se intentó mejorar el proceso de selección para obtener un receptor con la capacidad de reconocimiento binario. Este se basa en la incorporación de etapas de contra-selección frente a la PSA



recombinante y la elución competitiva de las secuencias que se hayan unido a la PSA con la lectina PhoSL. Los aptámeros que sobrevivieron hasta la última ronda de selección se clonaron, secuenciaron y se clasificaron en familias con programas bioinformáticos. Los aptámeros seleccionados se caracterizaron con ensayos de unión con detección electroquímica, obteniéndose uno (PSAG-1) capaz de reconocer específicamente los glicanos de la PSA debido a que interacciona no solo con la estructura de azúcar sino también con aminoácidos del entorno del sitio de glicosilación.

Se estudiaron los complejos aptámero-proteína mediante ensayos empíricos y modelización computacional para conocer los azúcares que están involucrados en el reconocimiento. Con ambas metodologías se observa que el aptámero PSA-1 reconoce a los azúcares más externos del glicano (ácido siálico y galactosa) y que no reconoce la zona peptídica. Por el contrario, el aptámero PSAG-1 reconoce los azúcares más internos de la estructura, incluida la fucosa del núcleo, y algunos aminoácidos de la PSA.

Los aptámeros seleccionados y uno ya descrito previamente para la PSA (anti-PSA), que reconoce solo a la PSA por la parte peptídica, se emplearon para la construcción de aptasensores electroquímicos basados en formato tipo sándwich o directos sin el empleo de marcas, y en ambos casos se utilizaron electrodos de oro como transductor. Ambos aptasensores responden a diferentes concentraciones de PSA en suero humano y se aplicaron al análisis de muestras de suero de pacientes con patologías benignas o malignas de próstata o con patologías no relacionadas con la próstata.

El sensor basado en un formato tipo sándwich, en el que se emplean los aptámeros PSA-1 y anti-PSA, tiene un límite de detección de 0.66 ng/mL y un intervalo de trabajo entre 0.66 ng/mL y 25 ng/mL en suero



con una mínima dilución, cubriendo el intervalo de concentraciones con relevancia clínica para el diagnóstico del cáncer de próstata. Además, el sensor desarrollado posee una excelente selectividad frente a otras glicoproteínas y componentes de la sangre. En el análisis de suero de pacientes mostró una mejor capacidad de discriminación entre pacientes con cáncer de próstata e hiperplasia benigna de la próstata que el test ELISA que se emplea como referencia.

El sensor con un formato directo es una plataforma dual impedimétrica en la que se emplean los aptámeros PSAG-1 y anti-PSA para la cuantificación en suero de la PSA con un determinado patrón de glicosilación y de la PSA total, respectivamente. Estos sensores tienen un intervalo de trabajo entre 0.26 y 62.5 ng/mL para el sistema basado en el aptámero PSAG-1, y entre 0.64 y 62.5 ng/mL para el basado en anti-PSA. Empleando esta plataforma sensora se obtuvo un índice empírico, que se denominó "*Glycan Score*", que mide la relación entre la cantidad de PSA reactiva al aptámero PSAG-1 y la PSA total. La correlación entre el valor del *Glycan Score* y el diagnóstico permite diferenciar claramente entre pacientes con cáncer de próstata de aquellos pacientes sanos o con una patología benigna de la próstata.

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral muestran que la detección de los glicanos asociados a PSA empleando aptámeros es una buena alternativa para la detección del cáncer de próstata, con potencial para mejorar los resultados clínicos del test ELISA para PSA actualmente en uso en los laboratorios clínicos. La traslación de este tipo de ensayos a la clínica podría reducir el número de biopsias de próstata innecesarias para el diagnóstico de cáncer de próstata.

### **RESUMEN (en Inglés)**

Cancer is associated with aberrant glycosylation and as a consequence each type of cancer is characterized by a distinct change in the structure



of glycans bound to certain proteins. Therefore, analysis of tumour-linked glycan alterations is regarded as a valuable tool for cancer diagnosis. In the case of prostate cancer, it has been recently described that there is a variation in the glycans of the glycoprotein Prostate Specific Antigen (PSA). Specifically, it has been described changes in the content of sialic acids and core fucose in the glycan structure, and an increase of multi-antennary structures.

The quantification of a specific sugar of a glycoprotein is currently performed by assays using lectins or boronic acid derivatives for its recognition. These receptors are generic for all glycoproteins because they bind exclusively to the sugar. In consequence they are used in combination with a receptor (antibody or aptamer) that recognizes the protein, to discriminate among glycoproteins with identical glycan structures. Therefore, there is a need for new receptors for glycans that incorporate in the recognition both the glycan and the peptide region of a glycoprotein (binary recognition). Due to their nature, aptamers could be a good receptor to achieve this binary recognition.

In this Doctoral Thesis two different SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) have been designed to direct the selection of aptamers toward the glycosylation site of PSA.

The first SELEX is based on the incorporation of counter-selection steps against a recombinant PSA (unglycosylated). That way the sequences that bind to the peptide region of the protein are eliminated. After six rounds of selection and two counter-selections the aptamers in the last cycle were identified by next generation sequencing and classified into families using bioinformatics tools. The selected aptamers for each family are characterized by electrochemical binding assays and surface plasmon resonance measurements to evaluate their affinity to PSA and the capability of recognizing the glycans. One of the selected



aptamers, the so-called PSA-1, recognizes the glycans but it lacks selectivity against other glycoproteins with similar glycan structure.

In the second SELEX we tried to refine the selection process to obtain a receptor with binary recognition. This is based on the incorporation of counter-selection steps against the recombinant PSA (unglycosylated) and the competitive elution using a specific lectin (PhoSL). The aptamers in the last cycle are cloned, sequenced and classified into families using bioinformatic tools. The selected aptamers were characterized by electrochemical binding assays. One of the obtained aptamers specifically recognizes the glycans of PSA due to the simultaneous interaction with some amino acids of the protein.

The aptamer-protein complexes were studied both through empirical characterization and computational modelling to get insight on the sugars involved in the recognition interaction. By using both methods it was observed that PSA-1 aptamer recognizes the external sugars of the protein (sialic acid and galactose) but not the peptide region. In contrast, PSAG-1 aptamer recognizes the innermost sugars, including the core fucose, and the peptide region of the PSA.

The selected aptamers and an aptamer previously described, which only recognizes the peptide moiety (anti-PSA), were employed in the development of electrochemical aptasensors, based on sandwich or direct label-free assays using gold electrodes as a support. Both aptasensors respond to different levels of PSA in human serum and were applied to the analysis of serum samples from patients with benign or malignant pathologies of the prostate as well as with other unrelated pathologies.

The sandwich format assay, using PSA-1 and anti-PSA aptamers, has a detection limit of 0.66 ng/mL and a working concentration range between 0.66 ng/mL and 25 ng/mL in serum with minimal dilution,



covering the range of serum PSA concentrations with clinical relevance in the diagnosis of prostate cancer. The sensor has excellent selectivity against other glycoproteins and blood compounds. When it was applied to the analysis of serum samples it shows better discrimination capacity between prostate cancer and benign prostate hyperplasia than the ELISA test used as a reference.

The direct label-free assay was designed as a dual impedimetric platform employing anti-PSA and PSAG-1 aptamers for the quantification of total and glycosylated PSA in serum after a simple dilution. The sensors of this platform have a working concentration range between 0.26 and 62.5 ng/mL for PSAG-1, and between 0.64 and 62.5 ng/mL for anti-PSA. Using this platform we have obtained an empirical index, "*Glycan Score*", which measures the ratio between the concentration of PSA reactive to PSAG-1 aptamer and the total PSA concentration. The correlation between the *Glycan Score* and the diagnosis allows clearly differentiating patients with prostate cancer from healthy patients or with a benign pathology of the prostate.

The results obtained in this Doctoral Thesis suggest that the detection of glycans employing aptamers is a promising alternative for the detection of prostate cancer, with potential to improve clinical outcomes of current PSA tests. The translation of these assays to the clinics might reduce the number of unnecessary biopsies at the diagnosis of prostate cancer.

**SRA. PRESIDENTA DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL Y MODELIZACIÓN COMPUTACIONAL**





## AGRADECIMIENTOS POR EL APOYO ECONÓMICO

El trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral ha sido financiado por la Fundación científica de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) y la Junta Provincial de Asturias de la AECC a través de la concesión de una beca predoctoral.

Así mismo, la parte del trabajo realizado en la Universidad de Bath ha sido financiado por el Banco Santander y la Universidad de Oviedo mediante una beca de movilidad de excelencia para docentes e investigadores del año 2019.



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*





## ÍNDICE

<b>RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL</b>	<b>III</b>
RESUMEN (en español) .....	III
RESUMEN (en Inglés) .....	VI
<b>AGRADECIMIENTOS POR EL APOYO ECONÓMICO</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b>	<b>XIX</b>
<b>CAPÍTULO 1: Introducción</b>	<b>XXV</b>
1.1 El cáncer de próstata.....	27
1.1.1 Diagnóstico del cáncer de próstata.....	32
1.1.1.1 Tacto rectal.....	33
1.1.1.2 Análisis del antígeno específico de la próstata en sangre	33
1.1.1.3 Biopsia del tejido de la próstata.....	39
1.1.2 Otros biomarcadores para el diagnóstico del cáncer de próstata .....	42
1.2 Glicosilación y cáncer .....	47
1.2.1 Glicosilación aberrante de la PSA.....	53
1.3 Bioensayos para detectar la glicosilación .....	56
1.3.1 Aptámeros como receptores de biomarcadores glicosilados .	61
1.4 Aptámeros y aptasensores para la PSA.....	66
<b>CAPÍTULO 2: Objetivos/Objectives</b>	<b>69</b>
<b>CAPÍTULO 3: Selección de aptámeros frente a la estructura de glicanos de la PSA</b>	<b>75</b>

3.1	Introducción .....	77
3.2	Protocolos .....	77
3.2.1	Modificación de las partículas magnéticas. ....	77
3.2.2	Ensayo de Bradford .....	78
3.2.3	Proceso de selección .....	79
3.2.4	Ensayos de unión con detección electroquímica. ....	84
3.2.5	<i>Ensayos de unión mediante SPR.</i> .....	86
3.3	Resultados y discusión .....	88
3.3.1	Proceso de selección. ....	88
3.3.2	Secuenciación masiva e identificación de los aptámeros. ....	96
3.3.3	Caracterización de la afinidad de los aptámeros seleccionados .....	104
<b>CAPÍTULO 4: Selección de aptámeros con reconocimiento binario de la glicoproteína PSA</b>		<b>113</b>
4.1	Introducción .....	115
4.2	Protocolos .....	116
4.2.1	Proceso de selección .....	116
4.2.2	Clonación.....	118
4.2.3	Ensayos de unión con detección electroquímica .....	120
4.3	Resultados y discusión. ....	120
4.3.1	Proceso de selección .....	120
4.3.2	Caracterización de los aptámeros seleccionados.....	131
4.3.2.1	Estudio estructural del aptámero PSAG-1.....	136
<b>CAPÍTULO 5: Estudio empírico y computacional del sitio de unión de los aptámeros</b>		<b>142</b>

5.1. Introducción .....	144
5.2. Protocolos .....	144
5.2.1 Estudio de desglicosilación.....	144
5.2.2 Ensayo de desplazamiento.....	145
5.2.3 Ensayo de enlace competitivo.....	146
5.2.4 Modelización computacional .....	146
5.2.4.1 Predicción de la estructura tridimensional de los aptámeros. ....	146
5.2.4.2 Adecuación de la estructura cristalina de la PSA. ....	147
5.2.4.3 Docking rígido entre el aptámero y la PSA.....	148
5.3. Resultados y discusión .....	149
5.3.1 Estudio empírico del sitio de unión de los aptámeros.....	149
5.3.2 Estudio computacional del sitio de unión del aptámero PSA-1. .....	155
5.3.3 Estudio computacional del sitio de unión del aptámero PSAG- 1.....	158
5.3.3.1 Predicción de la estructura tridimensional del aptámero PSAG-1.....	158
5.3.3.2 Caracterización del aptámero T-PSAG-1 .....	162
5.3.3.3 Modelización del complejo aptámero/proteína .....	165
<b>CAPÍTULO 6: Aptasensores electroquímicos para detectar la PSA</b>	<b>168</b>
<b>6-1 Aptasensores con formato sándwich</b>	<b>171</b>
6-1.1 Introducción.....	172
6-1.2 Protocolos .....	174
6-1.2.1 Ensayo sándwich sobre electrodos de oro .....	174

6-1.2.2	Ensayo sándwich sobre electrodos de carbono.....	175
6-1.2.3	Muestras de suero .....	176
6-1.3	Resultados y discusión .....	176
6-1.3.1	Selección y caracterización del aptámero de captura .....	176
6-1.3.2	Ensayo sándwich empleando el aptámero PSA-1.....	180
6-1.3.2.1	Caracterización del aptasensor .....	180
6-1.3.2.2	Selectividad del ensayo sándwich.....	183
6-1.3.2.3	Análisis de PSA en muestras de suero .....	185
3.3	Ensayo sándwich empleando el aptámero PSAG-1.....	188
<b>6.2</b>	<b>Aptasensores con formato directo</b>	<b>191</b>
6-2.1	Introducción.....	192
6-2.2	Protocolos .....	194
6-2.2.1	Fabricación de los electrodos de oro evaporados .....	194
6-2.2.2	Fabricación del aptasensor .....	195
6-2.2.3	Detección de PSA .....	196
6-2.2.4	Medidas de EIS.....	196
6-2.2.5	Medidas de SPR.....	196
6-2.3	Resultados y discusión .....	197
6-2.3.1	Preparación y caracterización de la fase sensora. ....	197
6-2.3.1	Caracterización de la afinidad de los aptámeros inmovilizados.....	201
6-2.3.2	Caracterización analítica de la plataforma dual impedimétrica .....	202
6-2.3.3	Análisis de PSA en muestras reales.....	206
<b>6.3</b>	<b>Utilidad clínica de los aptasensores</b>	<b>212</b>

<b>CAPÍTULO 7: Conclusiones y perspectivas de futuro</b>	<b>218</b>
1. Conclusiones.....	220
2. Perspectivas de futuro .....	224
3. Conclusions .....	225
4. Future perspectives.....	228
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>230</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>246</b>
<b>A1. Reactivos e instrumentación</b>	<b>246</b>
A1.1 Reactivos .....	247
A1.2 Disoluciones .....	252
A1.3 Instrumentos y equipos .....	253
<b>A2. Producción científica</b>	<b>255</b>
A2.1 Artículos científicos .....	256
A2.2 Participación en congresos .....	257
A2.2.1 Congresos internacionales .....	257
A2.2.1 Congresos nacionales.....	258





## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>A</b>	Adenina
<b>ACT</b>	$\alpha$ 1-antiquimotripsina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AFM</b>	Microscopía de fuerza atómica
<b>AFP</b>	$\alpha$ -fetoproteína
<b>AFP-L3</b>	Fracción de la AFP reactiva a la lectina <i>Lens culinaris</i>
<b>Arg</b>	Arginina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>Asn</b>	Asparagina
<b>AuNPS</b>	Nanopartículas de oro
<b>bPSA</b>	PSA benigna
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>btn</b>	Biotina
<b>C</b>	Citosina
<b>cPSA</b>	PSA complejada
<b>CTCs</b>	Células tumorales circulantes
<b>ctNA</b>	Ácidos nucleicos tumorales circulantes
<b><math>\Delta G</math></b>	Energía libre de Gibbs
<b>dNTPs</b>	Nucleótidos
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
<b>EIS</b>	Espectroscopía de impedancia electroquímica
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>FDA</b>	U.S. Food & Drug administration

---

<b>fPSA</b>	PSA libre
<b>6FAM</b>	Fluoresceína
<b>Fuc</b>	L-fucosa
<b>G</b>	Guanina
<b>Gal</b>	D-Galactosa
<b>GaMD</b>	Dinámica molecular con acelerado gaussiano
<b>GalNac</b>	N-acetil-D-galactosamina
<b>Glc</b>	D-glucosa
<b>GlcA</b>	Ácido D-glucorónico
<b>GlcNac</b>	N-acetil-D-glucosamina
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>GS</b>	Glycan score
<b>GST</b>	Transferasa Glutati6n-S
<b>HBP</b>	Hiperplasia benigna de próstata
<b>hPSA</b>	PSA humana
<b>HSA</b>	Albúmina de suero humano
<b>IdoA</b>	Ácido L-idurónico
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>iPSA</b>	PSA inactiva
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de disociaci6n
<b>4Kscore</b>	Panel de cuatro calicreínas
<b>LBS</b>	Medio selectivo de <i>Lactobacillus</i>
<b>LD</b>	Límite de detecci6n

---

---

<b>Leu</b>	Leucina
<b>Lys</b>	Lisina
<b>Man</b>	Manosa
<b>mARN</b>	ARN mensajero
<b>miARNs</b>	Micro ARN
<b>MD</b>	Dinámica molecular
<b>Met</b>	Metionina
<b>MIP</b>	Polímeros molecularmente impresos
<b>MH</b>	6-mercapto-1-hexanol
<b>MPs</b>	Partículas magnéticas
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>MUA</b>	Ácido 1-mercaptoundecanocio
<b>NAG</b>	N-acetil-D-glucosamina
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccinimida
<b>NGAL</b>	Lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos
<b>NeuAc</b>	Ácido siálico
<b>Neu5Ac</b>	Ácido siálico
<b>nt</b>	Nucleótidos
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCA3</b>	Gen del cáncer de próstata 3
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDB</b>	Banco de datos de proteínas
<b>PHI</b>	Índice de salud prostática

---

---

<b>PhoSL</b>	Lectina <i>Pholiota squarrosa</i>
<b>POC</b>	Análisis a la cabecera del paciente
<b>PSA</b>	Antígeno específico de la próstata
<b>p2PSA</b>	[-2]proPSA
<b>PSAD</b>	Densidad de la PSA
<b>PSAV</b>	Velocidad de la PSA
<b>qrt-PCR</b>	PCR cuantitativa en tiempo real
<b>R<sub>ct</sub></b>	Resistencia a la transferencia de carga
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>rPSA</b>	Antígeno específico de la próstata recombinante
<b>RT</b>	Temperatura ambiente
<b>SA</b>	Ácido siálico
<b>SAM</b>	Monocapa autoensamblada
<b>SELEX</b>	Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
<b>Ser</b>	Serina
<b>S.O.C</b>	Medio de caldo superóptimo con represión por catabolito
<b>SPAuE</b>	Electrodos serigrafados de oro
<b>SPR</b>	Resonancia de plasmón superficial
<b>ssADN</b>	ADN de hebra simple
<b>T</b>	Timina
<b>tARN</b>	ARN de transferencia
<b>Thr</b>	Treonina
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetrametibencidina
<b>tPSA</b>	PSA total

---

---

<b>VIS-UV</b>	Visible-ultravioleta
<b>X-Gal</b>	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>Xyl</b>	D-xilosa

---



# CAPÍTULO 1

## *Introducción*





## 1.1 El cáncer de próstata.

El término cáncer da nombre a un grupo de enfermedades en las que se produce un crecimiento descontrolado de células anormales, que al multiplicarse sin interrupción invaden los tejidos cercanos. De esta manera y siendo transportadas por los sistemas sanguíneo y linfático pueden llegar a diseminarse por todo el cuerpo<sup>1</sup>. Las características distintivas del cáncer que permiten el crecimiento del tumor y la formación de metástasis comprenden seis capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo por pasos de los tumores: la capacidad de mantener la señalización proliferativa, de evadir los mecanismos que limitan la proliferación (activación de genes supresores del crecimiento), de resistir a la muerte celular, de permitir la inmortalidad replicativa impidiendo la senescencia, de inducir la angiogénesis y de activar los mecanismos de invasión y metástasis<sup>2</sup>.

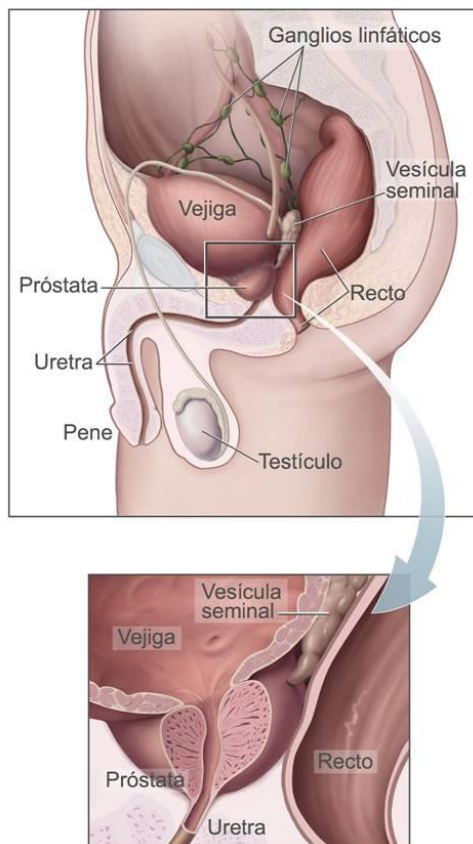
Un tipo específico de cáncer es el producido en la próstata. Se trata del segundo cáncer más comúnmente diagnosticado en hombres y la quinta causa de muerte a nivel mundial, diagnosticándose en 2018 1,276,106 casos nuevos y provocando 358,989 muertes. La incidencia y mortalidad en todo el mundo está relacionada con el aumento de la edad, con una edad promedio en el momento del diagnóstico de 66 años. Cabe destacar que las tasas de incidencia y la mortalidad son mayores en los hombres afroamericanos que en los blancos, debido posiblemente a diferencias en los factores sociales, ambientales y genéticos<sup>3</sup>. En España, es el tercer cáncer en incidencia, si se tienen en cuenta ambos sexos, y en los varones es el primero en incidencia y el tercero en mortalidad<sup>4</sup>.

Este cáncer tiene lugar en la próstata, una glándula pequeña (~ 4 cm de largo por 3 cm de ancho, en hombres jóvenes y sanos) con forma de castaña, que se encuentra en la pelvis y es atravesada directamente por la uretra. La próstata está rodeada por el recto en la parte posterior, y por la vejiga en la superior. Detrás de la próstata se encuentran las glándulas seminales<sup>5</sup> (Figura 1.1). La próstata constituye una parte del

## 1.1 El cáncer de próstata

---

sistema urinario y reproductor masculino, relacionándose anatómicamente con otras estructuras como los conductos deferentes y las vesículas seminales.



*Figura 1.1: Situación anatómica de la próstata en el sistema reproductor masculino. Obtenida de National Institute of Health (NIH), imagen de dominio público.*

Desde el punto de vista fisiológico, la principal función de la próstata es la de actuar como una glándula secretora involucrada en la eyaculación. Las secreciones de la próstata constituyen aproximadamente el 20 % del semen y contienen sustancias que proporcionan nutrientes y un medio adecuado para la supervivencia y activación de los espermatozoides<sup>6</sup>.

Histológicamente, la próstata está formada en un 70 % por epitelio glandular y en un 30 % por estroma fibromuscular, ambos fundidos y envueltos por la cápsula prostática. La próstata se puede dividir en tres zonas: la zona central, la de transición y la periférica (Figura 1.2). Estas regiones tienen diferentes orígenes embriológicos y pueden distinguirse por sus histologías, puntos de referencia anatómicos, funciones biológicas y susceptibilidad a trastornos patológicos. La zona central es relativamente resistente a la aparición de patologías, mientras que la zona de transición es en la que habitualmente se desarrolla el adenoma de próstata (tumor benigno). Es en la zona periférica donde se producen la mayor parte de los procesos cancerosos<sup>7</sup>.

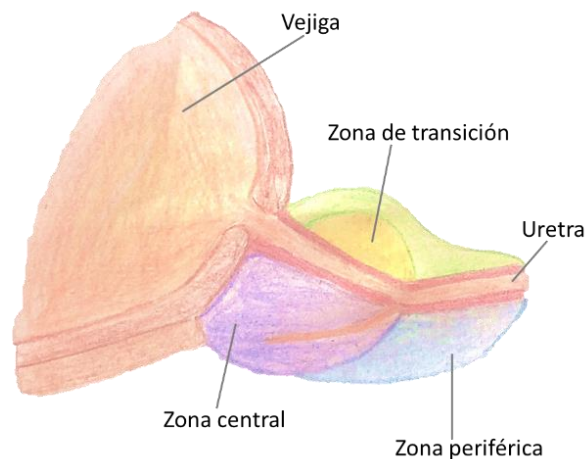


Figura 1.2: Esquema de la localización de las tres zonas en las que se divide la próstata: central en morado, periférica en azul y de transición en amarillo.

El 95 % de los cánceres de próstata son adenocarcinomas que surgen en las células epiteliales del tejido glandular. Se distinguen tres tipos de células epiteliales: células luminales, encargadas de la producción de proteínas secretoras liberadas en el esperma durante la eyaculación; células neuroendocrinas que se encuentran dispersas por toda la capa epitelial y se cree que contribuyen al crecimiento y mantenimiento prostático; y células madre indiferenciadas encargadas de mantener la población de células epiteliales<sup>8</sup>. Cuando se produce el cáncer de

próstata, algunas células epiteliales normales del tejido glandular de la próstata se transforman en células malignas (cancerosas) y comienzan a multiplicarse repetidamente sin control. La proliferación de estas células cancerosas está controlada por una interacción compleja entre las propias células epiteliales, los componentes de la matriz extracelular y las células del estroma<sup>9</sup>. Estas células cancerosas, si no se eliminan, pueden pasar al sistema linfático y al torrente sanguíneo, llegando a otras partes del cuerpo donde se alojan y crecen tumores secundarios. El cáncer de próstata provoca predominantemente metástasis en los huesos dando lugar a lesiones osteoblásticas, que se caracterizan por un aumento en el crecimiento óseo. También puede producir metástasis en los pulmones, ganglios linfáticos, hígado y cerebro<sup>10</sup> (Figura 1.3). Los andrógenos tienen una gran influencia tanto en el inicio como el desarrollo de este cáncer<sup>11</sup>.

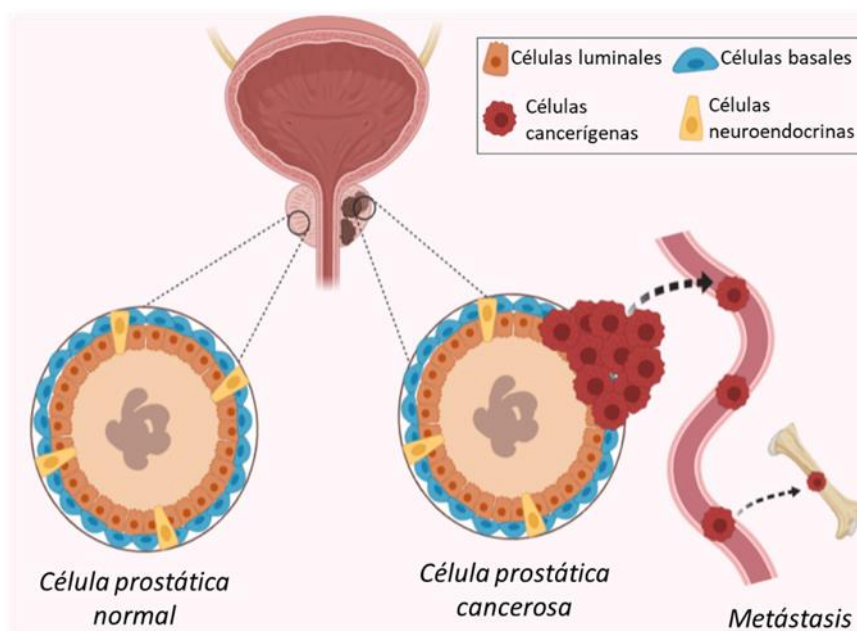


Figura 1.3: Comparación de las células prostáticas normales y cancerosas. Representación de la agrupación de células cancerosas, que acaban pasando al torrente sanguíneo y creando metástasis en los huesos.

Los factores de riesgo que favorecen el desarrollo de cáncer de próstata son los siguientes<sup>12,13</sup>:

- **Edad**

La incidencia del cáncer de próstata se ve fuertemente incrementada con la edad. Típicamente este cáncer se desarrolla lentamente y puede estar precedido por lesiones displásicas. Los estudios realizados a partir de los resultados de autopsias sugieren que la mayoría de los hombres padecerían cáncer de próstata si vivieran más de 100 años.
- **Etnia**

El cáncer de próstata presenta distinta incidencia según la zona del mundo. Se ha encontrado una mayor incidencia en los varones afroamericanos, mientras que la menor aparece en los varones chinos.
- **Historial familiar**

Diversos estudios han encontrado una prevalencia del cáncer en algunas familias, observándose que aquellos varones con antecedentes familiares de primer grado (padre y/o hermanos) que tienen cáncer de próstata presentan un riesgo dos veces superior de padecer esta enfermedad.
- **Cambios en los genes**

Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 están asociadas con algunos cánceres de próstata. Las mutaciones en BRCA2 están asociadas con cánceres de mayor grado, progresión rápida y menor supervivencia. Otro gen que se ve afectado es el HOXB13, aunque estas alteraciones en los genes no explican más del 10 % de los casos de cáncer de próstata.
- **Alteraciones hormonales**

Se ha descrito que la reducción de los andrógenos (testosterona) y altos niveles de estrógenos podrían reducir el riesgo de sufrir cáncer de próstata.

- Dieta

Una dieta rica en alto contenido en grasas y la ingesta de mucha carne roja podría aumentar el riesgo de padecer cáncer de próstata, aunque no hay una evidencia consistente.

Otros factores de riesgo podrían ser la obesidad, las infecciones en el tracto urinario, y la exposición a ciertas sustancias químicas como el cadmio.

### 1.1.1 Diagnóstico del cáncer de próstata.

La mayoría de los hombres que padecen cáncer de próstata en un estadio temprano no presentan síntomas derivados del cáncer propiamente dicho. Sin embargo, cuando el cáncer se encuentra en un estado avanzado puede provocar síntomas en el tracto urinario inferior (obstrutivo o irritante), hematospermia, disminución del volumen eyaculado y disfunción eréctil si el cáncer se extiende más allá de la próstata afectando al cuello de la vejiga, la uretra, los conductos eyaculadores, las vesículas seminales o los nervios erectogénicos, respectivamente<sup>14</sup>.

Sin embargo, estos síntomas también son compatibles con otras enfermedades de la próstata, como la hiperplasia benigna de próstata (HBP). Por este motivo es muy importante realizar tanto un cribado poblacional como un diagnóstico precoz, en estadios tempranos de la enfermedad, cuando los síntomas aun no son visibles y el tratamiento y la curación son más favorables. De ahí el interés de disponer de biomarcadores adecuados que puedan identificar la presencia del tumor.

Un biomarcador se define como una característica definida que se mide como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas biológicas a una exposición o intervención, incluida la intervención terapéutica. En concreto un biomarcador de diagnóstico se define como el biomarcador utilizado para detectar o

confirmar la presencia de una enfermedad o condición de interés, o para identificar individuos con un subtipo de la enfermedad<sup>15</sup>.

En el caso concreto del cáncer de próstata, las pruebas diagnósticas que se realizan actualmente son el tacto rectal, el análisis del antígeno específico de la próstata en sangre y la biopsia de tejido prostático. A continuación, se describirán estas pruebas, sus inconvenientes, así como otros biomarcadores o combinaciones que se están explorando en la actualidad para la detección del cáncer de próstata.

#### *1.1.1.1 Tacto rectal*

Hasta 1990 el tacto rectal era la prueba más común para el cribado del cáncer de próstata así como otras enfermedades en la parte inferior del recto y la pelvis. Se trata de una prueba de detección rutinaria usada para localizar bultos o endurecimientos en la próstata. El tacto rectal es una prueba útil cuando el volumen de la próstata es aproximadamente 0.2 mL o mayor. Sin embargo, no permite diagnosticar por si sola el cáncer de próstata debido a la falta de especificidad y precisión, y porque los resultados también dependen de las habilidades del médico que realiza la prueba<sup>16</sup>.

#### *1.1.1.2 Análisis del antígeno específico de la próstata en sangre*

Esta prueba consiste en la medida de la concentración, en ng/mL, del antígeno específico de la próstata (PSA por sus siglas en inglés, *Prostate Specific Antigen*) existente en la sangre. Desde que la proteína PSA fuera descubierta en 1979 por Wang y sus colaboradores<sup>17</sup>, el diagnóstico del cáncer de próstata cambió drásticamente, convirtiéndose la PSA en el marcador de referencia para el cribado de este cáncer.

La PSA es una glicoproteína de 33 kDa producida por las células epiteliales de la próstata, tanto en los tejidos prostáticos sanos como en los tejidos con cáncer de próstata de cualquier grado y estado. Esta proteína se libera al líquido seminal donde su concentración está



comprendida entre 0.3 y 3 mg/mL. La PSA es una serina proteasa y tiene actividad enzimática de quimotripsina, siendo así su principal función la de licuar el líquido seminal, rompiendo las proteínas semenogelin I y II<sup>16</sup>.

Esta proteína pertenece a la familia de las proteasas glandulares denominadas calicreínas. En los humanos, los genes que codifican para las quince calicreínas glandulares se agrupan en una región que abarca aproximadamente 280 kb del cromosoma 19q133–4. La regulación de la PSA por los andrógenos se efectúa a través de los elementos de respuesta androgénica que se encuentran en el promotor del gen que codifica la PSA, el gen KLK3, y por esta razón a la PSA también se la conoce como calicreína 3 o hK3<sup>18</sup>.

La PSA se sintetiza inicialmente como un pre-propolipéptido (preproPSA) cuya secuencia de aminoácidos se representa en la Figura 1.4. Esta proteína contiene un péptido señal de 17 aminoácidos, que posteriormente se escinde para generar una proteína precursora y enzimáticamente inactiva de 244 aminoácidos ([-7]proPSA). La escisión de los siete aminoácidos N-terminales en la proPSA genera la PSA activa, de 237 aminoácidos y 33 KDa, que tiene cinco enlaces disulfuro intracadena y un único sitio de glicosilación unido a la asparagina. La escisión de la proPSA normalmente ocurre como se ha indicado, entre la arginina de la posición 7 y la isoleucina de la posición 8, convirtiéndose este aminoácido en el N-terminal de la proteína madura activa. Esta escisión la lleva a cabo principalmente la enzima activadora hK2 (calicreína 2). También tienen lugar otras escisiones en sitios específicos, generando la PSA inactiva (iPSA) y la PSA benigna (BPSA). Además, dentro de las células se produce el truncamiento de la proPSA dando lugar a diferentes isoformas con un péptido señal de uno ([-1]proPSA), dos ([-2]proPSA), cuatro ([-4]proPSA) o cinco aminoácidos ([-5]proPSA)<sup>19,20</sup>.



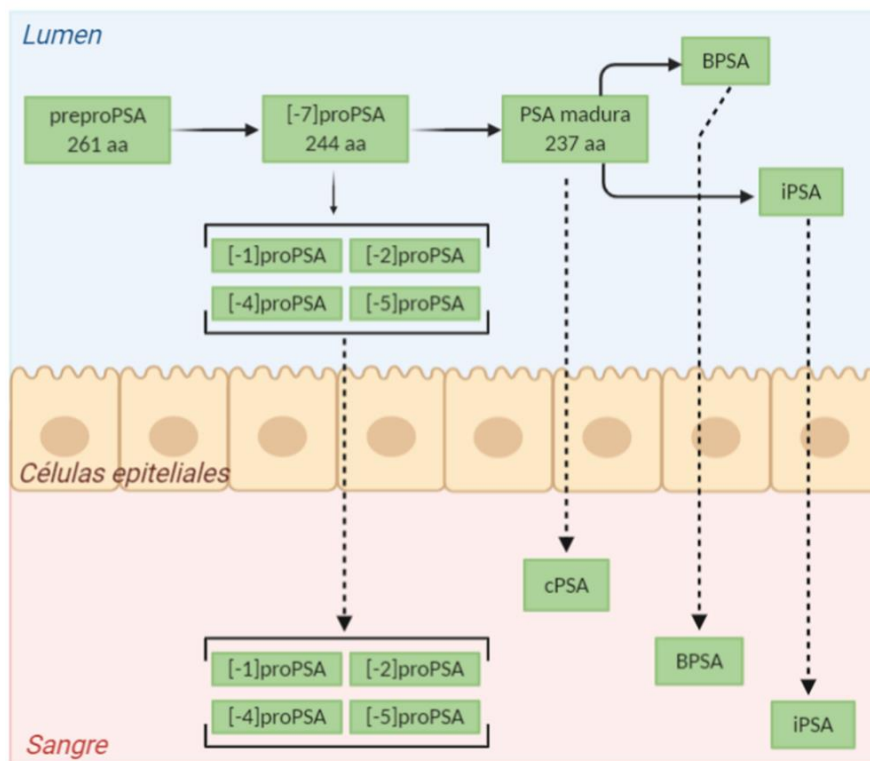


Figura 1.5: Descripción de la síntesis de la PSA en las células y de las isoformas presentes en la sangre.

Los niveles normales de PSA en la sangre pueden verse elevados por la destrucción de la membrana basal de las células epiteliales de la próstata, causada por la presencia del cáncer de próstata, pero también por enfermedades benignas de la misma, como la hiperplasia benigna de próstata (HBP) o por traumas físicos en la misma, e incluso por la edad o el aumento del volumen prostático. De esta forma, una elevación en los niveles de PSA en la sangre es indicativo de patologías de la próstata, pero no es una prueba específica de cáncer<sup>24</sup>.

Por este motivo el análisis de los niveles de PSA en sangre, con los métodos actuales de cuantificación, es una prueba de cribado, que solo indica la posibilidad de tener cáncer y siempre es necesario la realización de una biopsia para su confirmación.

La FDA (U.S Food and Drug Administration) aprobó en 1986 la medida de la concentración total de PSA en sangre para la monitorización de los pacientes con tratamientos contra el cáncer de próstata y como marcador de cribado del cáncer de próstata en 1994<sup>25</sup>. En un principio se estableció un valor de corte de 4 ng/mL como valor discriminante para recomendar la biopsia de próstata. Posteriormente, se estableció la denominada zona gris, para valores entre 4 y 10 ng/mL; en este intervalo el resultado no es concluyente y antes de realizar la biopsia se recomienda realizar otras pruebas o un seguimiento del nivel de PSA con el tiempo. Además, algunos estudios recientes han encontrado que aproximadamente el 20 % de los hombres con valores de PSA inferiores a 4 ng/mL tienen cáncer de próstata (falsos negativos), y que por el contrario, en muchos casos niveles de PSA muy superiores no se corresponden con cáncer de próstata (falsos positivos), demostrando la baja especificidad de este marcador<sup>26</sup>.

Para la realización de esta prueba hay muchos ensayos comerciales disponibles, siendo el método de referencia el test Hybritech® tras su aprobación por la FDA en 1986 y posteriormente su adaptación a una prueba automática (Access® Immunoassay System) en el año 2000. La mayoría de los nuevos test diseñados para la PSA se validan y calibran respecto al test Hybritech®<sup>27</sup>. Todos ellos tienen en común que son inmunoensayos enzimáticos (ELISA) tipo sándwich para la cuantificación de PSA total, suma de la PSA libre y la PSA complejada a inhibidores. Esta prueba se basa en la reacción anticuerpo-antígeno-anticuerpo, y para ello se utilizan dos anticuerpos, uno de captura que se inmoviliza sobre una superficie, y otro de detección, que está marcado y proporciona una señal (quimioluminiscente o colorimétrica), que se relaciona con la concentración de PSA en la sangre.

A pesar del amplio uso de la PSA para el cribado del cáncer de próstata y como consecuencia de que se trata de un marcador específico de órgano, más que de cáncer, un valor elevado de la PSA obliga a la

realización de una biopsia para descartar o confirmar la presencia del cáncer. De hecho, diversos estudios muestran que hasta el 75% de los hombres con un valor de PSA elevado tienen un resultado benigno de biopsia, es decir, el análisis de la PSA produce un gran número de falsos positivos con los problemas asociados que conlleva, no solamente la realización de una biopsia innecesaria, sino también los problemas psicológicos y de estrés que provoca tanto a los pacientes como a sus familiares<sup>28</sup>. Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas o pruebas complementarias como el análisis de la PSA libre, la densidad o velocidad de la PSA.

- Porcentaje de PSA libre (% fPSA)

El término PSA libre hace referencia a aquella proteína que una vez en la sangre no se encuentra complejada con ningún inhibidor. El porcentaje de PSA libre se define como la cantidad de PSA libre presente en el suero respecto a la PSA total. Algunos estudios han demostrado que el porcentaje de PSA libre en el suero es menor en pacientes con cáncer de próstata que en aquellos que padecen HBP, pudiendo ser una buena herramienta para distinguir estas dos enfermedades en aquellos casos en los que el resultado del análisis de la PSA total está en la zona gris<sup>29</sup>.

- Densidad de la PSA (PSAD)

Debido a que los niveles de la PSA dependen del volumen de la próstata, en 1992 Benson y colaboradores introdujeron el término "densidad de la PSA"<sup>30</sup>, que correlaciona los niveles de PSA con el volumen de la próstata. PSAD se define como la cantidad de PSA total dividida entre el volumen prostático, calculado mediante un tacto rectal. El incremento en PSAD está asociado con un mayor riesgo de padecer cáncer de próstata<sup>31</sup>.

- Velocidad de la PSA (PSAV)

Este parámetro hace referencia a los cambios en los niveles de PSA en la sangre con el tiempo y se define como el cambio en la concentración de PSA por año (ng/mL·año). Para hombres con

una concentración de PSA por debajo de 4 ng/mL, se observó que un valor de PSAV mayor de 0.75 ng/mL·año se asociaba significativamente con la presencia de cáncer de próstata. En cambio para aquellos que tiene un valor de PSA mayor de 4 ng/mL se estableció un valor de corte de 0.4 ng/mL·año<sup>32</sup>.

### *1.1.1.3 Biopsia del tejido de la próstata*

Es la única prueba con la que es posible confirmar la presencia del cáncer de próstata y se realiza siempre que las otras pruebas diagnósticas hayan proporcionado resultados compatibles con la posibilidad de padecerlo. Consiste en la obtención de pequeñas muestras de tejido prostático para su posterior análisis al microscopio. La obtención de las muestras, guiada con un ecógrafo transrectal, se realiza introduciendo una aguja delgada y hueca en la próstata, a través de la pared del recto (biopsia transrectal) o a través de la piel entre el escroto y el ano (biopsia transperineal). Al retirar la aguja se extrae un pequeño cilindro del tejido prostático. Normalmente se utilizan antibióticos de fluoroquinolona para la preparación de los tejidos prostáticos<sup>33</sup>.

Esta prueba es sencilla y corta, aunque es molesta e incluso dolorosa en algunos casos. No suele tener riesgos asociados, aunque puede provocar algunas complicaciones debido a su carácter invasivo, como hemorragias, infecciones urinarias o prostáticas y retención urinaria, que en la mayoría de los casos no son graves y se solucionan con el tratamiento adecuado<sup>34</sup>.

La técnica óptima para realizar la biopsia, incluyendo la cantidad de muestras a tomar y la colocación de la aguja para obtener el tejido, sigue sin estar del todo claro, pudiendo darse la posibilidad de perder un cáncer relevante. Sin embargo, se ha observado que las biopsias realizadas dentro de la zona periférica de la próstata pueden ser importantes para excluir el cáncer de próstata en hombres con valores elevados de PSA y resultados no sospechosos en el tacto rectal.

Recientemente, la identificación mediante resonancia magnética de las biopsias está ganando popularidad para identificar con mayor precisión los cánceres de alto grado y para reducir el muestreo de cánceres de bajo grado.

Las muestras obtenidas son analizadas al microscopio para observar si los tejidos contienen células cancerosas, dando lugar a tres posibles resultados: positivo para cáncer, en el que se han observado células cancerosas en las muestras de tejido; negativo para cáncer, no se observan células cancerosas en las muestras de tejido; y sospechoso, se ha observado algo anormal en las muestras de tejido, pero puede que no sea cáncer<sup>14,33</sup>.

Si se encuentran células cancerosas en la biopsia se las clasifica histológicamente asignándoles un grado, que hace referencia al grado de diferenciación de las células neoplásicas. El sistema de graduación más ampliamente utilizado es el sistema de Gleason, aunque también se empiezan a aplicar métodos alternativos como el propuesto en 2013 por un grupo de investigadores del hospital Johns Hopkins y que ha sido aceptado por la Organización Mundial de la Salud<sup>35</sup>.

El sistema de puntuación de Gleason o grado de Gleason se basa en el patrón arquitectónico de las células cancerosas, numerado desde 1 (bien diferenciadas) hasta 5 (pobrementemente diferenciadas). Los patrones para cada grado fueron definidos y dibujados por el Dr. Donald F. Gleason (Figura 1.6)<sup>36</sup>.

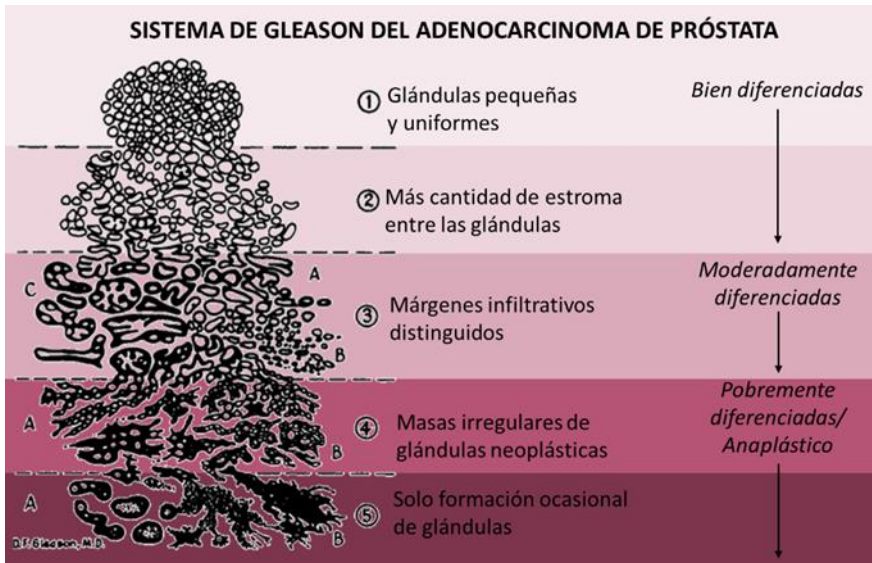


Figura 1.6: Sistema de Gleason para la clasificación de los adenocarcinomas de próstata en 5 grados según su patrón arquitectónico. Adaptación del dibujo original del Dr. D. F. Gleason.

Debido a la heterogeneidad que presentan algunos cánceres de próstata, estos cinco patrones básicos se utilizan para generar una segunda puntuación histológica, que puede variar desde 2 a 10. Para obtener esta puntuación final, se combinan el patrón primario, el más abundante en el área de estudio, y el secundario, el segundo más abundante, sumándose ambos. Si solo se observa un grado en la muestra de tejido, este se multiplica por dos. Según esta segunda puntuación de Gleason se pueden agrupar los cánceres en cinco categorías que van desde 1, más propensos a crecer y propagarse lentamente, hasta 5, más propensos a crecer y propagarse rápidamente.

- Grupo de grado 1: Puntuación de Gleason de 6 o menor.
- Grupo de grado 2: Puntuación de Gleason de 3+4=7.
- Grupo de grado 3: Puntuación de Gleason de 4+3=7.
- Grupo de grado 4: Puntuación de Gleason de 8.
- Grupo de grado 5: Puntuación de Gleason de 9 a 10.



A los cánceres con una puntuación de Gleason 6 o menor se les denomina cánceres bien diferenciados o de bajo grado; a los de puntuación 7, cánceres moderadamente diferenciados o de grado intermedio y a los de puntuación de 8 a 10, cánceres pobremente diferenciados o de alto grado. El sistema de puntuación de Gleason es una de las mejores herramientas para predecir resultados específicos del cáncer; cuanto mayor sea el grado de Gleason, mayor es el riesgo de progresión del cáncer, con o sin tratamiento<sup>14,37</sup>.

### 1.1.2 Otros biomarcadores para el diagnóstico del cáncer de próstata

Debido a los problemas asociados al uso del antígeno específico de la próstata como biomarcador para el cribado del cáncer de próstata, se están buscando nuevos biomarcadores no invasivos para conseguir un diagnóstico más fiable y evitar la realización de biopsias innecesarias.

Una alternativa prometedora a las biopsias de tejidos es la llamada biopsia líquida, definida como la detección de biomarcadores relacionados con el tumor en una muestra de fluido biológico. Esta presenta múltiples ventajas ya que es una técnica mínimamente invasiva, suele llevar asociado un bajo consumo de reactivos y es relativamente fácil de usar. Las biopsias líquidas se han centrado fundamentalmente en el análisis de células tumorales circulantes (CTCs), ácidos nucleicos tumorales circulantes (ctNA) y vesículas extracelulares (exosomas) derivadas de tumores, que se hayan desprendido de los tumores o de las zonas metastásicas al torrente sanguíneo, saliva, orina y líquido cefalorraquídeo, entre otros fluidos periféricos<sup>38</sup>. En un sentido más amplio, también se pueden incluir como biomarcadores en biopsia líquida proteínas circulantes o metabolitos asociados específicamente al tumor.

En concreto para el cáncer de próstata se han propuesto los siguientes nuevos biomarcadores o combinaciones de ellos para poder llevar a cabo biopsias líquidas tanto en sangre como en orina.

- Índice de salud prostática  
El índice de salud prostática de Beckam Coulter (PHI por sus siglas en inglés *Prostatic Health Index*) es un parámetro que se define mediante una fórmula matemática en la que se combina la concentración en suero de tres isoformas de la PSA, la [-2]proPSA (p2PSA), la PSA libre y la PSA total. El PHI se calcula mediante la siguiente ecuación  $( [p2PSA]/[fPSA] ) \times \sqrt{[tPSA]}$ . Este índice fue aprobado por la FDA en 2012 para el diagnóstico temprano del cáncer de próstata en hombres mayores de 50 años, con niveles de PSA en la zona gris y un tacto rectal no sospechoso, tras un estudio realizado por varios centros en el que se relacionaban valores altos de PHI (mayores de 35) con el cáncer de próstata<sup>39,40</sup>. Además, los valores de PHI se pueden asociar con la agresividad del cáncer, con valores más altos en pacientes con cánceres más agresivos<sup>41</sup>.
- Panel de cuatro calicreínas  
El panel de cuatro calicreínas (4Kscore) es un algoritmo que combina la concentración en suero de cuatro proteínas de la familia de las calicreínas, la PSA total, PSA libre, PSA intacta y la calicreína humana 2, en combinación con parámetros clínicos (edad, hallazgos en el tacto rectal e historial de biopsias previas) para predecir el riesgo que tiene un paciente de sufrir cáncer de próstata de alto grado<sup>42</sup>. El panel de cuatro calicreínas, que se puede analizar con la prueba 4Kscore® comercializada por OPKO Inc., permite reducir el número de hombres que se someten a biopsias, utilizando un umbral de riesgo del 6 % para el cáncer de próstata de alto grado<sup>41</sup>.
- Glicofomas de la PSA  
La PSA, como la mayoría de los marcadores tumorales séricos, es una glicoproteína. Se han descrito cambios específicos en los patrones de glicosilación de la PSA en las células tumorales LNCaP<sup>43</sup>. Se ha demostrado que estas diferencias también se

pueden encontrar en la PSA sérica, observándose diferentes patrones de glicosilación entre pacientes con cáncer de próstata y sanos<sup>44</sup>.

- Células tumorales circulantes (CTCs)

Las células tumorales tienen la capacidad de atravesar las paredes de los vasos y llegar al torrente sanguíneo, donde pueden ser detectadas. La única plataforma aprobada por la FDA para la detección de CTCs provenientes de cáncer de próstata es CellSearch<sup>®</sup>, que permite la detección de CTCs mediante un método directo basado en una captura inmunológica seguida de una combinación de selecciones inmunológicas positivas y negativas. Este método se está comenzando a aplicar a pacientes con cáncer de próstata, por lo que aún no hay datos que permitan avalar la capacidad de pronóstico de este método<sup>41</sup>.

- Gen del cáncer de próstata 3 (PCA3)

El PCA3 es un gen que transcribe un ARN mensajero (mARN) largo no codificante que se encuentra sobreexpresado en los tejidos con cáncer de próstata. La medida de la concentración de PCA3 se realiza mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR) en muestras de orina, obtenidas tras un masaje prostático para enriquecer la muestra en células prostáticas. Esta medida tiene que ser normalizada con la concentración del mARN del gen PSA presente en la muestra, el cual se expresa de igual manera en las células benignas y cancerosas. El test PROGENSA PCA3 de Hologic Inc. obtuvo la Conformidad Europea en 2006 y fue aprobado por la FDA en 2012 para decidir si repetir la biopsia en aquellos pacientes mayores de 50 años con biopsias previas negativas. El kit combina la captura selectiva, mediante hibridación con sondas de ADN de captura apropiadas, de moléculas de ARN procedentes de células prostáticas presentes en la orina, la amplificación isotérmica de las mismas mediante la amplificación

mediada por transcripción y la detección mediante el ensayo de protección de la hibridación, que incorpora sondas quimioluminiscentes complementarias al amplicón. Los resultados obtenidos se expresan como PCA3 score (puntuación de PCA3) que se calcula como la relación entre el número de copias de PCA3 y las copias de PSA en un mililitro de muestra multiplicado por mil. El límite de corte para esta prueba aún no está bien definido, aunque la FDA sugiere que una puntuación de PCA3 menor de 25 se asocia con una probabilidad baja de tener una biopsia positiva<sup>41,45,46</sup>.

- **TMPRSS2:ERG fusion gen**

La fusión aberrante de los genes ERG y TMPRSS2, regulada por andrógenos, se ha observado en el 15-59 % de los cánceres de próstata. La cantidad de genes fusionados TMPRSS2:ERG se puede determinar en muestras de orina obtenidas tras un masaje prostático. Al igual que para el PCA3, esta concentración debe normalizarse con respecto a la del mRNA del gen PSA. La puntuación de los análisis para el PCA3 y el TMPRSS2:ERG se usan de forma combinada para predecir la presencia de cáncer en una biopsia. Además, la puntuación del análisis del TMPRSS2:ERG se puede relacionar con la puntuación de Gleason y el estado clínico del tumor<sup>45</sup>.

- **ExoDX IntelliScore**

Los exosomas son pequeñas vesículas de membrana que son secretadas por muchos tipos de células, incluidas las tumorales. Son vehículos funcionales que llevan una carga compleja de proteínas, lípidos y fragmentos de ADN o ARN de las células de las que proceden. La prueba ExoDX Prostate IntelliScore (Exosome Diagnostics Inc.<sup>47</sup>) está diseñada para predecir la presencia de cáncer de próstata con una puntuación de Gleason mayor de 7 en hombre mayores de 50 años y con unos niveles de PSA entre 2 y 10 ng/mL. Esta prueba consiste en el aislamiento

de exosomas procedentes de células tumorales en muestras de orina sin la necesidad de la realización de un tacto rectal o masaje prostático previo. En estos exosomas se mide la concentración de dos genes que se sobreexpresan en casos de cáncer (PCA3, TMPRSS2:ERG) y del gen SPDEF que se emplea para normalizar la expresión génica. Posteriormente, mediante un algoritmo que incluye los valores de los ciclos umbral de cada amplificación RT-qPCR se obtiene una puntuación final entre 0 y 100, con un valor de corte de 15.6 a partir del cual el resultado se asocia con un cáncer de tipo 2 o superior<sup>48,49</sup>.

- **SelectMDX**  
Esta prueba desarrollada y comercializada por MDx Health<sup>50</sup> consiste en medir los niveles de mRNA de dos biomarcadores relacionados con el cáncer, el HOXC6 y el DLX1, en muestras de orina obtenidas tras un tacto rectal. Para obtener la puntuación final se pueden combinar con otras variables clínicas como la concentración de PSA en suero, la densidad de la PSA, el resultado del tacto rectal, la edad y el historial familiar de casos con cáncer de próstata. Esta prueba tiene un gran nivel de exactitud en la predicción para cánceres de próstata de alto grado<sup>48</sup>.
- **Test de microARNs**  
Los microARNs (miARNs) son un tipo de ARNs regulatorios pequeños, de 18 a 25 nucleótidos. Se ha descrito que los patrones de expresión de los miARNs se pueden utilizar como firmas fenotípicas del cáncer de próstata y se relacionan con la progresión, agresividad, metástasis y recurrencia del cáncer de próstata. Se ha encontrado que los niveles en suero y orina de algunos miARNs, como el miR-141, miR-107 y miR-574-39, pueden distinguir entre pacientes sanos y con cáncer de próstata, aunque son necesarios más estudios para aceptar su uso en clínica<sup>26</sup>.

En los párrafos precedentes, se han constatado las carencias y problemas asociados a los biomarcadores de cáncer de próstata que se usan para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de esta enfermedad. De la revisión realizada se concluye la necesidad de identificar nuevos biomarcadores que superen a las pruebas tradicionales. El conjunto de los nuevos ensayos que se están estudiando para su posible implantación en el diagnóstico del cáncer de próstata apuntan al empleo combinado de diversos biomarcadores.

## 1.2 Glicosilación y cáncer

La glicosilación es una modificación postraducciona que tiene lugar en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi, en la cual mediante un proceso enzimático se produce la unión de carbohidratos (también llamados sacáridos o glicanos) a otros sacáridos, lípidos o proteínas. El glicoma representa la colección total de glicanos sintetizados por una célula, tejido u organismo bajo unas condiciones específicas de tiempo, espacio y entorno. Los glicoconjugados resultantes se definen principalmente de acuerdo con la naturaleza de la parte no glicosilada y el tipo de enlace a la misma. Las moléculas glicosiladas presentes en las células son las glicoproteínas, los glicolípidos, los proteoglicanos, las proteínas ancladas mediante GPI (glicosilfosfatidilinositol) y los glicanos libres. La función biológica de los azúcares y los glicoconjugados en las células es muy variada, estando involucrados en mecanismos de reconocimiento, estructura, modulación y señalización celular; en la adhesión célula-célula, en la inflamación, en las interacciones patógeno-huésped y en la entrada viral. A nivel de proteína los azúcares están involucrados en la maduración y renovación de las proteínas y en la unión y activación de receptores<sup>51,52,53</sup>.

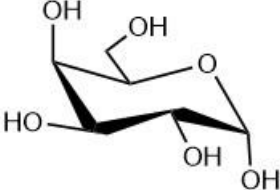
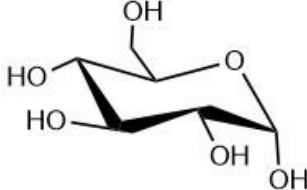
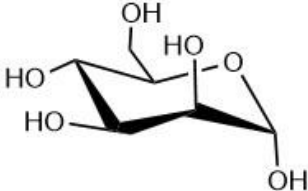
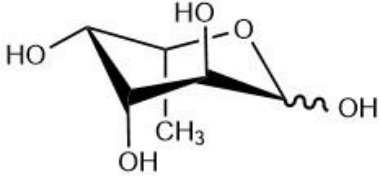
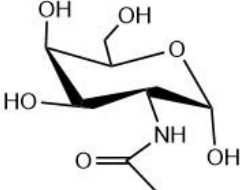
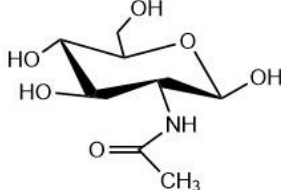
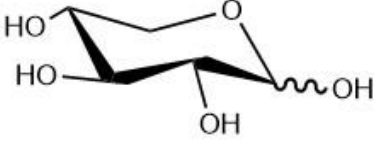
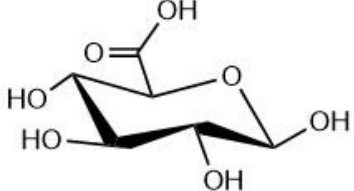
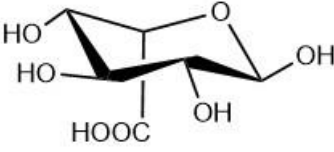
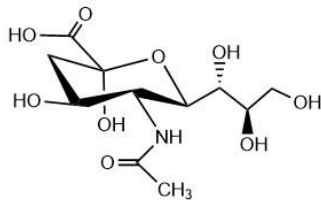
El proceso de biosíntesis de los glicanos no está basado en plantillas como el de los ácidos nucleicos. En los mamíferos se construyen a partir

de la combinación de diez monosacáridos, que actúan como bloques de construcción conectándose uno al otro a través de enlaces glucosídicos. Esta unión puede producirse con múltiples combinaciones mediante la acción combinada de las enzimas glicosiltransferasa y glicosidasa. La acción de las enzimas está controlada por la disponibilidad del sustrato, la actividad enzimática, los niveles de transcripción génica y la localización de las enzimas dentro de los orgánulos. Se obtiene aún una mayor diversidad estructural a través de modificaciones de estos sacáridos, como por ejemplo la fosforilación, sulfatación, acetilación y el enlace de los glicanos a varias macromoléculas<sup>54</sup>.

Los monosacáridos que forman los glicanos son carbohidratos (polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas) que no pueden hidrolizarse a una forma más simple, con la fórmula empírica general  $C_x(H_2O)_n$ , donde  $n$  es un número entero entre 3 y 9. En su forma libre se encuentran en una mezcla de las formas cíclica y abierta en equilibrio, con un porcentaje de cada una de ellas que depende de la estructura del azúcar, mientras que cuando se unen para formar un glicano estos se encuentran en forma de anillo. Esta forma de anillo genera un centro quiral anomérico en el carbono 1 de los polihidroxialdehídos, o en el carbono 2 en las polihidroxicetonas, a través del cual se produce el enlace glucosídico de los monosacáridos entre sí. Este enlace puede ser de dos tipos  $\alpha$  o  $\beta$  según la posición relativa entre el oxígeno glucosídico y el carbono anomérico. Los glicoconjugados resultantes pueden ser muy ramificados, complejos o lineales y debido a la gran cantidad de estructuras posibles, estos contienen una gran cantidad de información<sup>54</sup>.

Los diez monosacáridos que forman los glicoconjugados son los siguientes: D-galactosa (Gal), D-glucosa (Glc), D-manosa (Man), L-fucosa (fuc), N-acetil-D-galactosamina (GalNac), D-xilosa (Xyl), N-acetil-D-glucosamina (GlcNac), ácido D-glucorónico (GlcA), ácido L-idurónico (IdoA) y ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico (SA, Neu5Ac o NeuAc)<sup>52</sup> (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Estructura química de los diez monosacáridos que forman los glicanos.

<p style="text-align: center;"><b>GALACTOSA</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>D-GLUCOSA</b></p> 
<p style="text-align: center;"><b>MANOSA</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>L-FUCOSA</b></p> 
<p style="text-align: center;"><b>N-ACETILGALACTOSAMINA</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>N-ACETILGLUCOSAMINA</b></p> 
<p style="text-align: center;"><b>D-XILOSA</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>ÁCIDO GLUCORÓNICO</b></p> 
<p style="text-align: center;"><b>ÁCIDO IDURÓNICO</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>ÁCIDO SIÁLICO</b></p> 



Las glicoproteínas son glicoconjugados en los que la proteína tiene uno o más glicanos unidos covalentemente al esqueleto polipeptídico. Dependiendo del aminoácido y al átomo al que se unan los glicanos se distinguen dos tipos de glicoproteínas, las O-glicoproteínas y las N-glicoproteínas. En las O-glicoproteínas el glicano se une a través del carbono anomérico del monosacárido N-acetilgalactosamina o del de la xilosa al átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de una serina o treonina. En las N-glicoproteínas, el carbono anomérico de la N-acetilgalactosamina se enlaza a un átomo de nitrógeno del grupo amida de la asparagina (Asn). Esta unión se produce solo si la asparagina es parte de la secuencia de aminoácido Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X representa cualquier aminoácido<sup>55</sup>. La glicosilación de las proteínas no es un proceso aleatorio si no que es específico del sitio, ya que se han encontrado tipos de glicanos específicos en subconjuntos restringidos de proteínas<sup>56</sup>.

Los cambios en el proceso de glicosilación de las glicoproteínas de membrana asociados al cáncer fueron descubiertos en 1969<sup>57</sup>. Las células tumorales muestran una amplia gama de alteraciones en la glicosilación en comparación con las células sanas, entre las que se incluyen la sobreexpresión y la infraexpresión de glicanos presentes de manera natural, así como la neoexpresión de glicanos que normalmente están restringidos a los tejidos embrionarios. Esta glicosilación aberrante de las proteínas, tanto de membrana como secretadas, ha pasado a ser un sello distintivo del cáncer.

Los cambios más comunes en la glicosilación que están asociados a la presencia de cáncer son el truncado e incremento de tamaño de los O-glicanos y la sialilación, fucosilación y ramificación de los N-glicanos (Figura 1.7).

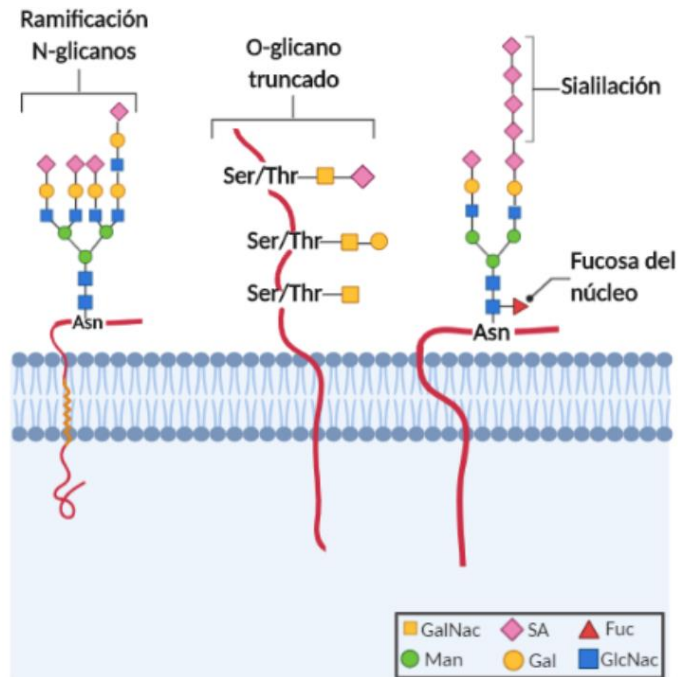


Figura 1.7: Cambios más comunes en la glicosilación de las N- y O-glicoproteínas asociados a la presencia de cáncer.

- Sialilación

La sialilación consiste en la incorporación aberrante de ácidos siálicos en la posición terminal o lateral de los oligosacáridos. Esta es una modificación importante en la glicosilación celular, ya que los glicanos que contienen ácidos siálicos desempeñan importantes funciones en el reconocimiento, la adhesión y la señalización celulares. Se ha asociado el incremento en la sialilación global, especialmente en los ácidos siálicos con unión  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$ -, con el cáncer debido a la alteración de la expresión de las enzimas sialiltransferasas<sup>58</sup>. El aumento de la sialilación en el cáncer también incluye la expresión del ácido polisiálico, que está asociado con varios tipos de cánceres y con frecuencia se expresa en tumores de alto grado<sup>59</sup>.

- Fucosilación

La fucosilación es una modificación no extensible que consiste en la adición del monosacárido fucosa a la cadena de glicanos,

pudiendo ser fucosilación terminal e interna o del núcleo, también conocida como core. Estas reacciones de transferencia de unidades de fucosa se producen por la acción de múltiples enzimas de la familia fucosiltransferasas. La fucosilación terminal consiste en la unión de una fucosa a un oligosacárido mediante un enlace  $\alpha(1,2)$  a una galactosa terminal o mediante un enlace  $\alpha(1,3/4)$  a un residuo GlcNac subterminal. La fucosilación del núcleo consiste en la unión de una fucosa mediante un enlace  $\alpha(1,6)$  al residuo GalNac más interno del N-glicano a través de la acción de la enzima Fuc-TVIII<sup>52,60</sup>.

- Ramificación de los N-glicanos  
Uno de los cambios más comunes es un incremento en el tamaño y la ramificación de los N-glicanos. El aumento en la ramificación está asociado a un incremento en la actividad de la enzima N-acetilglucosaminiltransferasa V. Las nuevas ramificaciones crean nuevos sitios para la unión de ácidos siálicos terminales, contribuyendo también al aumento de la sialilación global<sup>61</sup>.
- Truncamiento de los O-glicanos  
Otra característica común de los tumores es la sobreexpresión de O-glicanos truncados resultantes de la síntesis incompleta de los O-glicanos en las células tumorales. También se producen cambios que afectan a las modificaciones post-glicosilación, reduciéndose la sulfatación y la acetilación de los ácidos siálicos<sup>62</sup>.

La alteración de los glicanos de la superficie de las células tumorales afecta a las interacciones con lectinas endógenas, influyendo en el potencial que tienen las células tumorales de formar metástasis, a las interacciones de estas células con su entorno y modula en gran medida su fenotipo. En paralelo, la expresión y los niveles de las proteínas que se unen a carbohidratos también cambian durante la transformación

maligna, lo que conduce en general a una presencia alterada de los glicanos y sus receptores. Los mecanismos por los cuales los cambios en la glicosilación median la metástasis y la invasión de los tumores son en su mayoría desconocidos, conociéndose solamente las funciones de algunas proteínas de la superficie celular y los perfiles de sus glicanos<sup>51,63</sup>.

Aunque la glicosilación aberrante no está incluida en las ocho características del cáncer, muchas evidencias muestran que los glicanos están involucrados en la adquisición de todas estas capacidades distintivas de los tumores. Algunos de los cambios en la glicosilación son específicos de los tumores, por lo que estas alteraciones únicas en los patrones de glicosilación pueden servir como una característica distintiva de las células cancerosas, proporcionando nuevas herramientas de diagnóstico. A través del estudio de los patrones de glicosilación de diferentes proteínas es posible identificar nuevos biomarcadores sensibles y específicos del cáncer, que podrían ser útiles en la detección temprana de la enfermedad<sup>64,65</sup>.

### *1.2.1 Glicosilación aberrante de la PSA*

El antígeno específico de la próstata es una N-glicoproteína que contiene un 8 % de carbohidratos, con un solo sitio de glicosilación en la asparagina en la posición 69 (también denominada asparagina 61, dependiendo del sistema de numeración). El N-glicano de la PSA estabiliza la estructura de la enzima debido a su importancia en el plegamiento mientras que sólo en cierta medida cambia el perfil de activación y la actividad enzimática<sup>66</sup>. Se han encontrado 61 perfiles de glicosilación para la PSA y sus isoformas aisladas de pacientes sanos en varios estudios mediante espectrometría de masas. La estructura mayoritaria encontrada es biantenaria con ácidos siálicos terminales y normalmente con fucosa en el núcleo y N-acetilgalactosaminas terminales (Figura 1.8)<sup>67,68</sup>. Una mutación en el gen *KLK3* provoca la conversión del aminoácido aspartato en asparagina en la posición 102, y

en consecuencia se crea un nuevo sitio de glicosilación. Sin embargo, el patrón de glicanos asociado a esta posición es diferente del de la Asn 69, probablemente debido a la cercanía de este aminoácido a la zona activa de la proteína. La diferencia más significativa es que no se encontraron glicanos fucosilados. Esta mutación está relacionada con la supervivencia de los pacientes con cáncer de próstata (Figura 1.9)<sup>69</sup>.

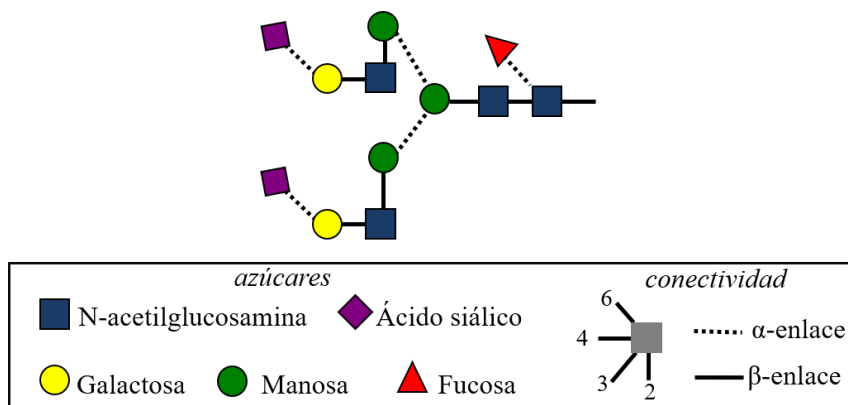


Figura 1.8: Estructura mayoritaria de la PSA en la que se muestra la conectividad y el tipo de enlace entre los azúcares.

Aunque aún no ha sido aprobado por los organismos reguladores, la aplicación del análisis de los perfiles de glicosilación para el diagnóstico robusto y preciso del cáncer de próstata está ganando impulso en los últimos años<sup>66</sup>.

Los primeros estudios se centraron en la caracterización de los glicanos de la PSA aislada de la línea celular tumoral LNCaP, observándose una diferencia con respecto a los glicanos de la PSA proveniente de células sanas, obtenida del líquido seminal. Para la PSA proveniente de células tumorales se encontró una mezcla de estructuras biantenarias y triantenarias, con un menor contenido de ácido siálico y un incremento en el contenido de fucosa y N-acetilgalactosamina<sup>43,70</sup>. Tras esta primera observación era de esperar que estas estructuras alteradas también estuviesen presentes en la PSA proveniente del suero de pacientes con cáncer de próstata. Sin embargo, se observaron

patrones de glicosilación significativamente diferentes entre la PSA aislada de la línea celular LNCaP y la de pacientes con cáncer de próstata<sup>71</sup>. Por este motivo múltiples estudios se han centrado en encontrar las diferencias en la glicosilación de la PSA proveniente de suero de individuos sanos o con HBP y de pacientes con cáncer de próstata. En la PSA aislada de suero de pacientes con cáncer de próstata se observaron cambios en el contenido de fucosa del núcleo y en el ácido siálico  $\alpha(2,6)$  de los glicanos biantenarios. También se observaron ácidos siálicos  $\alpha(2,3)$ , uniones GalNac y GlcNac y un aumento de las estructuras multiantenarias, principalmente triantenarias y tetraantenarias. Además se ha observado en la PSA aislada de pacientes con cáncer la presencia de O-glicanos truncados unidos a la Thr de la posición 125, que consisten en una GalNac unida a una GlcNac (Figura 1.9)<sup>20, 66,72, 73</sup>.

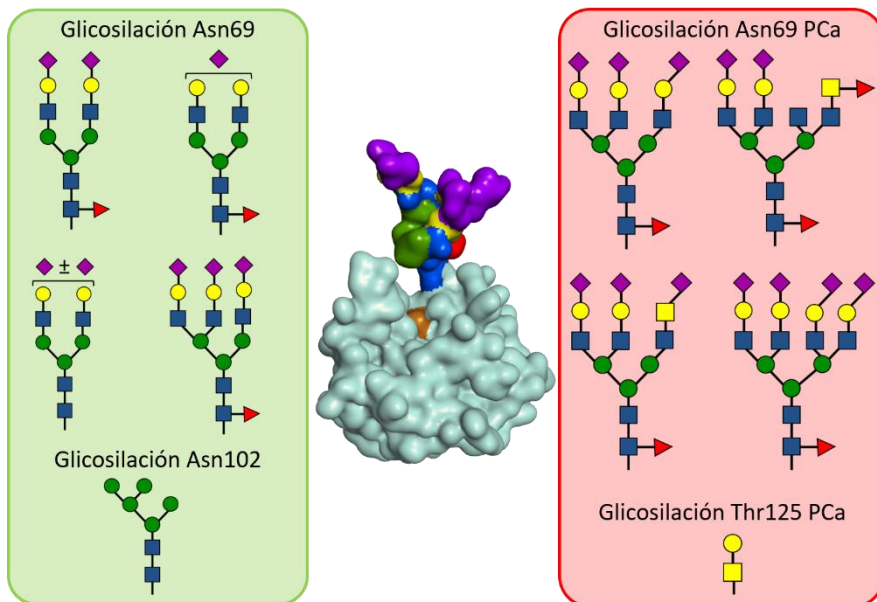


Figura 1.9: Estructuras mayoritarias de los N-glicanos de la Asn69 y Asn102 de la PSA de pacientes sanos o con BPH (cuadro verde) y de los pacientes con cáncer de próstata (cuadro rojo). En el centro se representa la estructura tridimensional de la PSA (PDB 3QUM) con el centro activo en marrón.

De esta forma la detección de cambios en los glicanos de la PSA asociados al desarrollo del cáncer de próstata puede ser una buena

alternativa para mejorar la especificidad de los ensayos actualmente en uso, con el objetivo de detectar este tipo de cáncer de forma temprana.

Antecedentes con otras proteínas avalan esta hipótesis. Este es el caso de la  $\alpha$ -fetoproteína, la medida de los niveles de la fracción fucosilada de la  $\alpha$ -fetoproteína en suero permitió desarrollar un método de diagnóstico más fiable, con una mejor discriminación entre el cáncer hepatocelular y otras enfermedades hepáticas benignas<sup>74</sup>.

### 1.3 Bioensayos para detectar la glicosilación

El análisis de la glicosilación de las proteínas se puede realizar con múltiples técnicas según el nivel de detalle e información deseados. Estas se pueden dividir en técnicas que permiten el análisis de los patrones de glicosilación mediante un análisis estructural completo de los glicanos, denominadas técnicas glicómicas o glicoproteómicas, y técnicas que permiten la caracterización de azúcares específicos dentro de la estructura del glicano.

Para el análisis estructural de los glicanos de las proteínas presentes en el suero que pueden actuar como biomarcadores del cáncer se han utilizado varias metodologías analíticas, entre las que destacan la espectrometría de masas (MS), la resonancia magnética nuclear (RMN), la electroforesis capilar, la cromatografía de líquidos y sus combinaciones. La mayoría de estas técnicas necesitan una preconcentración de la muestra seguida de una digestión química o enzimática para separar los glicanos del núcleo proteico y un marcaje o manipulación química antes del análisis. Estas técnicas se han convertido en una herramienta poderosa para el análisis de los perfiles de los glicanos debido a su relativa sensibilidad y precisión. Sin embargo son técnicas con protocolos largos, de alto coste, que necesitan personal cualificado tanto para la realización del análisis como para la

interpretación de los resultados y suelen necesitar un pretratamiento de la muestra, lo que dificulta el análisis directo de muestras clínicas y su compatibilidad con el diagnóstico a la cabecera del paciente (POC por sus siglas en inglés-*point of care*)<sup>75,76,77</sup>.

Para el diseño de pruebas de diagnóstico que puedan llegar a trasladarse a la práctica clínica son necesarios ensayos más sencillos que permitan la detección de determinados azúcares asociados a la glicosilación aberrante en el cáncer, tales como los ensayos bioanalíticos y en concreto los biosensores. En estos ensayos se caracterizan azúcares específicos del glicano en la proteína completa y no los perfiles o patrones de glicanos completos.

Un sensor químico se define como un dispositivo capaz de proporcionar información analítica en tiempo real sobre una muestra. Los sensores están formados por dos elementos, el elemento de reconocimiento, que posee afinidad por el analito de interés y con el que este interactúa de manera selectiva; y el de transducción, que es el encargado de transformar el cambio producido en el elemento de reconocimiento tras la interacción con el analito en una señal física medible. Los biosensores son sensores químicos en los que el elemento de reconocimiento es de naturaleza biológica o bioquímica<sup>78</sup>. Las ventajas que presentan los biosensores frente a otras técnicas son la alta sensibilidad y especificidad, rapidez, fácil manejo, utilizan volúmenes pequeños de muestra y no requieren personal cualificado para su utilización<sup>79</sup>.

Para el diseño y desarrollo de ensayos bioanalíticos con buenos resultados para la detección específica de azúcares de los glicanos es necesario disponer de bioelementos de reconocimiento con alta afinidad y especificidad hacia la región de los glicanos de una determinada proteína biomarcadora del cáncer. Con este fin se han descrito ensayos basados en el uso de receptores naturales (anticuerpos y lectinas) y



artificiales (ácido borónico y sus derivados y aptámeros), los cuales se comentarán a continuación.

- Ensayos basados en el enlace al ácido borónico

El ácido borónico y sus derivados se enlazan covalentemente a los grupos 1,2- y 1,3-dioles de los glicanos, mediante una reacción reversible de formación de un éster, que es dependiente del pH y del disolvente. La fuerza del enlace entre el ácido borónico y los azúcares viene determinada por la orientación y la posición relativa de los grupos hidroxilo, y por este motivo los diferentes derivados del ácido borónico pueden discriminar entre sacáridos similares estructuralmente<sup>80,81</sup>.

Los ácidos borónicos muestran una buena unión a los azúcares con forma de furanosa (anillo de cuatro carbonos y un oxígeno), mientras que la mayoría de los carbohidratos en las moléculas biológicas más relevantes tienen una forma de piranosa (anillo de cinco carbonos y un oxígeno). Las mejores constantes de enlace o la mayor afinidad se obtienen en medios alcalinos, que no serían compatibles con los sistemas biológicos<sup>82</sup>.

Además, se ha utilizado la funcionalización con ácidos borónicos para conferir esta capacidad de enlace hacia los carbohidratos a otros receptores como péptidos, polímeros molecularmente impresos (MIP) y aptámeros<sup>82</sup>.

- Ensayos basados en anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmune en respuesta a una molécula extraña que entra al organismo, denominada antígeno. Estos se unen específicamente a una pequeña parte del antígeno denominada epítipo, que normalmente consiste en unos pocos aminoácidos o monosacáridos.

La obtención de anticuerpos altamente selectivos frente a glicanos es difícil debido a que estos son poco inmunogénicos. También debe tenerse en cuenta la similitud en las secuencias de

carbohidratos asociados a los gliconjugados entre diferentes especies, que conlleva que estos no sean inmunogénicos en los mamíferos que habitualmente sirven como vehículos para la producción de anticuerpos monoclonales. Esto ha llevado a explorar la posibilidad de utilizar otras especies no vertebradas, evolutivamente más separadas de los humanos, para obtener estos anticuerpos<sup>83,84</sup>. Además, la interacción anticuerpo-carbohidrato es más débil que la de anticuerpo-proteína resultando en una menor afinidad, que limita la sensibilidad de los ensayos. No obstante, la afinidad puede incrementarse generando anticuerpos que contengan dos o más sitios de unión a glicanos o mediante la unión no covalente a oligómeros con múltiples sitios de unión<sup>85</sup>.

A pesar de los esfuerzos y estudios realizados, muchos de los anticuerpos obtenidos frente a glicanos tienen baja afinidad y falta de especificidad, puesto que reconocen familias de glicanos estructuralmente relacionados en lugar de una sola estructura. Además, los anticuerpos disponibles cubren un conjunto pequeño de familias y de glicanos, careciendo de su correspondiente anticuerpo muchos de los glicanos más importantes que sufren modificaciones<sup>83</sup>.

- Ensayos basados en lectinas

Las lectinas son proteínas que se unen a los glicanos pero no tiene un origen inmunogénico, es decir, se excluyen los anticuerpos. Están presentes en plantas, bacterias y animales. Se aíslan de fuentes naturales y muestran una gran selectividad frente a enlaces glicosídicos entre sacáridos definidos. Las lectinas participan en numerosos eventos fisiológicos, entre los que se encuentran las interacciones entre las células. Normalmente una lectina tiene dos o más sitios de unión facilitando la aglutinación de las células, característica distintiva frente a otras proteínas capaces de unirse a los glicanos. Además,

desempeñan un papel crucial como herramienta para el cribado de glicanos, en la purificación de glicoproteínas, el marcaje de células, pueden formar parte de los nanodispositivos diseñados para transportar fármacos en terapias dirigidas (balas mágicas) y ser útiles para la detección del cáncer<sup>86,87,88</sup>.

Las lectinas presentan baja afinidad por los monosacáridos, con constantes de disociación en el orden milimolar. Para los oligosacáridos y los glicanos de glicoproteínas las afinidades son del orden micromolar, a pesar de la multivalencia por la que tienen lugar múltiples contactos con la superficie de la lectina. Esto puede ser debido a que los sitios de unión, que se encuentran en la superficie de las lectinas, son pocos profundos y están muy expuestos al disolvente, generándose una competencia entre la interacción con los glicanos y con el disolvente. Esta es también una posible explicación a la falta de selectividad por los azúcares individuales. Para aumentar la afinidad se ha comenzado a realizar ingeniería de lectinas para crear lectinas artificiales, obteniendo lectinas dirigidas hacia los azúcares de interés<sup>82,89</sup>.

Hasta la actualidad se han identificado varios cientos de lectinas, de las que aproximadamente cien están disponibles comercialmente. Se utilizan solas en ensayos de unión a glicanos o en micromatrices con diferentes lectinas para la rápida caracterización del perfil de los glicanos presentes en una muestra<sup>82</sup>.

Estos receptores han sido utilizados en el desarrollo de ensayos bioanalíticos para detectar las modificaciones aberrantes que se producen en uno o varios azúcares de los glicanos de una proteína. Sin embargo, muchas de las proteínas secretadas de las células tumorales comparten cambios similares en la expresión de los glicanos, y si solo se detectan los azúcares no es posible asociarlos a una determinada proteína. Esto significa que idealmente los receptores deben reconocer

el glicano aberrante específico en cada sitio específico, es decir, es necesaria información de las cadenas de carbohidratos y péptidos. Actualmente, estos tipos de receptores no están disponibles y dirigir anticuerpos a una determinada región que comprenda parte de la proteína y parte de los glicanos no es una tarea fácil. Mientras tanto se han desarrollado ensayos que combinan dos receptores, un anticuerpo para el reconocimiento de proteínas y una lectina, para el glicano de interés.

Para cumplir con este requisito se han propuesto los aptámeros como receptores ideales por sus características, las cuales se describirán en la siguiente sección.

### ***1.3.1 Aptámeros como receptores de biomarcadores glicosilados***

Los aptámeros (del latín *aptus* que significa encajar y del griego *mero* que significa partícula) son oligonucleótidos de ARN o ADN, de cadena simple, sintéticos y capaces de reconocer selectivamente una gran variedad de dianas, desde iones hasta células. La unión aptámero-diana se produce como consecuencia de interacciones reversibles en las que solo intervienen enlaces no covalentes, como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o enlaces hidrofóbicos. Estas interacciones se establecen entre grupos funcionales adecuados de las dos moléculas que interactúan, en un número muy elevado para conferir gran estabilidad al complejo formado. Sin embargo, todas estas interacciones son de corto alcance, por lo que para que puedan ser operativas los aptámeros adoptan alguna estructura tridimensional complementaria en forma a la diana, que permite el enlace de afinidad con el mismo. Una vez identificados, los aptámeros se pueden obtener en un proceso de síntesis química, muy reproducible y a un coste razonable.

Los aptámeros se obtienen mediante un proceso de selección *in vitro* denominado SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) descrito por primera vez en 1990 por investigadores de dos

laboratorios diferentes<sup>90,91</sup>. Se trata de un proceso de evolución darwiniano, similar a la selección natural, en el que se utilizan rondas iterativas de selección y amplificación para enriquecer una colección inicial de oligonucleótidos de ADN o ARN, que contiene  $10^{12}$ - $10^{14}$  secuencias diferentes con afinidad muy variada por la diana, en oligonucleótidos que presenten una elevada afinidad y selectividad por la molécula que se desea bajo unas condiciones definidas<sup>92</sup>.

El punto de partida de un proceso de selección es la colección inicial de oligonucleótidos de ADN o ARN de cadena sencilla, formada por una región central variable, típicamente con un tamaño de entre 20 y 80 nucleótidos, y dos zonas constantes que la flanquean, normalmente de un tamaño de 20-25 nucleótidos cada una y que definen las secuencias que se utilizarán como cebador en la necesaria amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Las etapas básicas de este proceso son las siguientes: incubación de la colección inicial con la diana, separación de las secuencias no enlazadas, elución de las que se hayan enlazado, amplificación de estas mediante PCR y acondicionamiento de las secuencias obtenidas para transformarlas en secuencias de hebra sencilla. Esta nueva y enriquecida colección de secuencias se utiliza para comenzar una nueva etapa de interacción con la diana, y con ella un nuevo ciclo de selección con condiciones idénticas o más restrictivas (Figura 1.10). Mediante la repetición iterativa de estos ciclos de selección se consigue reducir la gran variabilidad inicial, enriqueciendo la colección en secuencias con motivos similares y con gran afinidad y especificidad por la diana. Tras alcanzar un cierto grado de enriquecimiento, la última ronda del SELEX se detiene después de la amplificación y los productos de la PCR se clonan para obtener aptámeros individuales que serán secuenciados y analizados<sup>93</sup>. Una vez seleccionados y conociendo su secuencia, los aptámeros pueden sintetizarse mediante un proceso químico que permite obtener escalas más grandes que en la producción de anticuerpos, a un menor coste. Además, la síntesis química es muy reproducible y reduce la variabilidad entre lotes, un problema que afecta

a los anticuerpos empleados como reactivos analíticos y conduce a falta de reproducibilidad en los resultados obtenidos.

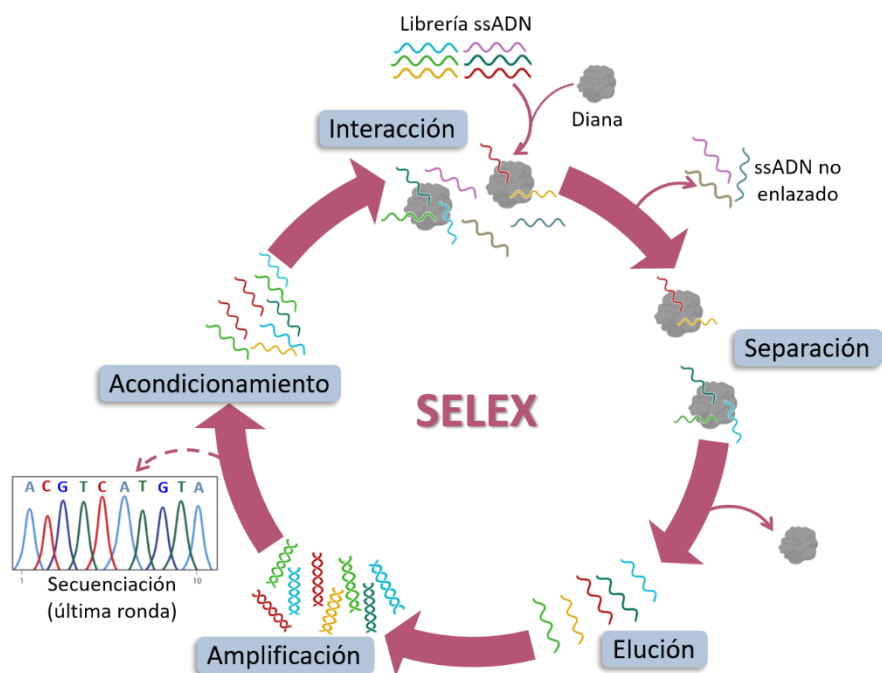


Figura 1.10: Esquema de las etapas de un proceso SELEX para la obtención de aptámeros hacia una determinada diana.

Los aptámeros son de pequeño tamaño, menores de 100 bases, lo que permite que se unan a sitios de la diana que son inaccesibles para los anticuerpos, de mayor tamaño. Se pueden obtener de una forma versátil y bioquímicamente pura, que puede ser diseñada para dirigirla hacia un epítipo o región en concreto de la molécula o estructura diana, consiguiendo receptores que pueden llegar a tener afinidades en el rango subnanomolar. Por todos estos motivos, los aptámeros son buenos candidatos para ser receptores para los glicanos. A pesar de que los azúcares no se consideran muy aptagénicos debido a que sus estructuras tienen pocos grupos cargados y carecen de anillos aromáticos, se han descrito aptámeros dirigidos hacia diferentes tipos de carbohidratos como monosacáridos, oligo y polisacáridos, aminoglicosidos y otros

antibióticos y a los glicanos de glicoproteínas, e incluso aptámeros capaces de diferenciar un único grupo funcional del carbohidrato<sup>94,95</sup>.

Dado que la mayoría de los marcadores tumorales son glicoproteínas se han descrito aptámeros contra las mismas. Sin embargo, la mayoría de estos SELEX frente a glicoproteínas se han realizado sin dirigir la selección hacia ninguna región específica de la diana, por lo que no se sabe en qué medida están involucrados los glicanos, la región peptídica o ambos en el reconocimiento. Asimismo, la dificultad de caracterizar completamente el complejo aptámero-ligando está retrasando la obtención de esta información. Esta selección dirigida frente a los glicanos es imposible si como diana se utilizan péptidos sintéticos pequeños o proteínas expresadas en células no humanas, ya que las bacterias no son capaces de incorporar la cadena de azúcares. Solamente aquellos aptámeros obtenidos en procesos en los que se empleen proteínas humanas purificadas o péptidos recombinantes expresados en líneas celulares humanas podrán tener la habilidad de reconocer los glicanos. Sin embargo, hasta el momento solamente unos pocos aptámeros han sido evaluados por su capacidad para discriminar azúcares.

Los primeros intentos de dirigir la selección frente a los glicanos consistieron en la utilización de carbohidratos aislados como dianas<sup>96</sup>. Recientemente se comenzaron a utilizar diferentes variantes del proceso de selección para poder utilizar dianas más grandes como la glicoproteína completa. Una posibilidad es la incorporación de nucleótidos modificados, como la introducción de un nucleótido modificado con ácido borónico (ácido borónico-timidina-5'-trifosfato) en la librería inicial de secuencias para dirigir la selección frente a la región de los glicanos de las glicoproteínas<sup>97</sup>. Otra posibilidad son los denominados SELEX de epítipo específico, que es un tipo especial de SELEX híbrido en el que las primeras rondas se realizan de la forma tradicional (descrita previamente) y las últimas requieren un competidor específico para la elución de las secuencias enlazadas<sup>98</sup>. También se

pueden utilizar fragmentos peptídicos sintéticos que contengan el glicano, en lugar de la glicoproteína completa como diana en el proceso de selección. El uso de péptidos sintéticos como dianas permite la incorporación de etapas de contra-selección usando la variante sintética no glicosilada, siendo esta otra posibilidad para dirigir los aptámeros hacia el sitio de glicosilación<sup>99</sup>.

Debido a que muchas de las estructuras de los glicanos unidos a las proteínas del suero humano aún siguen sin conocerse, es clara la necesidad de receptores que reconozcan la zona de glicosilación y que sean capaces de diferenciar mínimos cambios estructurales. Debido a la importancia biológica de las glicoproteínas se están realizando esfuerzos para desarrollar este tipo de receptores, pero hasta el momento ninguno de los comentados anteriormente cumple los requisitos. El desarrollo de receptores sintéticos parece la ruta más prometedora para conseguir la estricta selectividad necesaria. En este sentido, los aptámeros podrían ser una solución tanto si se utilizan glicopéptidos o la glicoproteína al completo como diana. Como se ha comentado hasta ahora, los aptámeros seleccionados contra las glicoproteínas se unen preferentemente a la secuencia peptídica a menos que haya muchos azúcares idénticos en la estructura, por lo que son necesarias nuevas estrategias que dirijan la selección hacia el glicano y su región circundante. Hasta el momento solo se ha descrito un aptámero capaz de reconocer simultáneamente al péptido y a la región de los glicanos, aunque solamente se ensayó frente a péptidos pequeños. Se desconoce por tanto si mantiene la afinidad frente a la proteína completa, cuya estructura secundaria puede diferir de la del péptido<sup>100</sup>. Actualmente no existe un receptor sintético capaz de integrar en el reconocimiento del glicano y de los péptidos que lo rodean en una glicoproteína intacta completa, y solo recientemente se ha descubierto que una lectina de mamíferos, Dectin-1, es capaz de reconocer los glicanos y algunos péptidos cercanos en los anticuerpos IgG<sup>101</sup>.



## 1.4 Aptámeros y aptasensores para la PSA

Hasta la actualidad se han descrito cinco aptámeros para la PSA, tres de ellos son de ADN y dos de ARN (Tabla 1.2). En ninguno de los casos se dirigió la selección hacia la región glicosilada por lo que cabe esperar que los aptámeros obtenidos reconozcan la región peptídica de la proteína.

S. Jeong *et al.* diseñaron un proceso de selección de aptámeros de ARN frente a la PSA activa. Para dirigir la selección introdujeron contra-selecciones frente a la proPSA inactiva y a la proteína GST (Transferasa Glutati6n-S). Tras nueve rondas de selecci6n obtuvieron un aptámero capaz de unirse a la PSA activa, del cual no aportan datos sobre su afinidad. Todas las proteínas PSA fueron expresadas de manera recombinante en *Escherichia coli*, bacteria que no posee mecanismo de glicosilaci6n, por lo que las proteínas utilizadas no poseen regi6n glicosilada y por lo tanto es imposible que los aptámeros obtenidos reconozcan esta regi6n de la proteína<sup>102</sup>.

M. Svobodova *et al.* emplearon ARN modificado con un F en la posici6n 2' de la ribosa para obtener aptámeros frente a la PSA modificada con biotina inmovilizada sobre partículas magnéticas de estreptavidina. En algunas rondas se incubó la librería de ARN con PSA en disoluci6n y después se atrapó el complejo PSA-ARN con partículas magnéticas, para eliminar posibles impedimétricos estéricos y superar los problemas asociados a la inmovilizaci6n de proteínas, reducci6n de la movilidad de la PSA y eliminaci6n de posibles sitios de enlace. Tambi6n se realizaron selecciones negativas frente a las partículas magnéticas sin modificar. Tras trece rondas de selecci6n se obtienen dos aptámeros con constantes de disociaci6n de 870 nM y 630 nM<sup>103</sup>.

N. Savory *et al.* realizaron tres rondas de un SELEX tradicional junto con modificaciones post-SELEX utilizando algoritmos genéticos de amplificaci6n, cruzamiento y mutaci6n *in silico* para la obtenci6n de

aptámeros de ADN frente a la PSA. De los aptámeros obtenidos, se escogió uno de ellos como el mejor candidato con una constante de disociación estimada de varias decenas en el orden nanomolar<sup>104</sup>.

Park *et al.* utilizaron una separación bajo la acción de un campo acústico (acoustophoresis) en un sistema microfluídico durante el proceso SELEX, ya que de esta forma es posible realizar las etapas de lavado y separación a la vez, sin ser necesario realizar un paso adicional. A partir de la cuarta ronda introdujeron contra-selecciones frente a otras proteínas presentes en el suero humano como la albúmina de suero humana (HSA), IgG y fibrinógeno. Tras ocho rondas de selección realizaron la secuenciación masiva de los oligonucleótidos que pervivían en la última ronda obteniendo siete aptámeros de ADN frente a la PSA. El mejor de ellos presenta una constante de disociación de 0.7 nM<sup>105</sup>.

Li *et al.* realizaron un proceso de selección tradicional de aptámeros de ADN frente a la PSA inmovilizada sobre una membrana. El mejor candidato obtenido tras siete rondas presenta una constante de disociación de 360 nM<sup>106</sup>.

Tabla 1.2: Secuencias y constantes de afinidad de los aptámeros obtenidos para la PSA

Tipo	Secuencia (5'→3')	K <sub>D</sub> (nM)	Ref.
ARN	CCGUCAGGUCACGGCAGCGAAGCUCUAGGCG CGGCCAGUUGC	–	102
ARN	2'F-AGCUCCAGAAGAUAAAUUACAGGUCCA GGCGCGUUAGCAAACC GCGGAUCAAACUUA GUUGACAACUAGGAUACUAUGACCC	630	103
	2'F-AGCUCCAGAAGAUAAAUUACAGGUACG GUUCACGCCUGUCUCAUGCUGACUAAGAAA GUUUAGCAACUAGGAUACUAUGACCC	870	
ADN	TTTTTAATTAAGCTCGCCATCAAATAGCTTT	>100	104
ADN	GGGCGGGGCGGACGAGACAGTAAGGGCTGTG GGTGTGGTG	0.7	105

ADN	GCAATGGTACGGTACTTCCTATGGCGATGTGTT GGCTGTGTGTGGGGTGCAAAAGTGCACGCTAC TTTGCTAA	360	106
-----	-----------------------------------------------------------------------------------	-----	-----

Estos aptámeros se han utilizado para el desarrollo de múltiples aptasensores con diferentes tipos de transducción: ópticos, de masa o electroquímicos. En una búsqueda realizada en octubre de 2020 en la base de datos *Scopus* de las palabras “PSA” y “aptámero” se obtuvieron 151 resultados para artículos científicos, y 56 si se añade el término “electroquímico”. La mayoría de estos sensores para la PSA se encuentran recogidos en varios artículos de revisión<sup>107,108,109,110,111</sup>. Sin embargo, para la búsqueda de aptasensores para la detección de la glicosilación de la PSA solamente se obtuvieron 2 resultados en la base de datos *Scopus* buscando los términos “PSA”, “aptámero” y “glicanos”. Ambos aptasensores tienen un formato tipo sándwich y utilizan el aptámero desarrollado por Savory *et al.* inmovilizado sobre el transductor. Jolly *et al.* inmovilizaron el aptámero sobre canales de microfluídica y utilizaron la lectina *Sambucus nigra*, específica del ácido siálico, para la cuantificación de la PSA glicosilada mediante medidas de quimioluminiscencia. Obtuvieron un límite de detección de 0.5 ng/mL para la fPSA y de 3 ng/mL para la fPSA glicosilada<sup>112</sup>. Xia *et al.* utilizaron electrodos de oro para inmovilizar el mismo aptámero y nanopartículas modificadas con el ácido 4-mercaptofenilborónico para la detección de los glicanos, con un límite de detección de 1.6 pg/mL<sup>113</sup>.

Además, después del inicio de la presente Tesis Doctoral se fundó la empresa *Glycanostics* que está trabajando en el desarrollo de un kit no invasivo para el diagnóstico del cáncer de próstata, basado en el análisis de los cambios en los glicanos de la PSA. Aunque de momento está en desarrollo y no está disponible comercialmente<sup>114</sup>.

## CAPÍTULO 2

*Objetivos / Objectives*



El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo y su detección temprana uno de los retos que plantea nuestra sociedad. La mayoría de los marcadores de cáncer, usados como dianas terapéuticas o en el diagnóstico clínico, son glicoproteínas. Además, los tumores producen glicoproteínas cuyo patrón de glicosilación se ve alterado con respecto al que producen las células normales. Por tanto, la explotación de estas diferencias en los patrones de glicosilación entre los tejidos malignos y sanos ofrece excelentes oportunidades para identificar biomarcadores sensibles y específicos del cáncer, que podrían actuar como primeros centinelas en la detección temprana de la enfermedad. La detección de estos cambios ofrece la posibilidad de aumentar la especificidad diagnóstica y realizar un pronóstico más preciso. Sin embargo, no se dispone en la actualidad de ensayos lo suficientemente selectivos que permitan validar clínicamente estos marcadores.

Una de las claves en el desarrollo de estos ensayos analíticos es la disponibilidad de receptores moleculares, capaces de reconocer de manera selectiva las alteraciones en los glicanos de una glicoproteína en concreto. El receptor ideal debería poseer un reconocimiento binario de la glicoproteína, estando involucrados tanto péptido como glicano, para garantizar la selectividad entre glicoproteínas que tienen una estructura de glicanos muy similar. Sin embargo, en el momento de inicio de la presente Tesis Doctoral no se dispone de ningún receptor, ni natural ni artificial, con la capacidad de este reconocimiento binario de las glicoproteínas.

Teóricamente, los aptámeros pueden reconocer selectivamente cualquier glicoproteína, y con un buen diseño del proceso de selección es posible dirigir la selección de los aptámeros de manera específica hacia el sitio de glicosilación, que incluye tanto el glicano como las estructuras peptídicas circundantes.

En este contexto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la selección de aptámeros para obtener receptores de alta afinidad y selectividad hacia la región de glicosilación de la glicoproteína PSA, biomarcador del cáncer de próstata. Se utilizarán estos aptámeros en el desarrollo de biosensores y ensayos analíticos para la detección de los cambios en la glicosilación de la PSA en suero humano.

Se pretende alcanzar el objetivo general propuesto a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Selección mediante el método SELEX de aptámeros dirigidos contra el sitio de glicosilación de la glicoproteína PSA. Se buscará obtener aptámeros con reconocimiento binario hacia la proteína, con capacidad de reconocer el glicano y la parte peptídica.
2. Caracterización de la afinidad y selectividad de los aptámeros obtenidos en el proceso de selección.
3. Estudio de los complejos aptámero-proteína, tanto desde el punto de vista empírico como mediante la construcción de modelos computacionales, con el fin de obtener información sobre los azúcares involucrados en el reconocimiento.
4. Diseño, construcción y evaluación de las características analíticas de sensores que utilicen los aptámeros seleccionados como receptores de afinidad. Desarrollo y validación de aplicaciones analíticas de los sensores que mejores características analíticas presenten. Aplicación a la cuantificación de la PSA glicosilada en muestras de suero humano de individuos sanos y en pacientes con cáncer de próstata.

Cancer is one of the main causes of death in the world and its early detection is one of the challenges we face as a society. Most of the cancer biomarkers used for clinical diagnosis or as therapeutic targets are glycoproteins. Moreover, tumours produce glycoproteins with altered glycosylation patterns compared to normal cells. Therefore, the study of the differences in the glycan pattern between normal and tumour tissues is a new strategy to identify sensitive and cancer-specific biomarkers. These biomarkers could act as first sentinels in the early detection of the disease. The detection of alterations in the glycosylation of certain proteins could improve the diagnosis specificity and the possibility of having a more reliable and precise diagnosis. However, there are not available test with enough selectivity to clinically validate these new biomarkers.

One of the key points in the development of such analytical assays is to have molecular receptors able to selectively recognize the alterations in the glycans of a specific glycoprotein. The ideal receptor would achieve the binary recognition of the glycoprotein, through both the peptide part and the glycan moiety. This requirement is necessary to assure adequate selectivity to distinguish between glycoproteins carrying very similar glycan patterns. Nevertheless, at the beginning of this Thesis none of the describe receptors possess binary recognition of glycoprotein, neither natural nor artificial receptors.

Theoretically, aptamers can selectively recognize any glycoprotein and with a well-designed selection process it could be possible to specifically direct the selection toward the glycosylation site, including in the recognition process both the glycan and the surrounding peptide structures.

In this context, the general objective of this PhD Thesis is the selection of aptamers to obtain receptors with high affinity and selectivity against the glycosylation site of the glycoprotein PSA, a biomarker of prostate



cancer. These aptamers will be used in the development of biosensors and analytical assays for the detection of the changes in the glycosylation pattern of PSA in human serum that may be associated to prostate cancer development.

We will achieve this general objective through the following specific objectives:

1. Selection of aptamers against the glycosylation site of the glycoprotein PSA using the SELEX technology. We seek to obtain aptamers able to achieve the binary recognition of the protein, recognizing both the glycan and the peptide moieties.
2. Characterization of the affinity and selectivity of the aptamers obtained in the SELEX processes.
3. Study of aptamer-protein complexes both through empirical characterization and computational modelling to get insight on the sugars involved in the recognition interaction.
4. Design, building, and evaluation of the analytical characteristics of biosensors that use the selected aptamers as affinity receptors. Development and validation of analytical applications of the sensors showing the best analytical performance. Application of the biosensors to the quantification of glycosylated PSA in human serum from healthy and prostate cancer patients.

## **CAPÍTULO 3**

*Selección de aptámeros frente a la estructura de glicano de la PSA*



### 3.1 Introducción

Se ha visto que durante el proceso de transformación tumoral se producen cambios en la estructura de los oligosacáridos unidos a algunas proteínas. Por esta razón, es posible explotar las variaciones en el patrón de glicosilación de las glicoproteínas asociadas al cáncer para mejorar los métodos de detección de esta enfermedad, ofreciendo la posibilidad de aumentar la especificidad y precisión diagnóstica. Una de las claves en el desarrollo de ensayos analíticos que permitan detectar estos cambios es la disponibilidad de receptores moleculares capaces de reconocer de manera selectiva los glicanos que se ven alterados. Por este motivo, hay una clara y urgente necesidad de desarrollar nuevos receptores sintéticos frente a la región glicosilada de glicoproteínas que se caractericen por una alta afinidad y puedan competir favorablemente, tanto en afinidad como en selectividad, con algunos de sus receptores naturales como son las lectinas. Los aptámeros se presentan como una excelente alternativa, pero es necesario un buen diseño de su proceso de selección para lograr el objetivo deseado.

En el presente capítulo se propone un método de selección de aptámeros hacia la parte de glicano de la PSA. Se seleccionó esta glicoproteína como diana modelo por ser un biomarcador ampliamente estudiado y para el que se han descrito los patrones de glicosilación de la proteína en su forma nativa y los cambios en los mismos asociados a la presencia del cáncer de próstata.

### 3.2 Protocolos

#### *3.2.1 Modificación de las partículas magnéticas.*

Las diferentes proteínas (PSA, PSA recombinante y BSA) se inmovilizaron sobre la superficie de partículas magnéticas Dynabeads® M-280 Tosilactivadas, que permiten la unión covalente de la proteína a la

superficie de las partículas a través de los grupos amino o sulfhidrilo (o grupo tiol), mediante el siguiente protocolo:

- 5 mg (165  $\mu$ L) de partículas magnéticas Dynabeads® M-280 Tosilactivadas se equilibraron en un tubo eppendorf con 1 mL del disolvente BM (19 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 81 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7.4) y tras retirar el sobrenadante se incubaron con 100  $\mu$ g de la proteína en cuestión en 100  $\mu$ L de BM2 (3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 7.4) en el thermomixer durante 12-18 horas a 37°C a una velocidad de agitación de 1300 r.p.m.
- Tras la separación magnética se descartó el sobrenadante, que se reservó para la posterior cuantificación de la proteína presente en el mismo mediante el ensayo de Bradford, y se acondicionaron las partículas en 1 mL de BLmod (PBS 1 $\times$  + 0.5 % BSA) incubándolas en el thermomixer durante 1 h a 37 °C y 1300 r.p.m.
- Finalmente, las partículas se lavaron tres veces con 1 mL de BLmod2 (PBS 1 $\times$  + 0.1% BSA) y se resuspendieron en 250  $\mu$ L de BLmod2 para su conservación a 4 °C.

#### 3.2.2 Ensayo de Bradford

Para estimar la cantidad de proteína inmovilizada sobre la superficie de las partículas se utilizó el ensayo Bradford. Este es uno de los ensayos colorimétricos más utilizados para la cuantificación de proteínas. Se basa en el cambio producido en la intensidad el máximo de absorción del colorante Coomassie® entre 470 nm y 595 nm tras la unión de la proteína al mismo, siendo la absorción proporcional a la cantidad de proteína presente y pudiendo ser esta calculada mediante una curva de calibrado. Este método permitió cuantificar la concentración de proteína presente en el sobrenadante después del proceso de conjugación a las micropartículas magnéticas, que corresponde a la que no se ha enlazado a su superficie.

El calibrado se preparó pipeteando 100 µL del disolvente BM/BM2 3:2 para el blanco, y 100 µL de las disoluciones estándar en varios tubos de ensayo. Para la muestra se pipetearon 100 µL del sobrenadante. A continuación, se añadieron 5 mL del reactivo de Bradford (diluido a una concentración 1×) a cada tubo y se incubaron a temperatura ambiente 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm. Como disoluciones estándar para la realización del calibrado se utilizaron disoluciones de BSA con concentraciones entre 0.1 y 1.0 µg/mL preparadas en BM/BM2 3:2. La concentración de proteína inmovilizada se obtuvo como la diferencia entre la concentración de proteína utilizada para la incubación con las partículas (0.4 µg/µL) y la concentración en el sobrenadante, obtenida a partir de la curva de calibrado.

### *3.2.3 Proceso de selección*

La colección de secuencias de ADN utilizada como punto de partida del proceso de selección de aptámeros está formada por una región central aleatoria de 40 nucleótidos (la región variable), flanqueada por dos regiones de 20 nucleótidos de secuencia conocida. Estas regiones constantes se diseñan para que sean complementarias a los cebadores de la PCR. La colección se obtuvo mediante síntesis química y se adquirió a Sigma con purificación PAGE (Tabla 3.1).

*Tabla 3.1 Secuencias de los ácidos nucleicos empleados en el proceso de selección.*

Nombre	Secuencia (5' →3')
Librería	AGGGTTGATAGGTTAAGAGC(N) <sub>40</sub> CGATGTCAACTAGCTGTTGG
Cebador Directo	Fluoresceína-AGGGTTGATAGGTTAAGAGC
Cebador inverso	Biotina-CCAACAGCTAGTTGACATCG

En la primera etapa del proceso SELEX, se calentó 1 nmol de esta colección, preparada en el medio de selección (BS: PBS 1×, pH 7.4), a 98

°C durante 4 min y seguidamente se enfrió en hielo otros 4 minutos. A continuación, se añadió una concentración BSA y tARN, para en un volumen final de 1 mL tener una concentración de 1.23 µg/mL de BSA y de 1.23 µg/mL de tARN, con el fin de minimizar las uniones inespecíficas y favorecer la competición usando un ácido nucleico no específico, respectivamente. La relación de las concentraciones de tARN y ADN se mantuvo para todas las rondas de selección en 0.1. Después se añadió el volumen necesario de partículas magnéticas modificadas con BSA (selección negativa) para mantener la relación de concentraciones ADN/proteína 10:1. El conjunto se dejó interaccionar durante 1 hora en el thermomixer a 25 °C y 1300 r.p.m. Tras la separación magnética, se recogió el sobrenadante para realizar la interacción con las partículas magnéticas modificadas con PSA. La selección negativa se realizó para eliminar aquellas secuencias que interaccionen inespecíficamente con la superficie de las partículas magnéticas o con la BSA que hay sobre las mismas. Sobre el sobrenadante se añadieron las partículas magnéticas modificadas con la PSA humana, manteniendo la relación ADN/proteína inicial prolongando el proceso de interacción durante 1 hora en el thermomixer a 25 °C y 1300 r.p.m. Tras la separación magnética, se descartó el sobrenadante (selección positiva) y se lavaron las partículas 2 veces con 500 µL de BSL (BS + 0.01 % tween-20). Finalmente, se eluyeron las secuencias de ADN enlazadas a la PSA incubando las partículas con 30 µL de agua a 95 °C durante 15 min y la posterior separación magnética. Se determinó la concentración de ADN en el sobrenadante mediante medidas de absorbancia a 260 nm.

Las secuencias eluidas se amplificaron mediante PCR. Se utilizaron tubos de PCR de 50 µL a los que se añadieron 2 µL del eluato, 1 µM de los cebadores inverso y directo, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de nucleótidos (dNTPs) y 1 unidad de la enzima inmolase hot-start ADN polimerasa. Se empleó el cebador directo marcado con una molécula de fluoresceína y el directo con biotina, para la realización de la posterior etapa de acondicionamiento de las hebras (tabla 3.1). El protocolo de

amplificación fue el siguiente: una primera etapa a 95 °C durante 10 minutos para activar la enzima, a continuación 15 ciclos de 94 °C durante 45 s, 57 °C durante 45 s y 72 °C durante 45 s; y una etapa final a 72 °C durante 10 minutos.

Para verificar que la amplificación tuvo lugar de la manera esperada se realizó una separación mediante electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación. En un gel de agarosa al 2 %, preparado en el tampón TBE (0.45 M Tris-Borato, 0.01 M EDTA, pH 8.3) y al que se le añadió el intercalante *simply safe*, sustancia que se intercala entre las bases del ADN de cadena doble y que es fluorescente, se cargó una muestra de 2  $\mu$ L del producto de PCR, mezclada con 6  $\mu$ L el tampón de carga, una muestra del blanco de la PCR mezclada también con el tampón de carga y una mezcla de marcador de tamaños de 20 pb. Tras la aplicación de un voltaje de 120 V durante 30 minutos, se iluminó el gel con una lámpara ultravioleta para observar las bandas correspondientes a los productos amplificados (Figura 3.11).

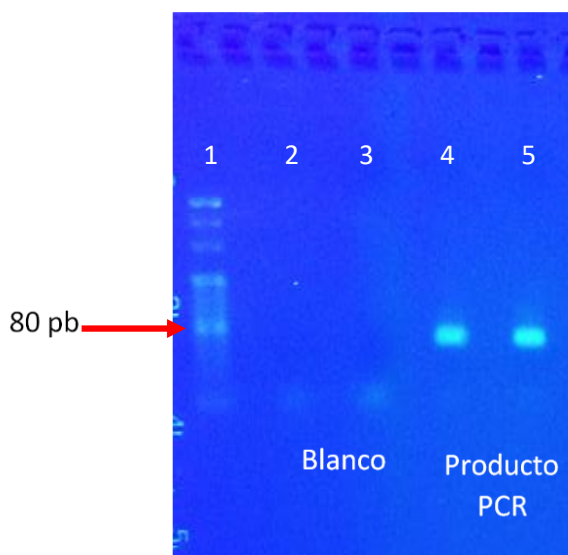


Figura 3.11: Gel de agarosa al 2 % en el que se muestran la escalera de tamaños (calle 1), el blanco de PCR sin ADN (2 y 3) y el producto de la amplificación de la PCR (calles 4 y 5).



Una vez comprobado que el producto de amplificación tiene el tamaño esperado (80 pares de bases) se cuantificó su concentración mediante fluorescencia utilizando el fluorímetro Qubit®. Para ello 2  $\mu\text{L}$  de producto de PCR se mezclan con 198  $\mu\text{L}$  del intercalante. La cuantificación del ADN se realizó con relación a un calibrado externo con patrones de calibración en el intervalo de concentraciones 0 ng/mL-5 ng/mL. Tras la medida de la fluorescencia el equipo proporcionó la concentración en unidades de  $\text{ng}_{\text{ADN}}/\mu\text{L}$ , que fue transformada a pmoles de ADN empleando la masa molecular del ADN de hebra doble de 80 pares de bases (49658 Da).

Para comenzar una nueva ronda de selección se requieren 250 pmoles de ADN de cadena sencilla, por lo que es necesario separar las hebras del ADN de cadena doble que se obtuvieron como resultado de la amplificación. Para ello se utilizaron partículas magnéticas modificadas con estreptavidina, que permiten atrapar la hebra doble a través del cebador inverso marcado con biotina. El protocolo que se realizó se detalla a continuación:

- El volumen de partículas Dynabeads® MyOne Streptavidin C1 necesario para separar 250 pmoles se lavó 3 veces con la disolución BLstrep (10 mM Tris-HCl, 2 M NaCl + 0.01 % tween-20).
- Tras la separación magnética, las micropartículas se resuspendieron en la misma disolución sin tween-20, en un volumen igual al de ADN que se quiere separar. Se añadió el ADN a separar y se incubó durante 15 minutos en el thermomixer a 25 °C a 1300 r.p.m. Pasado este tiempo se colocó el tubo en el imán, lavando las partículas tres veces con 500  $\mu\text{L}$  de BLstrep.
- A continuación, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de NaOH 100 mM y se incubó durante 10 minutos en el thermomixer a 25 °C y 1300 r.p.m. De esta forma se desnaturaliza la doble hélice del ADN y se separan las hebras, quedando unida a la superficie de las partículas

magnéticas la que tiene el cebador inverso marcado con biotina y su complementaria en disolución, que es la de interés para el SELEX.

- Tras la separación magnética se recoge el sobrenadante, en el que se encuentra la hebra que contiene el cebador directo. Por último, se añaden 6.04  $\mu\text{L}$  de HCl 1 M para neutralizar la disolución y se diluye con 126  $\mu\text{L}$  de BS para comenzar una nueva ronda de selección.

Cuando tras la etapa de amplificación PCR se obtuvieron menos de los 250 pmoles de ADN necesarios para iniciar un nuevo ciclo, se amplificó una nueva alícuota del eluato del ciclo anterior mediante PCR, comprobándose siempre el tamaño de los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa, seguido de la cuantificación espectrofotométrica.

Para dirigir la selección hacia la región glicosilada de la PSA se introdujeron dos contra-selecciones frente a la PSA recombinante en las rondas 3 y 6. Estas consistieron en la incubación de la colección de secuencias con partículas magnéticas modificadas con PSA recombinante y tras la incubación y separación magnética se recoge el sobrenadante para realizar la selección positiva frente a la PSA y el resto de etapas del proceso de selección.

A lo largo de los ciclos de selección se disminuyó el tiempo de incubación y se incrementaron los lavados con las condiciones descritas en la Tabla 3.2. Así mismo se ajustaron los volúmenes de las partículas magnéticas modificadas con las diferentes proteínas y las concentraciones del competidor tARN y BSA a utilizar para mantener la misma relación que en la primera ronda de selección, ya que a partir de la segunda se comienza la selección con 250 pmoles de ADN.

Tabla 3.2: Condiciones empleadas en las sucesivas rondas de selección.

Ronda	Contra-selección	Tiempo incubación (min)	Lavados
1		60	2
2		60	2
3	si	60	2
4		<b>30</b>	2
5		30	<b>5</b>
6	si	30	5

#### 3.2.4 Ensayos de unión con detección electroquímica.

La selección de aptámeros requiere una etapa de cribado, en la que se evalúan las características de afinidad de las diferentes secuencias candidatas frente a la PSA. Para ello se utilizaron electrodos serigrafados de oro (SPAuE) con PSA inmovilizada. En primer lugar, es necesaria una etapa de limpieza y acondicionamiento de los SPAuE, para ello se limpiaron con etanol y agua y se secaron con una corriente de nitrógeno. A continuación, se realizó un pulido electroquímico en 50  $\mu$ L de una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M, colocada sobre los tres electrodos, mediante la realización de 10 barridos cíclicos de potencial entre 0 V y 1.3 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Por último, se lavaron con agua, se secaron con nitrógeno y el electrodo de referencia y el contraelectrodo se cubrieron con una fina capa de esmalte transparente no surfactante.

El electrodo de trabajo de los SPAuE se modificó con una monocapa autoensablada (SAM) mixta del ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) y 6-mercapto-1-hexanol (MH) en relación 1:3 (0.25 mM MUA y 0.75 mM MH), ambos preparados en acetato sódico (NaAc) 10 mM pH 5.5. La mezcla se incubó sobre el electrodo de oro durante toda la noche a 4 °C en atmósfera con humedad controlada para evitar la evaporación de la

gota. A continuación, se procedió a la inmovilización covalente de la proteína en dos etapas: i) la activación de los grupos carboxilo por incubación en una disolución 1:1 de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) 100 mM y N-hidroxisuccinimida (NHS) 25 mM en agua durante 30 minutos, y ii) la unión de la proteína incubando el electrodo durante 30 minutos con una disolución de 50 µg/mL de la proteína en NaAc 10 mM pH 5.5. Por último, se bloquearon aquellos grupos activados que no hayan unido proteína con una disolución de 200 µg/mL de BSA en BS durante 15 minutos (Figura 3.12).

Los ensayos de unión se realizaron incubando el electrodo de trabajo con disoluciones de concentración creciente de los aptámeros marcados con fluoresceína, preparados en BS, durante 30 minutos. A continuación, se añadió el conjugado Fab-antifluoresceína-peroxidasa en una concentración 0.5 U/mL preparado en disolución BS-0.5% caseína, dejando que la interacción con la superficie tenga lugar durante 30 minutos. Finalmente se realizó la medida electroquímica mediante la adicción de 35 µL de TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tras 30 s de reacción enzimática, el producto de oxidación del TMB se midió mediante cronoamperometría a -0.2 V durante 60 s. Para la realización de esta medida se utilizó un electrodo externo de referencia de Ag|AgCl|KNO<sub>3</sub> y un contra electrodo de platino. Se registró como señal analítica la intensidad promedio de los últimos 10 segundos de la medida (Figura 3.12).

Todas las interacciones se realizaron en un volumen de 10 µL a temperatura ambiente (RT), y tras cada etapa los electrodos se lavaron con la disolución de la etapa siguiente y se secaron con corriente de nitrógeno.

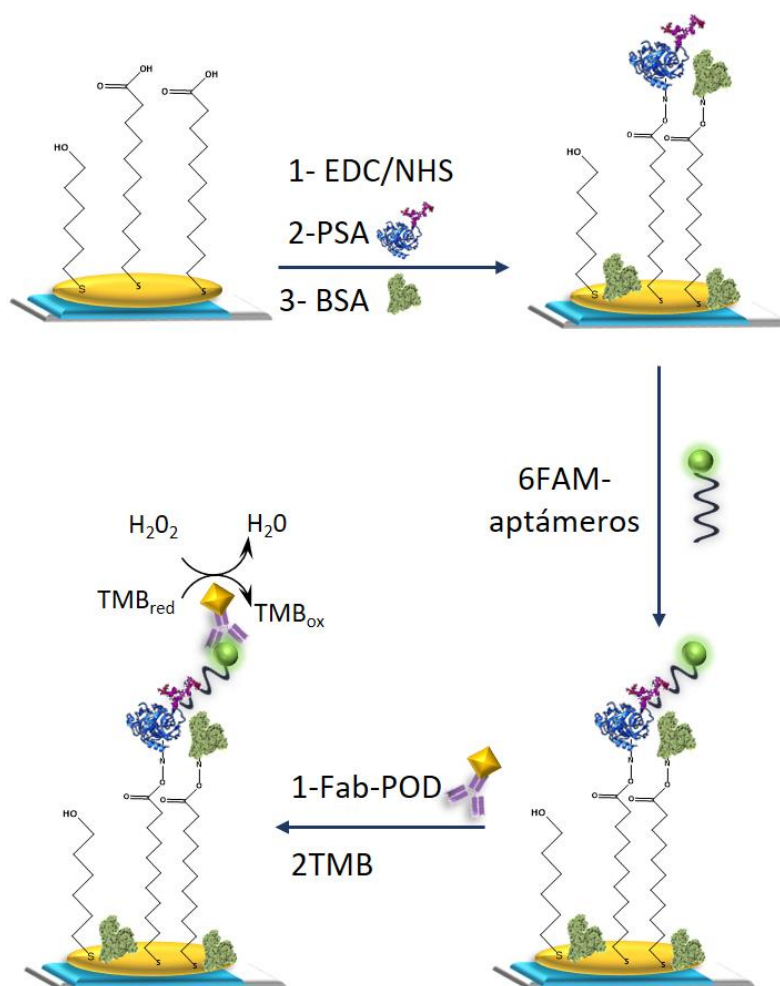


Figura 3.12: Esquema de las etapas del ensayo de unión con detección electroquímica de los aptámeros a las proteínas inmovilizadas sobre electrodos de oro.

### 3.2.5 Ensayos de unión mediante SPR.

Previo a la modificación del disco de oro del equipo de espectroscopia de plasmón de superficie (SPR), este se limpió sucesivamente con disolución piraña (70:30 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 10 minutos y etanol y se secó con una corriente de nitrógeno. A continuación, se modificó con una SAM mixta de una mezcla 1:3 de MUA y MH en etanol como se indicó en las medidas electroquímicas durante toda la noche a 4 °C en atmósfera húmeda. Pasado este tiempo se lavó el disco con etanol y agua y se secó

con nitrógeno para colocarlo sobre el prisma limpio, deslizándolo sobre una fina capa de aceite con índice de refracción conocido ( $1.518 \pm 0.002$ ).

El prisma junto con el disco se colocó en el equipo Autobal ESPRIT y a partir de este momento todas las etapas de inyección y registro de señal se realizaron de forma automática con el automuestreador y secuenciador del equipo controlado por el software Data Acquisition 4.4 y a temperatura controlada de  $25 \pm 1$  °C. Todas las etapas se realizaron con un volumen de muestra de 35  $\mu$ L y bajo agitación a 33.3  $\mu$ L/s.

Los grupos carboxílicos de la SAM se activaron con tres inyecciones de 10 minutos cada una de una mezcla 1:1 de EDC 100 mM y NHS 25 mM en agua (etapa 1) y después se lavó con la disolución del circuito (NaAc 10 mM pH 5.5<sup>115</sup>- etapa 2). A continuación, se inyectó una disolución de 50  $\mu$ g/mL de la proteína a inmovilizar en la misma disolución durante 20 minutos (etapa 3) y por último, tras lavar con la disolución (etapa 4), se bloquearon los grupos carboxílicos activados sin reaccionar con una disolución de etanolamina 1 M en BS durante 15 minutos (etapa 5)( Figura 13)

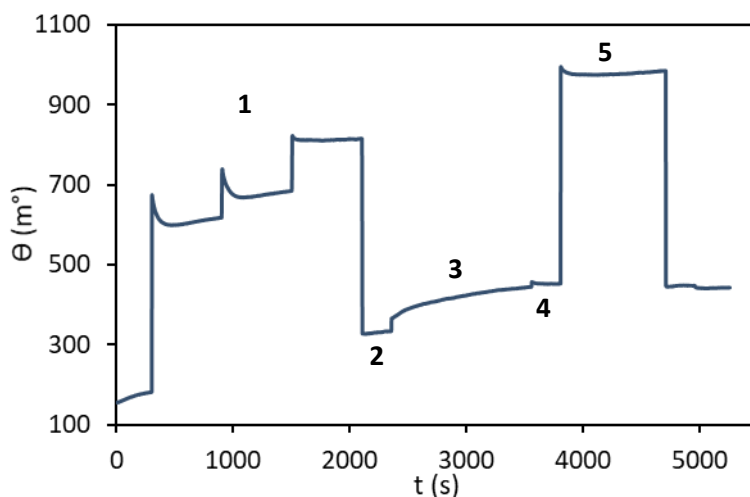


Figura 13: Sensograma del enlace covalente de la PSA al cristal modificado del SPR. 1) Activación con EDC/NHS. 2) Línea base con NaAc. 3) Unión de la PSA. 4) Línea base con NaAc. 5) Bloqueo con etanolamina. 6) Línea base con NaAc.

La etapa de interacción entre el aptámero y la proteína se realizó inyectando disoluciones con concentraciones crecientes del ssADN y se registró la curva de enlace. Cada interacción consiste en la adquisición por triplicado de la línea base de la disolución de PBS durante 5 minutos, la inyección de una concentración de aptámero determinada en uno de los canales y de disolución sin aptámero en el canal de referencia, durante 10 minutos, y por último tras un breve lavado se registra la etapa de disociación en la misma disolución sin aptámero durante 10 min hasta obtener una señal estable. La diferencia en el ángulo de resonancia (en  $m^\circ$ ) de la línea de disociación y de la línea base se relaciona con la cantidad de aptámero unido a la proteína, previa substracción de la señal inespecífica medida en el canal de. Este ciclo se repite con cada nueva a concentración de ssADN sin regeneración de la superficie.

## 3.3 Resultados y discusión

### 3.3.1 Proceso de selección.

En algunos casos el proceso SELEX tradicional no logra obtener aptámeros con las características de afinidad y selectividad deseadas. Se han comenzado a utilizar diferentes variantes del SELEX para mejorar la eficacia del proceso de selección y la funcionalidad analítica. Una de estas metodologías es el *Counter-SELEX*<sup>116</sup>, utilizada para desarrollar aptámeros con gran afinidad hacia una parte específica de la molécula diana. Este procedimiento consiste en hacer interaccionar la colección de ADN con un compuesto estructuralmente relacionado, por ejemplo una isoforma de la proteína, utilizando las secuencias no unidas para la ronda posterior de selección. Estas contra-selecciones se alternan con las etapas básicas del proceso de selección comentadas en el capítulo de introducción.

La selección de nuevos aptámeros de ADN que se unan a la región glicosilada del antígeno específico de la próstata se considera difícil puesto que esta zona es poco aptagénica y además corresponde a una pequeña fracción de la proteína. Por ello se propone el método *Counter-SELEX* como estrategia a llevar a cabo. Esta se basa en la introducción de contra-selecciones bien diseñadas frente a la PSA expresada recombinantemente en *Escherichia coli* (rPSA), proteína con la misma secuencia peptídica que la PSA humana (hPSA) pero sin los glicanos, ya que estas bacterias no tienen la capacidad de sintetizarlos.

Para la realización de las rondas de selección es necesario tener la molécula diana anclada sobre una superficie. En nuestro caso se utilizaron partículas magnéticas por su fácil manejo, ya que facilita las etapas de lavado y separación.

Durante todo el proceso de selección, antes de cada etapa de interacción con la hPSA se introdujeron etapas de selección negativa frente a partículas magnéticas modificadas con BSA para eliminar todas aquellas secuencias que muestren cierta afinidad bien por la superficie de las partículas magnéticas o a la BSA, uniéndose a ellas inespecíficamente. Las contra-selecciones se realizaron una vez que la librería inicial comenzó a enriquecerse en secuencias afines hacia la hPSA, lo que se produjo a partir del segundo ciclo de selección; específicamente se realizan dos etapas de contra-selección en las rondas 3 y 6. Estas consistieron en la incubación de la colección de secuencias de ADN resultantes del ciclo anterior con partículas magnéticas modificadas con rPSA. Después de la incubación y separación magnética se recogió el sobrenadante para realizar la selección positiva frente a la hPSA. De esta forma, en el sobrenadante se encontrarán aquellas secuencias que no son capaces de unirse a la rPSA y puesto que la única diferencia entre ambas proteínas son los glicanos, estas secuencias serán aquellas que van dirigidas a los glicanos de la PSA. A continuación, se desarrollaron el resto de etapas del proceso SELEX (elución, amplificación y separación).



En la Figura 3.14 se muestra un esquema del proceso de selección llevado a cabo.

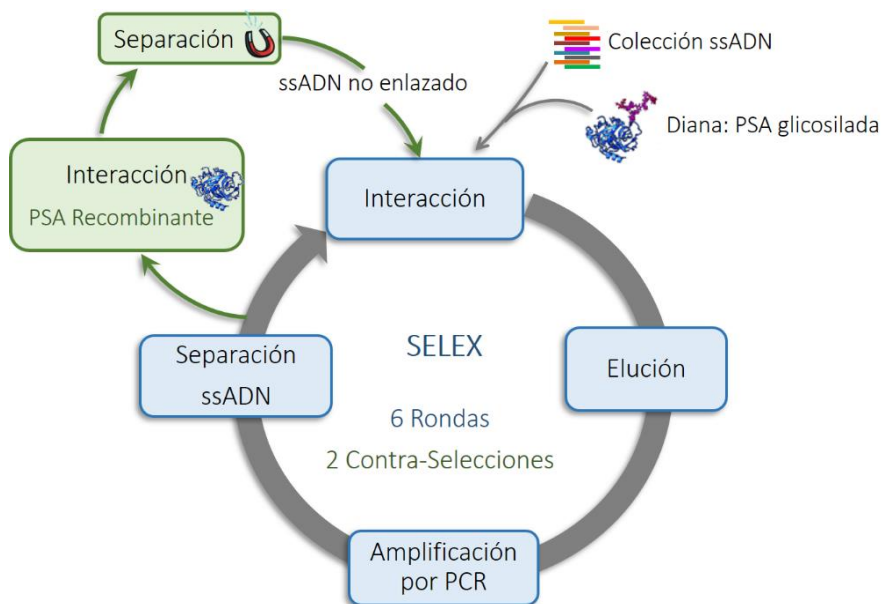


Figura 3.14: Esquema del proceso de selección

Para el seguimiento del proceso de selección se evaluó el enriquecimiento de la librería inicial de hebras de ADN de una sola cadena (ssADN) en secuencias con afinidad hacia la hPSA a lo largo de los sucesivos ciclos de selección. Para ello se emplearon tres metodologías: ensayos de enlace con partículas magnéticas modificadas con PSA, espectroscopia de resonancia de plasmón de superficie (SPR) y estudios de diversidad de la colección de secuencias de ADN por medidas VIS-UV tras un proceso de rediseñación (*remelting*). Los resultados obtenidos con cada una de ellas se describen a continuación.

- Ensayo de enriquecimiento con partículas magnéticas

En esta metodología se parte de las colecciones de ADN de hebra doble obtenidas tras la realización de la PCR de cada ronda. Para realizar el ensayo de enriquecimiento es necesario disponer de hebras simples, por lo que se separaron 25 pmoles de la colección de cada ronda al igual

que se hizo en las etapas de acondicionamiento. Al utilizar un cebador directo marcado con fluoresceína en su extremo 5', estas hebras simples también incorporan esta marca, que se utilizó para seguir el enriquecimiento mediante medidas de fluorescencia. La cantidad de ADN separado se midió mediante absorbancia a 260 nm.

Los 25 pmoles de ssADN de cada ronda se calentaron a 98 °C durante 4 minutos y se enfriaron en hielo durante otros 4 minutos. A continuación, se añadieron 25 pmoles de PSA inmovilizada sobre partículas magnéticas incubándolos junto con las secuencias de ADN en un volumen final de 250 µL durante 10 minutos en el thermomixer a 25 °C y 1300 r.p.m. Tras la interacción y la separación magnética se recogió el sobrenadante donde se encuentra la fracción de secuencias no enlazadas y se realizaron dos lavados con 200 µL de BSL. Después se eluyeron las secuencias enlazadas a las partículas con 30 µL de agua a 95 °C durante 15 minutos. Tras la separación magnética se recogió la fracción enlazada diluyéndola con 120 µL de PBS 1.25x. Se realizó un experimento similar con partículas magnéticas modificadas con rPSA.

Se midió la cantidad de ADN de cada una de las fracciones mediante fluorescencia utilizando un lector de placas, a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una de emisión de 528 nm, características de la fluoresceína. La intensidad de fluorescencia se transformó en pmoles de ssADN mediante un calibrado externo, en el que se usaron disoluciones de concentraciones conocidas de un ADN de cadena sencilla de 80 nucleótidos marcado con fluoresceína.

En la Figura 3.15 se muestra el porcentaje de ADN obtenido en la fracción enlazada a lo largo de las rondas del proceso de selección. Se observó un enriquecimiento progresivo de la colección de ADN en secuencias con afinidad hacia la PSA humana. Tras seis rondas de selección un 60 % de secuencias se unieron a la glicoproteína inmovilizada, indicando un alto porcentaje de secuencias específicas hacia la PSA en la última ronda. El comportamiento es muy diferente

cuando se evalúa la afinidad de las sucesivas colecciones hacia la PSA recombinante. En la Figura 3.15 puede observarse como hay un dramático decrecimiento en la afinidad de las secuencias tras las rondas 3 y 6, mostrando la efectividad de las etapas de contra-selección realizadas en esos ciclos.

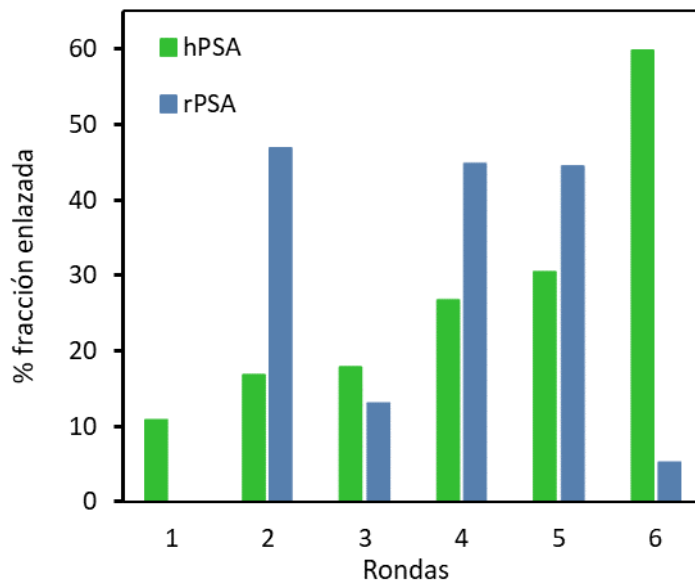


Figura 3.15: Evolución del porcentaje de secuencias de las colecciones obtenidas tras cada ronda que son capaces de unirse a la PSA glicosilada (verde) y a la recombinante (azul).

- Ensayo con espectroscopia de resonancia de plasmón de superficie

En esta segunda metodología se evalúa la afinidad de enlace promedio de las secuencias de oligonucleótidos de cada ronda a la PSA. Para ello se inmovilizó covalentemente la PSA sobre un disco de oro que se colocó sobre un prisma ópticamente transparente, sobre el que se hace incidir la radiación procedente de un láser, variando el ángulo de incidencia en un intervalo en el que se produce reflexión total. A un cierto ángulo de incidencia se produce un acoplamiento de los fotones incidentes con los plasmones del metal (condición de resonancia), detectándose un mínimo en la radiación reflejada. El ángulo de incidencia al que se produce ese mínimo ( $\theta$ ) cambia al modificarse la

interfase metal-disolución ya que cambia el índice de refracción en la porción de disolución adyacente al metal. Por tanto, la medida de este ángulo tras la interacción de la superficie de oro modificado con hPSA con las secuencias de las distintas rondas permite obtener información en tiempo real sobre la unión de estas a la proteína. Los resultados obtenidos mediante esta metodología se resumen en la Figura 3.16A, donde puede observarse que no hay enlace apreciable a la hPSA utilizando la colección inicial (R0), mientras que se produce un aumento de la afinidad de enlace a medida que progresa la selección. Con las secuencias de la colección resultante de la quinta ronda se puede observar unión a partir de una concentración total de 100 nM, mientras que con las secuencias de la ronda seis se produce interacción de afinidad a concentraciones mucho menores, con señales de SPR mayores que para las obtenidas en la ronda 5 incluso a la concentración más baja ensayada (10 nM).

Con el fin de estudiar en qué medida está involucrado el sitio de glicosilación en el enlace se repitió el experimento anterior con la colección de secuencias de la ronda seis, pero inmovilizando la PSA recombinante sobre el disco de oro del SPR. Al comparar los resultados obtenidos con los registrados para la interacción con la proteína nativa, se observó un desplazamiento de la curva de enlace a rPSA hacia mayores concentraciones de ADN, lo que indica que los oligonucleótidos de esta ronda reconocen la forma no glicosilada de la proteína recombinante pero con una afinidad significativamente menor que hacia la PSA glicosilada (Figura 3.16B). Estos resultados sugieren que un alto porcentaje de secuencias en la última ronda de selección se enlazan preferencialmente a la PSA a través del reconocimiento del glicano, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos con partículas magnéticas y medidas de fluorescencia.

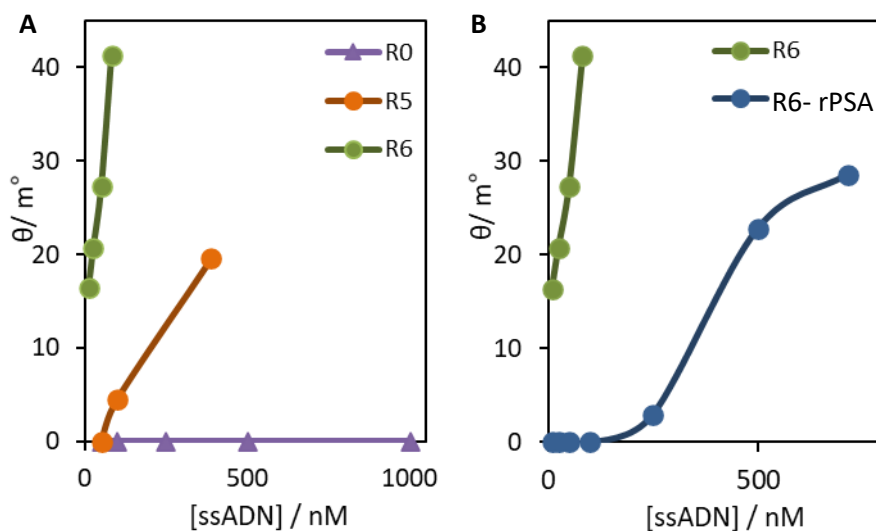


Figura 3.16: A) Medidas de SPR obtenidas para la interacción de diluciones de las secuencias de las colecciones de la ronda 0 (morado), 5 (naranja) y 6 (verde) con la PSA glicosilada. B) Comparación de las señales de SPR obtenidas en la interacción de las secuencias de la ronda 6 con la PSA humana (verde) y con la PSA recombinante (azul).

- Estudios de *remelting*

Este tipo de ensayos permite evaluar el cambio en la diversidad o variabilidad de las secuencias en la colección que se produce a través del proceso de selección. Para ello, las secuencias de hebra simple después de cada ronda deben transformarse en hebra doble mediante PCR. El proceso de hibridación-desnaturalización térmica de estas secuencias proporciona información sobre su diversidad. Cuanto mayor sea la diversidad de secuencias, mayor será la probabilidad de que se produzcan dúplex imperfectos, con lo que la temperatura de fusión (*melting*) de la mezcla disminuirá. Si se monitoriza la velocidad del proceso de disociación (*remelting*) después de una etapa de hibridación (*annealing*), el análisis de las curvas obtenidas ofrece información sobre la temperatura de disociación, y por tanto de la diversidad de la colección de secuencias analizadas. Un incremento en la diversidad se traduce en un decrecimiento de la temperatura de *melting*<sup>117</sup>.

Las colecciones obtenidas después de cada ciclo de selección se amplificaron utilizando los cebadores de la PCR sin ninguna marca y en las mismas condiciones empleadas en el SELEX. A 25  $\mu\text{L}$  de cada producto de PCR se le añade los compuestos fluorescentes EvaGreen® (intercalante) y ROX (referencia, para la normalización de las curvas) en una concentración final 1 $\times$ . Estas disoluciones se calentaron siguiendo el siguiente programa: 95  $^{\circ}\text{C}$  durante 15 segundos, 50  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos, y finalmente un incremento progresivo de temperatura durante 20 minutos para alcanzar los 95  $^{\circ}\text{C}$  (*remelting*), que se mantuvo durante 30 segundos. Las curvas de *remelting* se obtuvieron en un sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific).

En la Figura 3.17 se muestran los resultados obtenidos para la colección inicial (R0) y tras la última ronda de selección (R6). Se observó un aumento en la temperatura de *remelting* del ADN de 81.7  $^{\circ}\text{C}$  para la colección inicial a 82.7  $^{\circ}\text{C}$  para la colección obtenida después de la ronda 6, lo que indica una disminución en la diversidad de la colección de ADN. Esto es indicativo de que a lo largo del proceso de selección se enriquece la colección de partida en determinadas secuencias, disminuyendo así su diversidad.

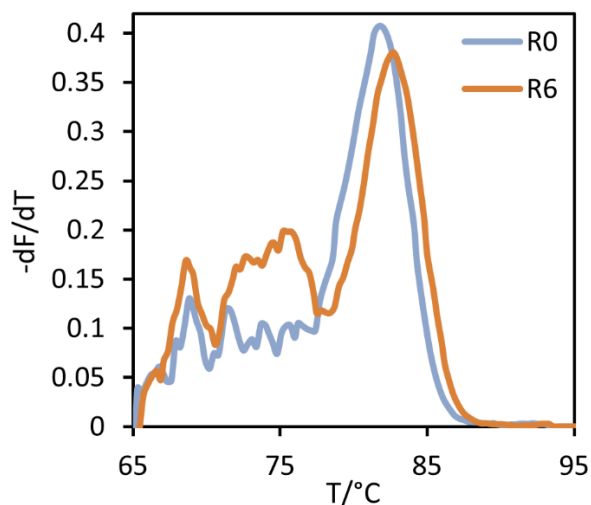


Figura 3.17: Curvas de remelting para el ADN de la ronda 0 (azul) y la ronda 6 (naranja).

### 3.3.2 Secuenciación masiva e identificación de los aptámeros.

Con el fin de estudiar la evolución de las secuencias a través de las rondas de selección y conocer aquellas que sobrevivieron hasta la última se realizó la secuenciación masiva de las rondas 0, 2, 4 y 6. La aplicación de esta tecnología permite realizar cientos de millones de lecturas, obteniendo información sobre las secuencias de ADN en múltiples rondas de selección. Las secuencias de las rondas 0, 2, 4 y 6 se amplificaron mediante PCR, utilizando los cebadores sin marcas y bajo las mismas condiciones de amplificación empleadas en el proceso de selección. La secuenciación masiva se llevó a cabo utilizando el secuenciador IonTorrent™ Personal Genome Machine® (PGM) (Thermo Fisher Scientific).

La secuenciación IonTorrent se basa en que la adición de un nucleótido a un polímero de ADN libera un ion hidrógeno. Mediante la medida del cambio en el pH resultante de la liberación de estos iones utilizando semiconductores, se pueden detectar simultáneamente millones de estos cambios en los distintos canales del chip que se emplea para ello, lo que permite determinar la secuencia de cada fragmento de ADN (Figura 3.18).

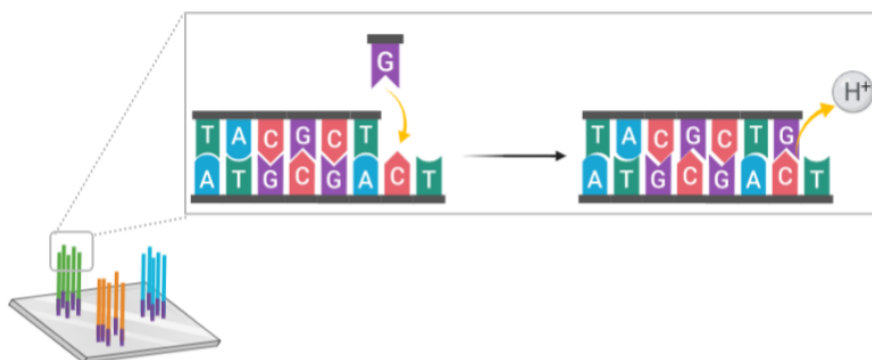


Figura 3.18: Esquema del principio de funcionamiento de la secuenciación IonTorrent basada en la medida de cambios de pH tras la liberación de un ion hidrógeno tras la unión de un nucleótido.

Los datos en bruto obtenidos de la secuenciación, aproximadamente 400000 lecturas en cada ronda, se trataron usando el servidor web Galaxy ([www.usegalaxy.org](http://www.usegalaxy.org))<sup>118,119</sup>. En primer lugar, se filtraron las secuencias en función de la calidad de las lecturas, a continuación se eliminaron las marcas que se introducen para la secuenciación, después se descartaron aquellas que no tenían la región de los cebadores intacta y las que no tenían el tamaño deseado ( $80 \pm 5$  bases). Finalmente se quitaron los cebadores de la PCR para extraer la información solamente de la región central de las secuencias, de 40 bases, que se agruparon según el número de repeticiones de cada una encontradas en cada ronda. De este primer análisis se obtuvieron una media de 300000 secuencias diferentes en cada ronda.

Las secuencias obtenidas para cada ronda se analizaron mediante la herramienta bioinformática aptaSUIE<sup>120</sup> para estudiar la distribución y abundancia de los cuatro nucleótidos en la región central. De este análisis se puede observar que la librería inicial de secuencias tiene la siguiente distribución de nucleótidos: 27.41 % de adeninas (A), 27.65 % de timinas (T), 23.76 % de citosinas (C) y 21.19 % de guaninas (G) para todas las secuencias analizadas (326411 lecturas), ligeramente diferente a la esperada para una colección aleatoria e idéntica distribución de los cuatro nucleótidos (Figura 3.19).



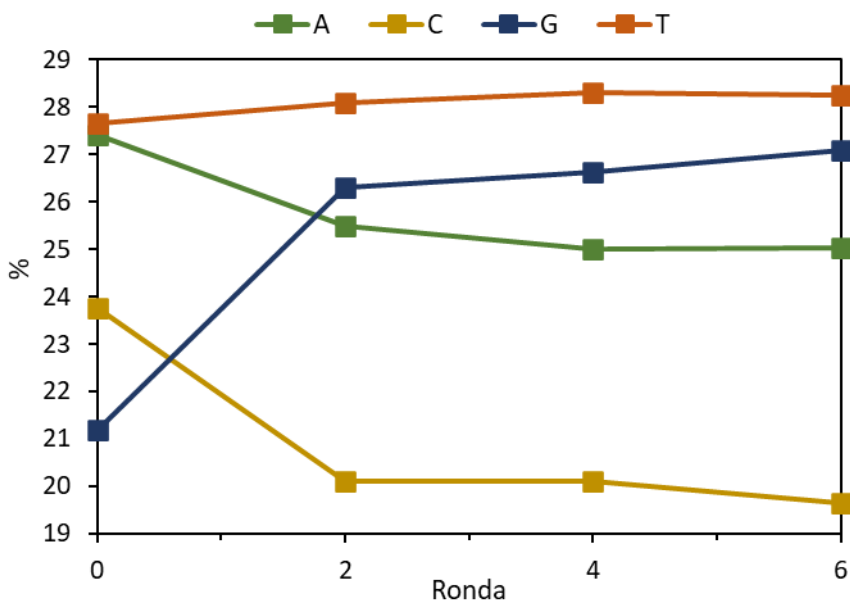


Figura 3.19: Distribución de los cuatro nucleótidos para todas las secuencias analizadas de las rondas 0, 2, 4 y 6.

Para la ronda 6 se observó un enriquecimiento hacia los nucleótidos guanina y timina, menos representados en la colección inicial, encontrándose un 27.08 % G y un 28.26 % T para todas las secuencias analizadas (304722 lecturas). El estudio de la distribución de los nucleótidos en cada posición de la región central muestra un incremento de T en el extremo 3' mientras que el G predomina en el extremo 3' (Figura 3.20).

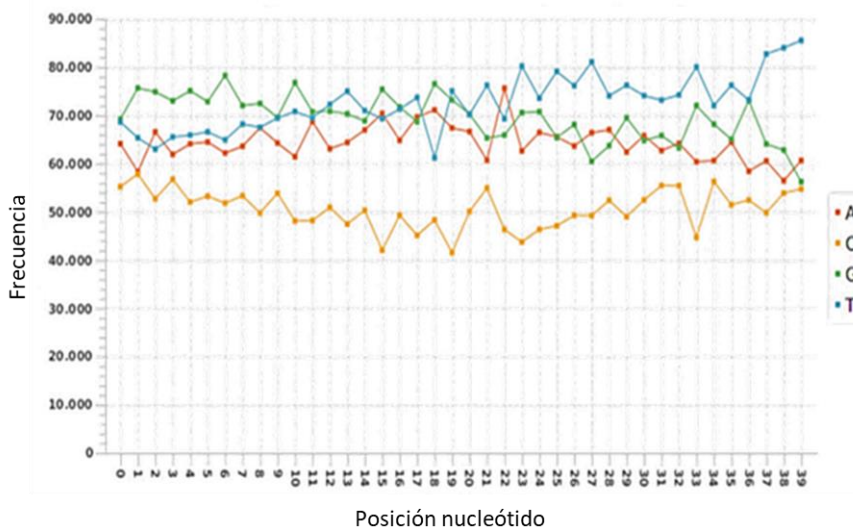


Figura 3.20: Distribución de los cuatro nucleótidos en la ronda 6 en cada posición de la región variable central obtenido con aptaSUIE.

La complejidad en secuencias, estimada como la cantidad relativa de secuencias únicas en referencia al total de lecturas de cada ronda ( $\% \text{ complejidad} = \text{únicas}/\text{totales}$ ), decreció desde 0.19 % en la ronda 2 a 0.09 % en la ronda 6, lo que apunta a una menor diversidad de secuencias tras la última ronda de selección, en concordancia con los resultados obtenidos en el ensayo de *remelting*.

A continuación, con el fin de evaluar cómo evolucionaron las secuencias a lo largo de las rondas de selección, se compilaron mediante la aplicación web Galaxy las secuencias obtenidas en las rondas 0, 2, 4 y 6 para crear una base de datos no redundante. Esta base de datos permite conocer aquellas secuencias que se mantuvieron a lo largo del proceso de selección llegando hasta el último ciclo. Estas secuencias se clasificaron en familias con la herramienta Clustal Omega (<http://www.clustal.org/omega>) obteniéndose el árbol de familias que se muestra en la Figura 3.21.

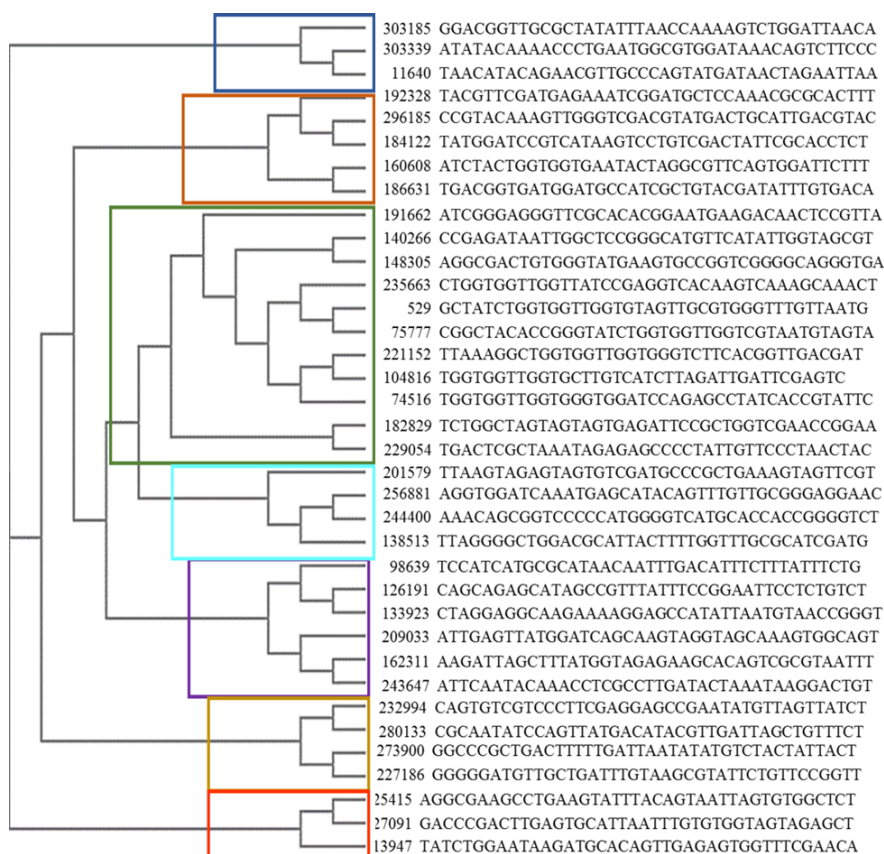
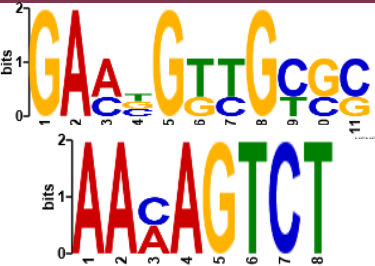
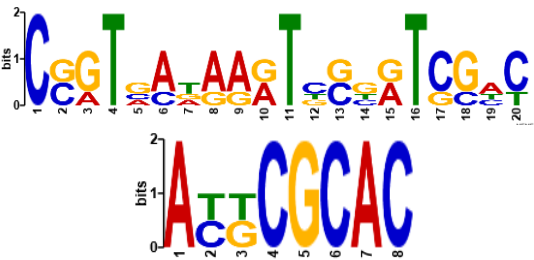







Figura 3.21: Árbol filogenético de las secuencias que se encuentran a o largo de las diferentes rondas de selección, obtenido mediante un alineamiento múltiple y compilado utilizando Clustal Omega.

A continuación, se estudió en más detalle cada una de las familias obtenidas mediante el servidor web Galaxy para identificar los motivos de bases que más se repiten en las secuencias de cada familia. Se buscó cada uno de los motivos obtenidos en la colección de secuencias de la última ronda para conocer cuántas de las secuencias lo poseen. En la Tabla 3.3 se muestran los motivos obtenidos y el número de secuencias de la ronda 6 que los poseen.

Tabla 3.3: Motivos representativos encontrados en cada familia de secuencias identificada y número de repeticiones encontradas en las secuencias de la ronda 6, obtenidos con Galaxy web.

Familia	Motivos	Repeticiones
1		3289
2		3323
3		2752
4		51175
5		915
6		1639
7		903

Dado que se ha asociado un aumento de diez veces en la afinidad de aptámeros con 5 posiciones conservadas de nucleótidos<sup>121</sup> se seleccionaron cuatro de las siete familias con motivos que contienen al menos 5 nucleótidos inequívocos (secuencias de baja variabilidad o alto consenso) para su evaluación en términos de afinidad y selectividad hacia la PSA. Específicamente, se seleccionaron las secuencias representativas de las familias I, II, III y IV, siendo estos motivos muy recurrentes en la colección de secuencias de la ronda 6, por el número de repeticiones encontradas de cada uno. Se predijo la estructura secundaria de los potenciales aptámeros de cada familia utilizando Mfold<sup>122</sup>, empleando como condiciones de predicción una temperatura de 25 °C y una concentración de sales de 0.154 M de NaCl. Se seleccionaron como candidatas aquellas secuencias que presentaron el menor valor de energía libre, lo que se traduce en una estructura secundaria más estable. Este criterio de selección se sustenta en la observación de que existe una correlación positiva entre la complejidad de las estructuras secundarias de los aptámeros y la afinidad de los mismos hacia su diana<sup>121</sup>. Además, también se seleccionó la secuencia más repetida en la última ronda de selección, perteneciente a la familia I. Las cinco secuencias seleccionadas como posibles aptámeros y su estructura secundaria se recogen en la Tabla 3.4 y Figura 3.22.

Tabla 3.4: Secuencias de los aptámeros seleccionados tras el proceso de selección.

Nombre	Secuencia 5'→3'
PSA-1	GGACGGTTGCGCTATATTTAACCAAAAGTCTGGATTAACA
PSA-2	TGACGGTGATGGATGCCATCGCTGTACGATATTTGTGACA
PSA-3	GCTATCTGGTGGTTGGTGTAGTTGCGTGGGTTTGTTAATG
PSA-4	AAACAGCGGTCCCCCATGGGGTCATGCACCACGGGGTCT
PSA-5	GGTCAAGTCTCGTTAAGTCGACTGTATTCTTCAGGCGCCT

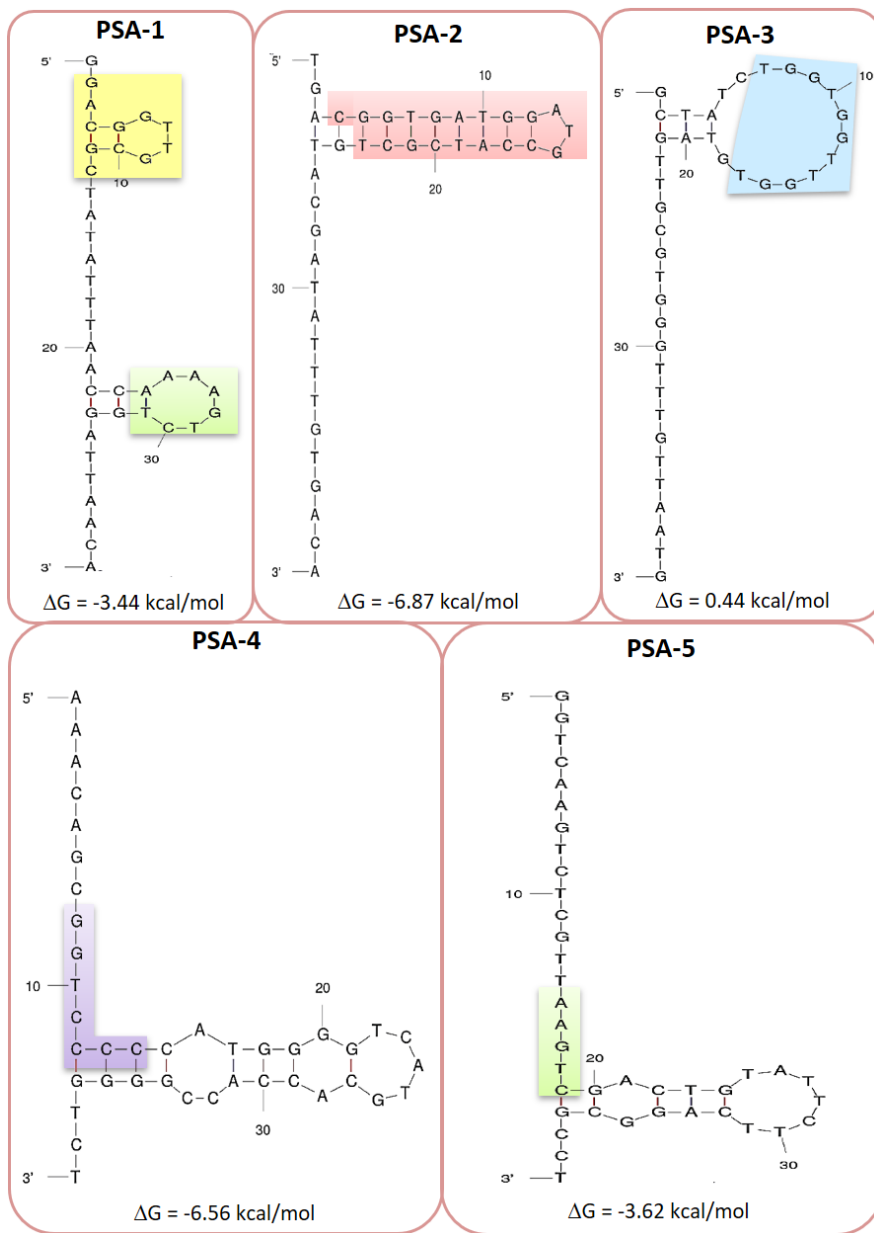


Figura 3.22: Estructura secundaria de las cinco secuencias seleccionadas obtenidas mediante Mfold, en las que se resalta la posición de los motivos repetidos.

### 3.3.3 Caracterización de la afinidad de los aptámeros seleccionados

Los cinco aptámeros candidatos fueron sintetizados incluyendo un espaciador de cinco timinas y una marca de fluoresceína en el extremo 5' de la región central (40 nucleótidos). Estos fueron sintetizados por la casa comercial Metabion (Alemania) con purificación por HPLC y servidos en formato liofilizado.

Para escoger el aptámero con las mejores características de reconocimiento hacia la PSA glicosilada se evaluó la capacidad de los cinco aptámeros seleccionados de unirse a la PSA humana y a la recombinante (no glicosilada), empleando un ensayo de unión electroquímico con detección cronoamperométrica. Estas proteínas se inmovilizaron sobre electrodos serigrafiados de oro y se incubaron con una disolución 500 nM de cada aptámero marcado con fluoresceína. Para medir la cantidad de aptámero enlazado, después de la etapa de interacción de afinidad aptámero-PSA se incorporó un conjugado anti-fluoresceína-peroxidasa. De esta forma, mediante adición de tetrametibencidina y peróxido de hidrógeno (sustratos de la peroxidasa) es posible obtener mediante cronoamperometría a - 0.2 V una señal que depende de la cantidad de aptámero enlazado en la primera etapa.

En la Figura 3.23 se muestra que todos los aptámeros seleccionados reconocen a la hPSA pero con diferente afinidad, como puede deducirse de la diferente intensidad de corriente obtenida para cada uno de ellos. El aptámero PSA-5, el más abundante en la secuenciación, muestra la mayor señal analítica frente a la PSA humana pero también es capaz de reconocer a la PSA recombinante con un 60 % de la señal para la hPSA. El aptámero PSA-1 es el que muestra la mayor capacidad de discriminación entre la forma glicosilada y no glicosilada de la PSA, siendo el que tiene una menor señal para la rPSA. El aptámero PSA-2 también se enlaza preferencialmente a la hPSA pero su señal es un 33 % menor que la del PSA-1. Por el contrario, el aptámero PSA-3 se une con mayor afinidad a la

PSA recombinante que a la humana. El aptámero PSA-4 muestra una afinidad similar por ambas proteínas.

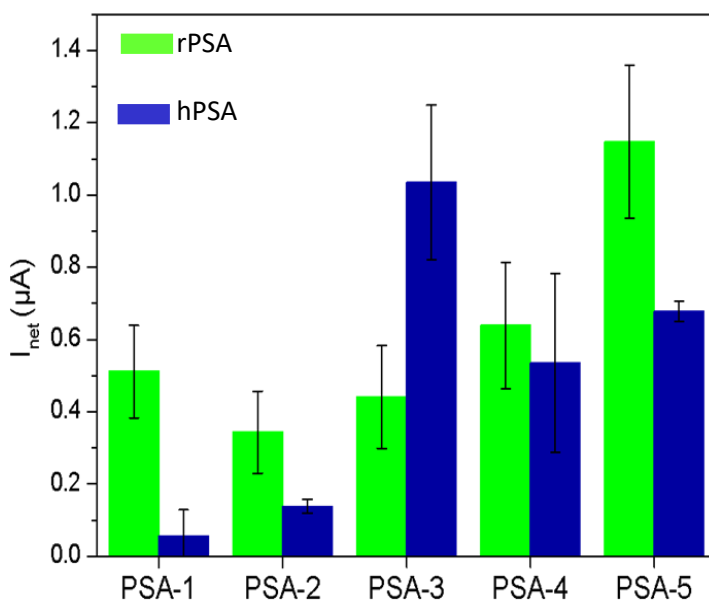
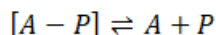


Figura 3.23: Intensidades de corriente netas obtenidas tras la interacción de 500 nM de cada aptámero con la PSA humana (verde) y la PSA recombinante (azul).

A la vista de los resultados obtenidos se selecciona el aptámero PSA-1 como el aptámero con mejor capacidad de reconocer a los glicanos de la PSA, y el aptámero PSA-5 como el de mayor afinidad hacia la PSA. Ambos aptámeros se estudiaron en más detalle evaluando su afinidad hacia la PSA mediante la construcción de una curva de enlace con concentraciones crecientes de aptámero empleando dos técnicas, medidas electroquímicas y la espectroscopia de plasmón de superficie.

El reconocimiento molecular entre el aptámero y la PSA es un proceso reversible, en el que pueden tener lugar múltiples interacciones no covalentes como interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. La afinidad de los aptámeros (A) frente a la PSA (P) se puede describir mediante la constante de disociación ( $K_D$ ), si se tiene en cuenta que se produce el siguiente equilibrio cuando tiene lugar la interacción:





La constante de disociación de este equilibrio se puede escribir como:

$$K_D = \frac{[A]_{eq} [P]_{eq}}{[A - P]_{eq}}$$

La constante de disociación, con unidades de concentración (M) es tanto menor cuanto mayor sea la afinidad de la interacción en estudio.

Una de las estrategias para medir la constante de disociación es utilizar un método de equilibrio. Este método consiste en incubar una cantidad constante de uno de los componentes que interaccionan con cantidades crecientes del otro, dejando que el sistema alcance el equilibrio. A continuación se mide, directa o indirectamente, la cantidad de complejo de afinidad formado, relacionándola con la cantidad de uno de los componentes que queda libre en el equilibrio. De esta forma se obtiene una curva de enlace, que puede ajustarse mediante métodos de ajuste no lineal, a diferentes modelos. Uno de estos modelos es el de Langmuir, que asume una estequiometría 1:1 en la que hay un sitio de unión por proteína y todos los sitios son equivalentes. Alternativamente, se utiliza el modelo basado en la ecuación de Hill, que supone que la interacción no es uno a uno si no que tiene lugar un efecto de cooperatividad en la unión entre el aptámero y la proteína; la proteína tiene varios sitios de unión al aptámero, y la unión de una molécula de aptámero influye (positiva o negativamente) sobre la unión de las siguientes.

En primer lugar, se determinó la constante de afinidad del aptámero PSA-1 mediante ensayos de unión con detección electroquímica, inmovilizando la PSA sobre electrodos de oro e incubándola con concentraciones crecientes del aptámero. A medida que se aumentó la cantidad de aptámero se observó un incremento en la señal medida. Cuando esta señal se representó frente a la concentración de aptámero libre se obtuvo una curva de enlace (Figura 3.24). Se asume que la

cantidad de aptámero enlazada es despreciable frente a la concentración de aptámero en disolución. El ajuste de esta curva al modelo de Langmuir ( $y = y_{\max} \cdot x / P + x$ ) permitió estimar una constante de disociación de  $357 \pm 42$  nM, con un valor de  $y_{\max}$  de  $1306 \pm 43$  nA y una correlación de 0.995. Este valor es menor que el obtenido para la colección de secuencias de la ronda seis del SELEX ( $K_D = 480 \pm 44$  nM), lo que sugiere que el PSA-1 es uno de los aptámeros con más afinidad de los presentes en la ronda 6.

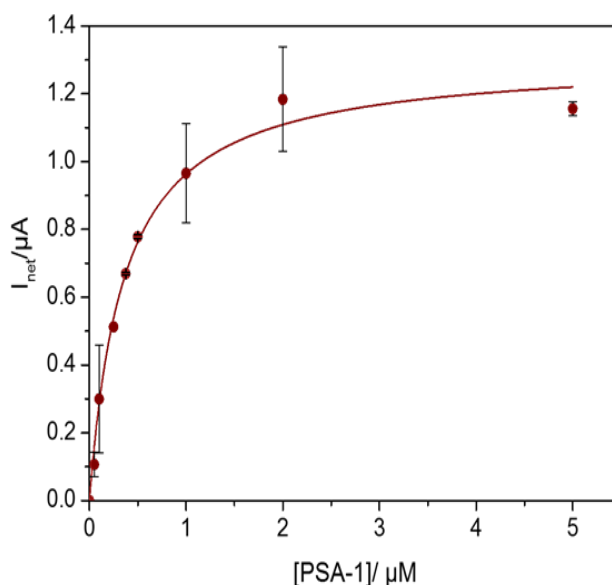


Figura 3.24: Curva de enlace del aptámero PSA-1, ajustada al modelo de Langmuir.

A continuación, se determinó la constante de afinidad mediante SPR. Para ello se modificó el disco de oro de SPR con la PSA humana y se incubó con concentraciones crecientes de aptámero. Cada etapa de interacción consiste en la realización de una línea base (1), la unión del aptámero a la proteína (2) y la disociación (3). La diferencia entre el ángulo de resonancia de la etapa 3 y la 1 se relaciona con la cantidad de aptámero unido a la proteína. Para la siguiente concentración de aptámero se repite este ciclo sin regenerar la superficie (Figura 3.25).

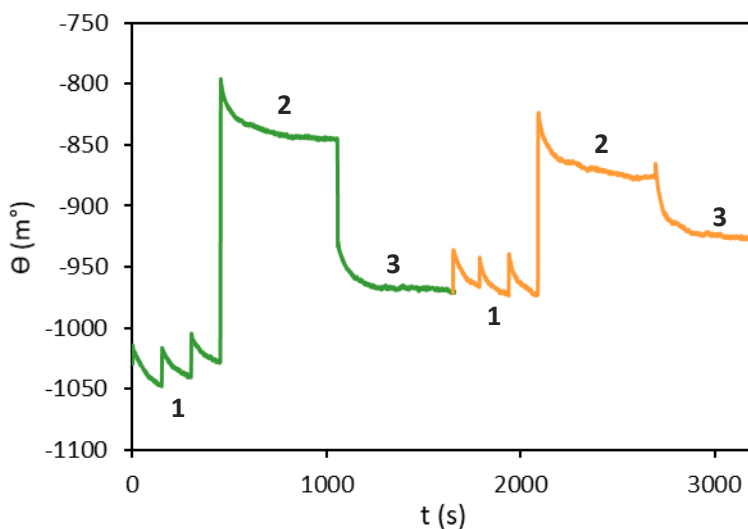


Figura 3.25: Sensograma obtenido para la interacción del aptámero PSA-1 (50 nM en verde y 100 nM en naranja) y con el disco de SPR modificado con hPSA.

Al representar el porcentaje de cambio del ángulo de incidencia con respecto a valor máximo obtenido para cada concentración se obtuvo la curva de enlace que se muestra en la Figura 3.26. El ajuste de los resultados al modelo de Langmuir permitió estimar una constante de disociación de  $177 \pm 65$  nM (Figura 3.26).

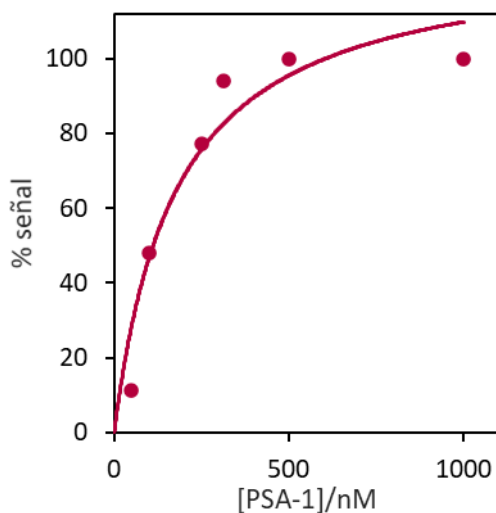


Figura 3.26: Curva de enlace del aptámero PSA-1 obtenida mediante medidas de SPR.

Para el aptámero PSA-5 las curvas de enlace obtenidas para la hPSA, inmovilizada sobre electrodos de oro o el disco del SPR, se ajustaron al modelo no lineal de Hill estimándose unas constantes de disociación de  $144 \pm 65$  nM y de  $209 \pm 16$  nM obtenidas mediante medidas electroquímicas o de SPR, respectivamente (Figura 3.27). Esto refleja la cooperatividad en el enlace del PSA-5 ( $n = 2.3 \pm 0.8$ ) estando en concordancia con la mayor señal obtenida con este aptámero, aunque este muestra una menor capacidad de discriminación entre la PSA glicosilada y la no glicosilada que el aptámero PSA-1.

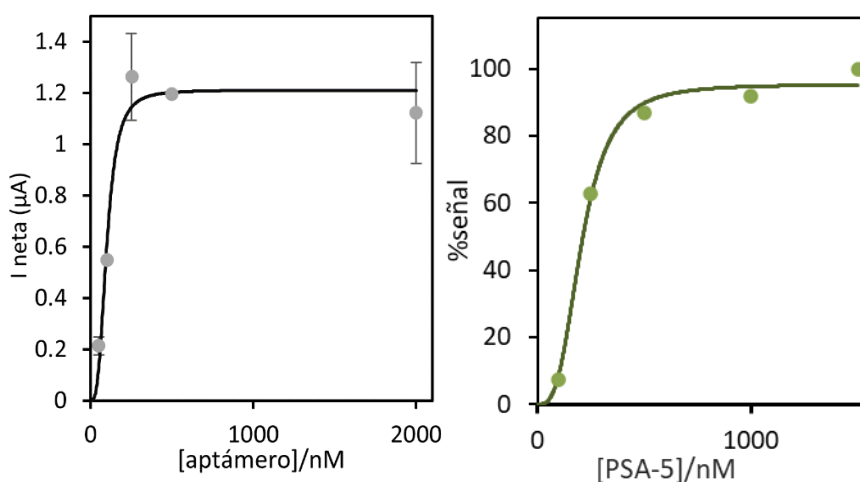


Figura 3.27: Curvas de enlace del aptámero PSA-5 ajustadas al modelo de Hill obtenidas mediante medidas electroquímicas (izquierda) y de SPR (derecha).

La discrepancia en los valores de  $K_D$  obtenidos con ambos métodos podría deberse al efecto de la marca de fluoresceína en el ensayo de unión con detección electroquímica. En principio, no era de esperar que la marca afectase a la afinidad ya que el proceso de selección se realizó con secuencias marcadas para minimizar este efecto. Sin embargo, la marca con un conjugado enzimático voluminoso podría hacer que solo una fracción de los aptámeros unidos a la PSA fueran accesibles, limitando la sensibilidad.

También se estudió la capacidad de enlace del aptámero PSA-1 a la PSA recombinante mediante SPR, inmovilizando esta proteína sobre el

disco de oro e incubándola con concentraciones crecientes del aptámero. Para todas las concentraciones de aptámero ensayadas no se registró una señal de SPR significativa, ni siquiera para la concentración más alta (1  $\mu\text{M}$ ), lo que concuerda con el reconocimiento de los glicanos de la PSA por el aptámero PSA-1 tal y como se había observado en los ensayos electroquímicos.

Las constantes de afinidad estimadas para el PSA-1 son al menos un orden de magnitud mejores que las descritas para las lectinas, receptores que también reconocen a los glicanos. Por ejemplo, la afinidad hacia la fucosa del núcleo de una lectina específica está en el intervalo 3.2 a 22  $\mu\text{M}$ , obtenido mediante cromatografía frontal de afinidad, una técnica diseñada específicamente para el análisis de interacciones débiles<sup>123</sup>. Recientemente se han descrito para algunas lectinas valores de afinidad en el intervalo nM cuando estas interaccionan con los glicanos de la PSA, mediante SPR<sup>124</sup>, pero estos valores no son comparables directamente con el obtenido para nuestro aptámero. Esto se debe a que, al contrario que los aptámeros, las lectinas son oligómeros que pueden enlazarse entre sí, lo que hace que las lectinas tengan dos o más sitios de unión (multivalencia). Además, la flexibilidad de la estructura de los azúcares limita la afinidad de receptores como las lectinas<sup>125</sup>, y que en el caso del aptámero PSA-1 no parece suponer una limitación, por su alta afinidad, en el orden de las afinidades obtenidas para la unión a las proteínas.

A continuación, se evaluó la selectividad del aptámero PSA-1 frente a otra glicoproteína, la lipocalina-2 o NGAL (Lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos), que es un biomarcador en estudio del cáncer de páncreas que posee un único sitio de glicosilación y es de un tamaño similar a la PSA. Para ello se inmovilizó la NGAL sobre electrodos de oro, haciéndola interaccionar con una disolución 500 nM de PSA-1 marcado con fluoresceína. La señal se obtiene mediante cronoamperometría a -0.2 V, al igual que en el ensayo descrito anteriormente. Como se observa en la Figura 3.28, este aptámero también es capaz de unirse a la NGAL

con una intensidad de corriente idéntica a la de la PSA dentro del error experimental. Esto indica que el aptámero PSA-1 reconoce a los glicanos, ya que es capaz de enlazarse a dos glicoproteínas que tienen distinta secuencia y lo único que tienen en común son los glicanos.

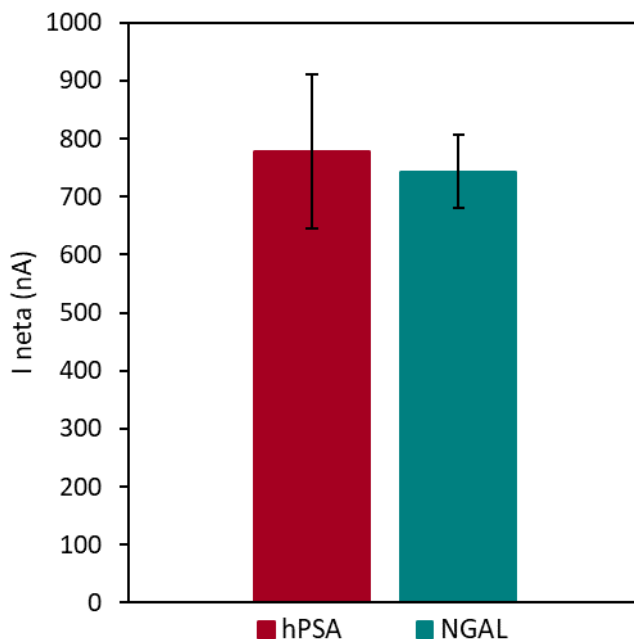


Figura 3.28: Selectividad del aptámero PSA-1 frente a la hPSA (granate) y a la NGAL (azul).

En resumen, se ha demostrado la posibilidad de dirigir la selección de aptámeros hacia la estructura de glicanos de una glicoproteína a través de contra-selecciones frente a la forma no glicosilada recombinante de la proteína diana. Mediante este procedimiento y secuenciación masiva, tras solamente seis rondas de selección con dos etapas de contra-selección se ha identificado un aptámero que reconoce los glicanos de la PSA, con capacidad de discriminar entre la PSA humana y la recombinante. Además, este aptámero es capaz de reconocer los glicanos de cualquier glicoproteína, pudiendo ser un elemento de reconocimiento general para las cadenas de carbohidratos de las proteínas humanas, puesto que todas ellas poseen una secuencia de

azúcares similar. El método de selección descrito es una estrategia general para la selección de aptámeros dirigidos hacia a las estructuras de glicanos de las glicoproteínas.

## **CAPÍTULO 4**

*Selección de aptámeros con  
reconocimiento binario de la  
glicoproteína PSA*





## 4.1 Introducción

Como se ha indicado en el capítulo 1, el número de aptámeros descritos capaces de reconocer los glicanos de glicoproteínas es muy reducido. La mayoría de ellos solamente reconocen algunos grupos funcionales presentes en los glicanos<sup>97</sup> o un epítipo particular del carbohidrato sin importar la proteína a la que están unidos. Hasta el momento, solo se conoce un aptámero capaz de reconocer simultáneamente la parte de glicano y aminoácidos del entorno de glicosilación en un glicopéptido pequeño, pero no fue ensayado en la proteína completa<sup>100</sup>. También es posible modificar los aptámeros o anticuerpos artificialmente para que reconozcan a la parte peptídica y a la glicosilada de una glicoproteína al mismo tiempo, mediante la unión de dos aptámeros o anticuerpos (uno para cada parte de la glicoproteína) y el empleo de azúcares modificados con el grupo azida<sup>126,127</sup>. Además no hay ningún receptor sintético único (que no esté modificado o sea la unión de varios) capaz de integrar el reconocimiento binario de glicano y péptido en una glicoproteína intacta, y solamente se ha descubierto recientemente que una lectina de mamífero, Dectin-1, es capaz de reconocer ciertos azúcares de la estructura glicosídica, así como aminoácidos del sitio de glicosilación en un anticuerpo IgG<sup>101</sup>.

En el capítulo 3 se describió el diseño un proceso de selección que permitió identificar un aptámero capaz de unirse a los glicanos de distintas glicoproteínas humanas. Este receptor sintético no permite discriminar entre glicoproteínas con estructuras de glicanos similares y podría considerarse comparable a las lectinas, aunque su afinidad es netamente superior.

Dado el buen resultado de este primer proceso de selección y el número limitado de receptores, tanto naturales como artificiales, disponibles para el reconocimiento binario de glicoproteínas, se decidió llevar a cabo el diseño de un nuevo proceso SELEX, que pudiera servir

como protocolo general de selección de aptámeros capaces de reconocer un epítipo que englobe tanto la región de los glicanos como la parte peptídica de la proteína. Estos receptores, con capacidad de discriminar entre distintas glicoproteínas con estructuras de glicanos similares, podrían tener importantes aplicaciones tanto en el desarrollo de herramientas de diagnóstico como incluso en terapia.

## 4.2 Protocolos

### 4.2.1 Proceso de selección

Para la realización del proceso de selección se empleó la misma colección inicial de ácidos nucleicos e idéntico procedimiento de modificación de partículas magnéticas tosilactivadas con proteína utilizados en el Capítulo 3 (véase sección 3.2.1).

En las tres primeras etapas de selección se realizaron las rondas del SELEX de forma idéntica a las descritas en el capítulo 3 sección 3.2.3, exceptuando el tiempo de elución que se aumentó a 30 minutos y las unidades de enzima inmolase hot-start ADN polimerasa utilizadas en la PCR, que en este caso fueron 2.8 U.

Para dirigir la selección hacia la fucosa del núcleo de la PSA se ensayaron dos estrategias diferentes a partir de la tercera ronda de selección. En la opción A se añadió una contra-selección extra, utilizando partículas magnéticas modificadas con la hPSA bloqueada con la lectina PhoSL. Tras la incubación (1 h a 25 °C y 1300 r.p.m) se recogieron las secuencias del sobrenadante y se hicieron interaccionar con la PSA humana. De esta forma se eliminan aquellas secuencias que reconocen a la proteína por zonas diferentes a donde se une la lectina, la fucosa del núcleo, región muy próxima a la proteína. Las etapas de elución, amplificación y separación se llevaron a cabo de la forma descrita anteriormente. La opción B consistió en la elución de las secuencias

enlazadas, tras la selección negativa (partículas modificadas con BSA), contra-selección (partículas modificadas con rPSA) y selección positiva (partículas modificadas con hPSA), empleando la lectina PhoSL en BS durante 1 h a 25 °C. Se espera que esta lectina compita con el ssADN por unirse a la fucosa del núcleo, desplazando preferentemente a las secuencias de ADN que involucran esta molécula en la interacción. A continuación, las secuencias de ssADN eluidas se amplificaron por PCR y se separaron para comenzar una nueva ronda de selección.

Para hacer las condiciones de selección más restrictivas se disminuyó el tiempo de incubación y se aumentó el número de lavados como se indica en la Tabla 4.1.

*Tabla 4.1: Condiciones empleadas a lo largo de las diferentes rondas de selección*

Ronda	Tiempo incubación	Tiempo incubación hPSA+PhoSL	[PhoSL] usada para eluir	Número de lavados
1	60	-	-	2
2	60	-	-	2
3	<b>30</b>	-	-	2
4A	30	30	-	2
4B	30	-	<b>1 µg/mL</b>	2
5A	30	30	-	<b>5</b>
5B	30	-	1 µg/mL	5
6B	<b>15</b>	-	1 µg/mL	5

7B	15	-	<b>2 µg/mL</b>	5
8B	15	-	2 µg/mL	<b>10</b>
9B	<b>10</b>	-	2 µg/mL	10
10B	10	-	2 µg/mL	<b>15</b>

#### 4.2.2 Clonación

Las secuencias de la última ronda de selección se amplificaron mediante PCR empleando los cebadores directo e inverso sin marcas y con las condiciones utilizadas en el SELEX. A continuación, el producto de PCR fue purificado con el Kit MinElute PCR Purification, para eliminar los cebadores no alargados y los reactivos de la PCR. Después de la purificación se realizó un gel de agarosa al 2 % para comprobar la pureza y el tamaño del producto amplificado. Este producto fue clonado utilizando el TA Cloning® Kit Dual Promoter y transformado en células competentes con One shot® Competent cells mediante las siguientes etapas:

*Ligación:* en esta etapa tiene lugar la unión del vector de clonación al producto de PCR. Para ello, se incubaron 1.03 ng del producto de PCR (en 1 µL) con 50 ng del vector (2 µL) proporcionado en el kit, 2 µL del tampón que también se proporciona y 4 µL de agua a temperatura ambiente durante 1 hora y 15 minutos. Tras el tiempo de reacción el producto de ligación, el denominado inserto, se conserva en hielo.

*Transformación en células competentes:* El inserto debe introducirse en una célula anfitriona. Para ello, se añadieron 2 µL del producto de ligación a un vial de células competentes y se incubaron en hielo durante 30 minutos. A continuación, se calentó el vial a 42 °C durante 30

segundos y rápidamente se colocó en hielo. Después se añadieron 250  $\mu$ L del medio S.O.C. (medio de caldo superóptimo con represión por catabolito), incubándose a 37 °C durante 1 hora a 1300 r.p.m. En estas condiciones las células sólo incorporarán como máximo un inserto cada una.

*Sembrado de las células competentes:* La clonación exige la propagación de las células con el inserto en un cultivo. Sobre placas Petri con agar y LBS (medio selectivo de *Lactobacillus*) como medio de cultivo se añadieron 100  $\mu$ L de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) y 100  $\mu$ L de X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido), repartiéndolos por toda la placa con movimientos circulares. A continuación, se añadieron 30  $\mu$ L del contenido del vial de las células competentes preparado en la anterior etapa, repartiéndolo también por toda la placa con movimientos circulares. Esta se incubó boca abajo en estufa a 37 °C durante toda la noche.

*Detección y selección de las colonias que expresan el inserto:* Las placas se analizaron en busca de colonias blancas, indicativo de que han incorporado el inserto. Se recogieron estas colonias pasando por encima de ellas una punta de micropipeta pequeña hasta que se observó que la colonia está en la punta. Después, esta se colocó en un pocillo de placa de PCR con 190  $\mu$ L de agua, y con unos pequeños golpes se forzó a que la colonia pasase al agua.

*Lisis celular y obtención del inserto:* Se calienta el contenido de cada pocillo a 95 °C durante 20 minutos para extraer el ADN de las células. A continuación, se amplifican las secuencias eluidas mediante PCR empleando los cebadores y siguiendo las condiciones y las etapas de amplificación especificadas en el kit.

*Secuenciación:* Por último, se cuantificó con un fluorímetro Qubit® la cantidad de ADN amplificado y se realizó una nueva PCR para introducir

los cebadores de la secuenciación. Se secuenció el inserto con un analizador genético Biosystem-Hitachi 3130xl.

### 4.2.3 Ensayos de unión con detección electroquímica

Para los ensayos de unión con detección electroquímica se empleó el mismo protocolo descrito en el capítulo 3 a excepción de la etapa de bloqueo tras la unión covalente de la proteína a la SAM mixta. En los ensayos del presente capítulo esta etapa se realizó con una disolución 1 mM de etanolamina en BS durante 15 minutos.

## 4.3 Resultados y discusión.

### 4.3.1 Proceso de selección

A partir de los resultados obtenidos en el proceso SELEX ya descrito en el capítulo 3, empleando selecciones positivas frente a la PSA glicosilada (hPSA) y contra-selecciones frente a la PSA recombinante (rPSA), se buscó refinar el proceso para conseguir receptores que integren en el reconocimiento tanto la parte de los azúcares como la región peptídica cercana de la PSA. Con este objetivo, se diseñaron dos estrategias posibles utilizando la lectina *Pholiota squarrosa* (PhoSL)<sup>123</sup>, una lectina específica de la  $\alpha$ 1-6-fucosa del núcleo, azúcar unido al residuo de azúcar más interno y por tanto más cercano a la región peptídica. De esta forma se pretende dirigir la selección hacia esa zona de la glicoproteína, aumentando la posibilidad de obtener aptámeros específicos para el sitio de glicosilación de la PSA (Figura 4.1).

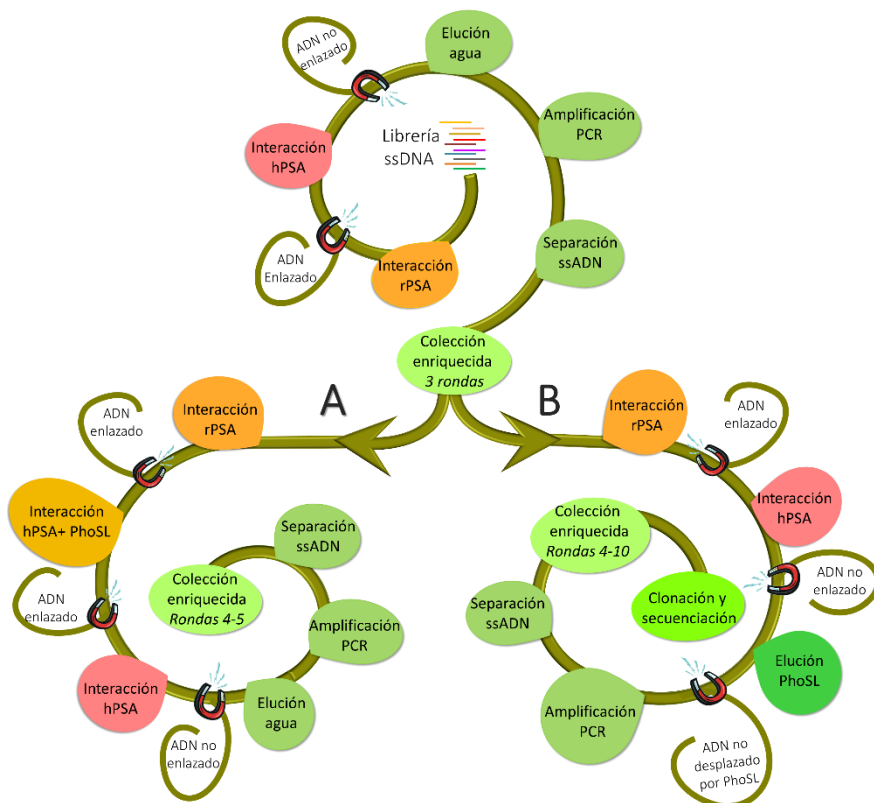


Figura 4.1: Esquema del proceso SELEX. La espiral de arriba muestra las etapas de las rondas 1-3, empleando la PSA glicosilada humana como diana. Tras la ronda 3, el SELEX se separa en dos rutas, la espiral de la izquierda muestra la estrategia A, que incluye una contra-selección extra frente a hPSA bloqueada con la lectina PhoSL (rondas 4 y 5), y la espiral de la derecha muestra la estrategia B, basada en la elución competitiva de las secuencias enlazadas con la lectina PhoSL (rondas 4-10).

El procedimiento SELEX implica la inmovilización de la hPSA y rPSA sobre partículas magnéticas, empleando BSA como bloqueante. Cada ronda de selección incluye una etapa de selección negativa frente a las partículas magnéticas modificadas con BSA, para eliminar aquellas secuencias que se unen a la BSA, seguida de una contra-selección frente a la rPSA, para eliminar las secuencias que se unen a la proteína por regiones diferentes a la zona de glicosilación, y una etapa de selección positiva frente a la hPSA, para enriquecer la colección inicial en secuencias que se unan a la zona de glicosilación de la proteína. Tras tres



rondas comunes de selección, la colección de secuencias se dividió para realizar dos estrategias diferentes de selección.

La estrategia A incluye una contra-selección extra más exigente frente a partículas magnéticas modificadas con hPSA, que previamente fueron incubadas con la lectina PhoSL para bloquear la  $\alpha$ 1-6 fucosa del núcleo. De esta forma se eliminan de la colección de secuencias aquellas que sean capaces de unirse a la proteína bloqueada y, por lo tanto, aquellas que reconozcan a la proteína PSA por una región diferente a la que reconoce la lectina.

La estrategia B se basa en la elución por competición de las secuencias enlazadas a la hPSA empleando la lectina PhoSL que desplazará a aquellas secuencias con las que comparte sitio de unión. Para comprobar que la presencia de la lectina en el medio de amplificación no influye en la realización de la PCR se llevó a cabo la amplificación de 2.5 nM de la librería inicial en presencia de 2  $\mu$ M de la lectina utilizando las condiciones de amplificación empleadas en el SELEX. Como se puede observar en el gel de agarosa al 2 % (Figura 4.2) el ADN amplificado muestra una sola banda del tamaño esperado (80 nt).

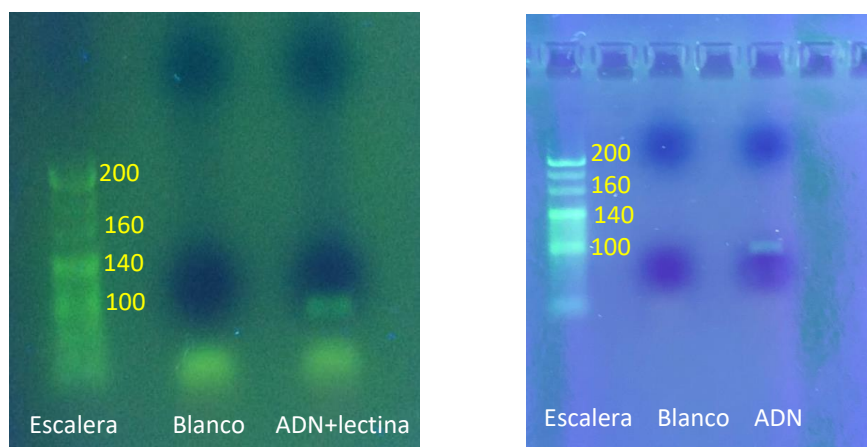


Figura 4.2: Geles del 2% de agarosa que muestran la escalera de tamaños, un blanco y el producto de PCR de la librería inicial en presencia de la lectina (izquierda) y en ausencia (derecha).

Tras la realización en paralelo de las opciones A y B durante dos rondas de selección más (4 y 5), se evaluó el enriquecimiento de las colecciones de cada una de las opciones en secuencias con afinidad hacia la hPSA, mediante medidas de absorbancia y de espectroscopia de resonancia de plasmón de superficie que se detallan a continuación.

En las medidas de absorbancia, cada una de las colecciones obtenidas después de los diferentes ciclos de selección se calentó a 98 °C durante 4 min y se enfrió en hielo durante 4 minutos antes de hacerlas interaccionar con partículas magnéticas modificadas con la hPSA durante 10 minutos a 25 °C y 1300 r.p.m. Tras la separación magnética se recogieron las secuencias que no interaccionado (sobrenadante) y se lavaron las partículas dos veces con 200 µL de BSL. Tras la elución con agua a 95 °C durante 30 minutos y la separación magnética, se recogieron aquellas secuencias que se habían unido a la PSA. La cantidad de secuencias de ADN (ssADN) en la fracción enlazada se midió mediante espectroscopía VIS-UV a 260 nm. Para saber la concentración de secuencias la absorbancia se refirió a una curva de calibrado externa, construida con una secuencia de ADN del mismo tamaño (80 bases).

Como se puede observar en la Figura 4.3, la cantidad de secuencias que se enlazan a la hPSA fue aumentando con los ciclos o rondas de selección cuando se emplea la modalidad B, mientras que en la modalidad A la cantidad de secuencias enlazadas disminuye de la ronda 4 a la 5.

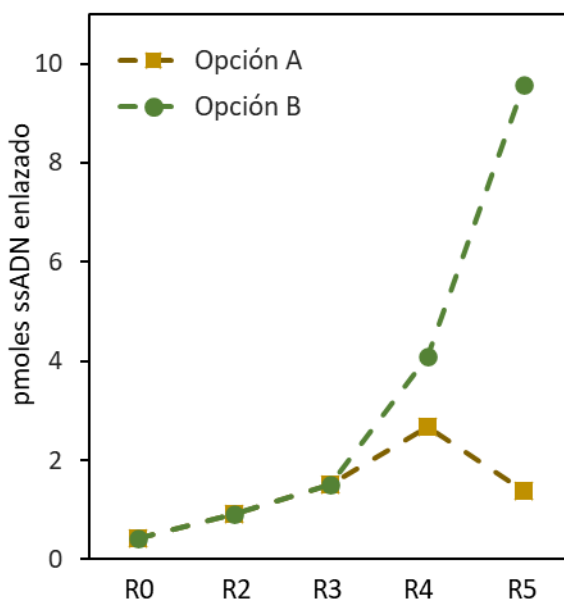


Figura 4.3: Evolución de la cantidad de ssADN enlazado a la hPSA a lo largo de las rondas de selección empleando la opción A (dorado) y B (verde).

Para las medidas de SPR se inmovilizó covalentemente la PSA sobre un disco de oro, como se indicó en el capítulo 3, y se hizo interaccionar con concentraciones crecientes de ADN de cada ronda de selección. Los resultados obtenidos mediante esta metodología se resumen en la Figura 4.4, observándose un decrecimiento de la afinidad promedio hacia la hPSA de la colección al pasar de la ronda 4 a la 5 cuando se emplea la opción A, mientras que con la opción B se obtiene un incremento progresivo en la afinidad promedio en los ciclos sucesivos.

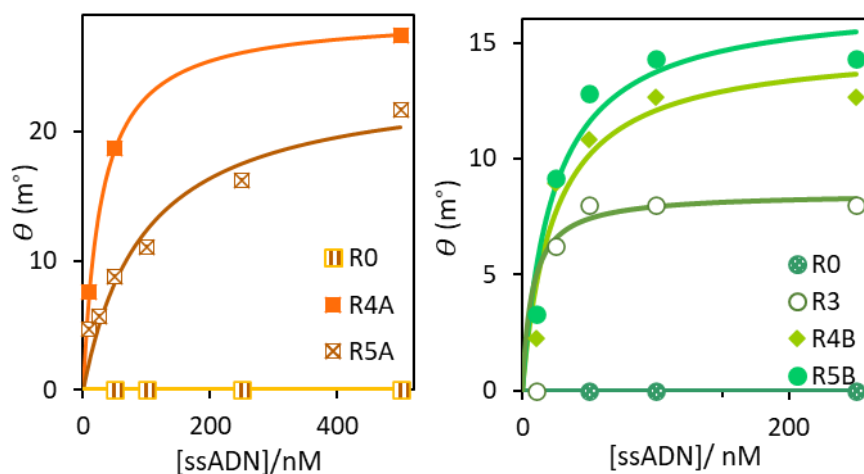


Figura 4.4 : Curvas de enlace obtenidas mediante SPR para el ssADN de las rondas 4 y 5 de la opción A del SELEX (izquierda) y de las rondas 3, 4 y 5 de la opción B (derecha). En ambos casos se muestra como control la curva de enlace de la R0.

Los resultados obtenidos con ambas metodologías revelan que la opción A lleva a un decrecimiento en el número de secuencias capaces de unirse a la hPSA y con una menor afinidad, mientras que la opción B da lugar a un incremento progresivo en el número de secuencias y en la afinidad promedio de las mismas hacia la PSA. Por estos motivos se seleccionó la opción B como la mejor manera de dirigir la selección y se realizaron cinco rondas de selección más para maximizar la afinidad de las secuencias hacia la hPSA. Se monitorizó la capacidad de enlace de la colección de secuencias hacia la hPSA y rPSA tras la realización de cada ronda mediante espectroscopia VIS-UV.

En la décima ronda de selección se realizaron además medidas de SPR y curvas de remelting. Se evaluó también la capacidad de estas secuencias para reconocer a la rPSA. Como se muestra en la Figura 4.5, a partir de medidas de la fracción de secuencias enlazadas mediante absorbancia se observó un aumento progresivo en secuencias con afinidad hacia la PSA humana a lo largo de las diferentes rondas, alcanzado un 78 % de secuencias enlazadas en la última ronda. Por el contrario, se observó un bajo número de secuencias capaces de unirse a

la rPSA a lo largo de todas las rondas de selección, alcanzándose un valor mínimo de 3 % para la última ronda. Este resultado muestra la eficacia de la estrategia de selección llevada a cabo para diferenciar las formas glicosilada y no-glicosilada de la PSA.

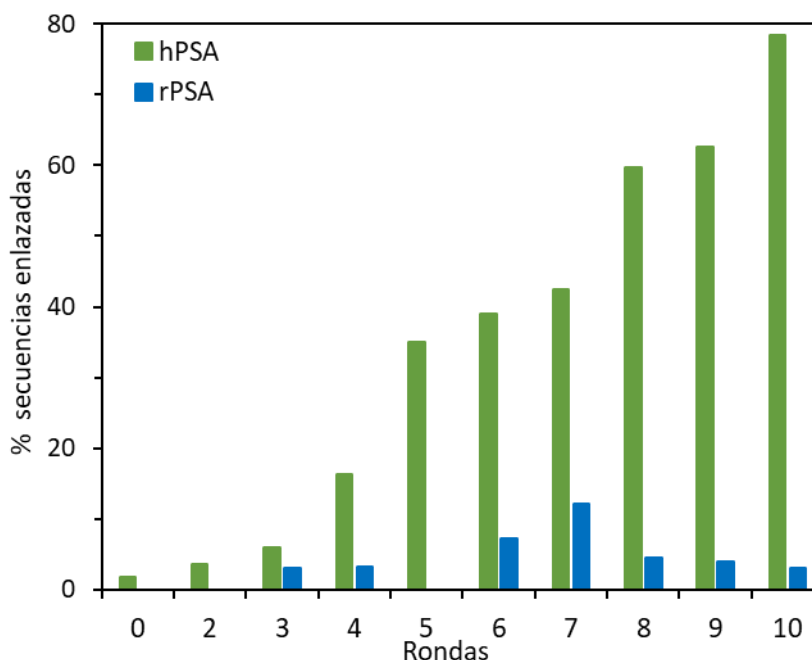


Figura 4.5: Evolución del porcentaje de ssADN que se une a la hPSA y rPSA a lo largo de las rondas del SELEX obtenido mediante medidas de absorbancia.

Estos resultados se confirmaron evaluando la afinidad promedio de cada colección hacia hPSA y rPSA mediante medidas de SPR. Para ello, se inmovilizó covalentemente la hPSA o la rPSA sobre un disco de oro del SPR, monitorizando en tiempo real su interacción con diluciones seriadas de la colección de secuencias de cada ronda. Los resultados que se recogen en la Figura 4.6 muestran como en las sucesivas rondas se produce un incremento en el ángulo de resonancia medido para la misma concentración de ssADN, cuando la colección interacciona con hPSA. Esto es indicativo de un aumento de la afinidad promedio de las secuencias hacia la hPSA en las sucesivas rondas de selección. Se estimó un valor de la afinidad promedio de las secuencias presentes en la ronda

10 de  $7.6 \pm 0.6$  nM. Para las secuencias de la última ronda se estudió además su afinidad hacia la rPSA, observándose un desplazamiento en la curva de enlace hacia concentraciones mayores de ssADN, lo que evidencia la baja afinidad de las secuencias de esta ronda hacia la proteína sin glicanos (Figura 4.6).

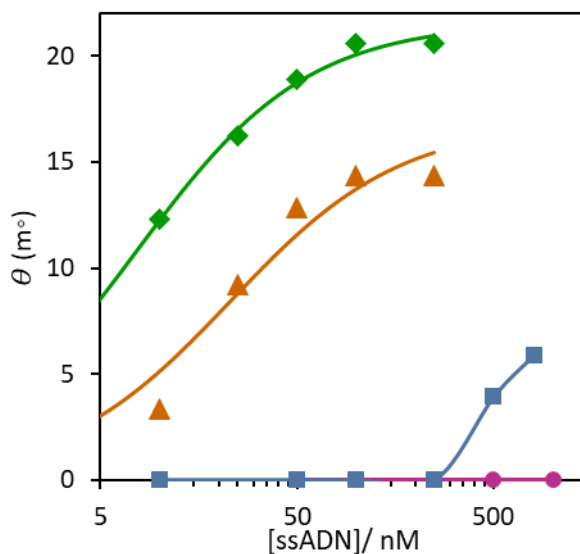


Figura 4.6: Curvas de enlace obtenidas mediante SPR para concentraciones crecientes del ssADN de la ronda 5B con la hPSA (naranja) y la ronda 10B para la hPSA (verde) y para la rPSA (azul). Como control se muestra la curva de enlace de las secuencias de la librería inicial (magenta) hacia la hPSA.

Finalmente se estudió la variación en la diversidad de secuencias a lo largo de las rondas de selección mediante el análisis de las curvas de remelting, siguiendo el protocolo detallado en el capítulo 3. En la Figura 4.7 se muestran las curvas de remelting para la colección inicial (R0) y tras la última ronda de selección (R10), observándose un aumento en la temperatura de fusión (*melting*) del ADN de 81.7 °C para la biblioteca inicial a 84 °C para la colección de la ronda 10, lo que indica una disminución en la diversidad de esta última.

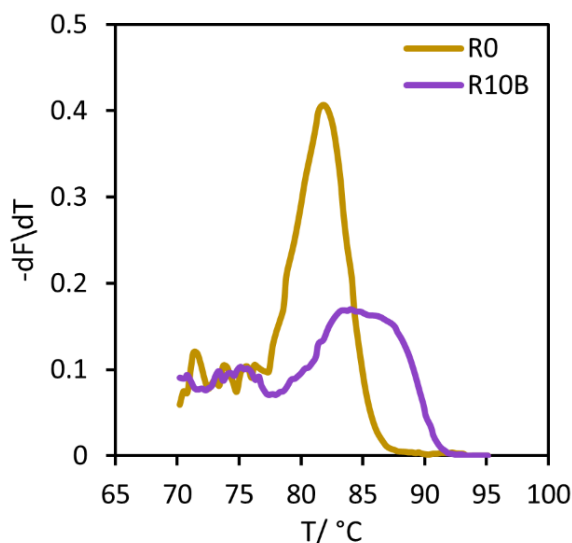


Figura 4.7 : Curvas de remelting para el ssADN de la ronda 0 (dorado) y la ronda 10B (morado).

Dado los buenos resultados de enriquecimiento obtenidos tras diez ciclos de selección, se decidió dar por terminado el proceso de selección e identificar las secuencias que se encuentran en la colección obtenida tras esta última ronda. Para ello, se procedió a la clonación en *Escherichia coli* y 38 clones escogidos al azar se secuenciaron, se analizaron y se clasificaron en familias.

Las secuencias obtenidas se analizaron y se clasificaron en tres familias empleando el software BioEdit (Figura 4.8). La familia I está formada por 15 secuencias que tiene el cebador directo en su extremo 5' y no poseen ninguna otra homología entre ellas. El número de secuencias que poseen el cebador es muy alto por lo que lo más probable es que no se deba a un artefacto de la PCR y que el cebador pueda ser importante para el enlace. La familia II está formada por 3 secuencias que poseen similitud con el aptámero PSA-1 (descrito en el anterior capítulo). El resto de secuencias no tiene similitud entre ellas y se agrupan como familia III.

### Familia I

	10	20	30	40	50	$\Delta G$ (kcal/mol)
1	GCAAGCAATGGCGACCCGAACAGTAGGATAGGGTTGATAGGTTAAGAG					-3.54
5	GGGA.ACGAGGAGC-CTAG.A.					-3.86
6	-ACTCAGTC.AT.AGAATTAC.G..G.....CTATATA					-2.30
10	-----TCTATCGAAATTGATTCTT.G.....					-1.72
13	---GG.GATTTCG..A.TGTTT.CCCT.....					-1.39
14	-----CCTT.GAGTAGTACCC.....					-3.91
16	-----CA.TCCTG.ACCTCCAT.AC.....C					-1.71
18	-----TA..G.CC.....CTATATA					-1.56
19	-AGCTGG.GCA.TCTAAACT.G..TTCG.....C					-2.63
22	-----TA.GTG.GCAGTCGATC.....CTATAA					-0.69
23	-----G..GGGATGAT..G..T.....C					+1.42
25	-A.CC.GTG..GTGTTGATCGGCCTCT.....C					-4.51
29	-----G.TGC..C.....C					-0.10
35	---CAGCTATCACGATGAGC-CT.GCAC.....					-3.76
36	-----AG...AG.GGTCC.....					-1.53

### Familia II

	10	20	30	40	$\Delta G$ (kcal/mol)
PSA-1	GGACGGTTGCGCTATATTTAACCAAAAGTCTGGAT-TAAC				-3.07
3	.AG...GGTT...GGGA.G.TAAGGCCCT.T..G.CTG				-3.16
12	--TC.CATT..GGGGAG.GAT--TGC..TA..GGCGAGTTC				-4.12
15	.....C.CT.T...AG.G..--CA.....CG.....TT-				-3.41

### Familia III

	10	20	30	40	$\Delta G$ (kcal/mol)
4	GGATCAGAACTTCCACTCCCTGGCATTATTCATTGCCAA				-4.31
7	GTAACACTACTGAAGGGTCTCCTGGGGTATGTCGAGTATG				-1.43
8	ACAGGCTAGTTCAAGGACAGCAGCCGCCATCAAAATGCCG				-2.55
9	TGCGAAAGTGGGCTTCGTAACACTTGCATCTTGGACCC				-3.13
11	CGGTATAGGTTAATGAGAGGATAGCGTTATCAGGACTAGT				-1.63
17	GTAGTCTCTAATCAACGTGAGTGTGTAACCCGAGTACGCC				-1.96
20	TTAGCGGATTTGGTCAATTCGACACTGTTGAGCATATGTG				-3.06
21	CTGATACATTACAAGTAGATCTCTGGTCCACGAACGTGTCGA				-2.78
24	TAGGAAGGACTCCATTTCAACGATACGGTGGCAAGGGACG				-3.12
26	CTCGGGTGGGTCAAGTATATGAGTACAGTTTTTCGAGTCT				-0.57
27	CCAGGCAGATTTCTTAGAGCTAAACAATTGAGTAGGCTGT				-1.06
28	GATGTCAACTAGCTGTTGGGGAGATGAGGGATATGTT				-3.05
30	CCATTGGTTGCTAAGGATGACGAATTTCCCATAAAGCGGTA				-0.46
31	TTAAGCGTATCTCTGATGGATGGATACGATACTCGAACAT				-5.20
32	GGGTAGCTGGGATACGGCATTACCTACCCGCCTGGAT				-3.61
33	GATGTCAACTAGCTGTTGGACTGGGATGCTTTAATGCTC				-3.26
34	TTATGGCAGGGCAGTGGTATCTTAACCCGAAAGTCAGCTG				-4.87
37	ATATACGATGTCAACTAGCTGTTGGACGGTAGCTATAAAATT				-3.05

Figura 4.8: Secuencias obtenidas de la ronda 10 agrupadas en tres familias tras la eliminación de las secuencias de los cebadores empleando el software BioEdit, y su correspondiente energía libre predicha con Mfold.

Para su posterior estudio se seleccionan tres secuencias representativas de las familias I y II. De la familia I se seleccionó el clon 35 (PSAG-3), ya que es el que posee una estructura secundaria más fuerte que involucra la mayoría de los nucleótidos. De la familia II se seleccionó el clon 15 (PSAG-2) puesto que es el que más similitud tiene con el



### 4.3 Resultados y discusión

aptámero PSA-1 y el clon 3 (PSAG-1) ya que se encontró dos veces en la clonación (Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Secuencias de los aptámeros seleccionados

Nombre	Secuencia 5'→3'
PSAG-1	GAGCGGGGTTGCTGGGATGATAAGGCCCTTTGATGTCTG
PSAG-2	GGACGGCTCTGTTATAAGTGACAGATCTGGACGTAACATT
PSAG-3	CAGCTATCACGATGAGCCTTGCACTAGGGTTGATAGGTTAAGAG

La estructura secundaria de los potenciales aptámeros de cada familia se predijo utilizando Mfold, empleando como condiciones de predicción una temperatura de 25 °C y una concentración de sales de 0.154 M de NaCl (Figura 4.9).

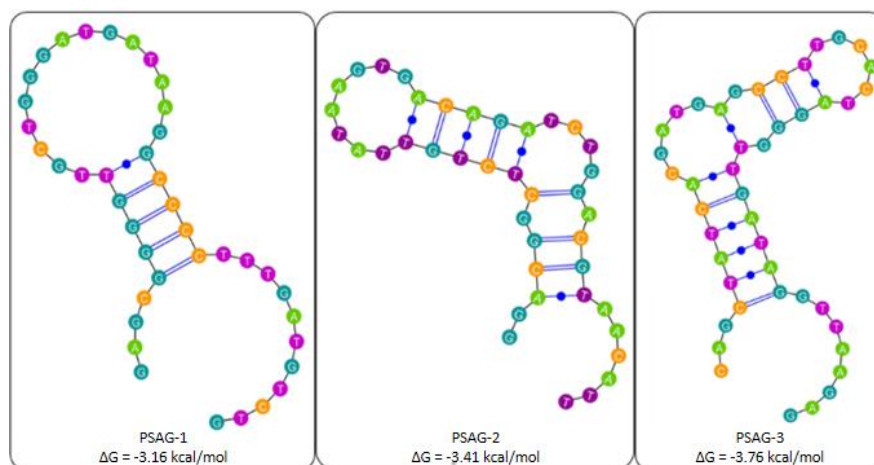


Figura 4.9: Estructura secundaria de los aptámeros seleccionados. La estructura secundaria de los clones seleccionados de la ronda 10 fue dibujada empleando el software VARNagui y su energía libre calculada usando Mfold.

### *4.3.2 Caracterización de los aptámeros seleccionados*

Para escoger el aptámero con las mejores características de reconocimiento hacia la zona de glicosilación de la PSA se evaluó la capacidad de las tres secuencias seleccionadas de enlazarse a la PSA glicosilada y a la no glicosilada, mediante un ensayo de unión con detección electroquímica empleando hPSA y rPSA unidas covalentemente a la superficie de electrodos serigrafados de oro. Los electrodos se incubaron en una disolución 500 nM de cada uno de los aptámeros marcados con fluoresceína en su extremo 5' y tras la unión específica se incorporó el conjugado anti-fluoresceína-peroxidasa. De esta forma, tras la adición de tetrametibencidina y peróxido de hidrógeno (sustratos de la peroxidasa) es posible obtener mediante cronoamperometría a -0.2 V una señal que depende de la cantidad de aptámero enlazado en la primera etapa (véase capítulo 3, sección 2.4).

Como se muestra en la Figura 4.10 los tres aptámeros seleccionados son capaces de unirse a la hPSA, aunque dan lugar a señales de diferente magnitud, lo que sugiere que existen diferencias en su afinidad hacia la PSA o de accesibilidad a su sitio de unión. El aptámero PSAG-1 presentó la mayor señal para la hPSA, mientras que para el aptámero PSAG-2 se obtuvo una señal que es el 37 % de la primera y para el PSAG-3 la señal se redujo hasta un 44 %. Por el contrario, el aptámero PSAG-1 mostró una señal mucho más pequeña para la rPSA, mientras que en el caso de los otros dos aptámeros la señal que se obtuvo es similar, dentro del error experimental, a la obtenida frente a la hPSA. De estos resultados se deduce que como sólo el aptámero PSAG-1 es capaz de diferenciar entre la proteína glicosilada y la no glicosilada, este aptámero debe involucrar la región glicosilada de la PSA en el reconocimiento molecular, y por tanto se seleccionó este aptámero para estudiar con mayor profundidad sus características de enlace.

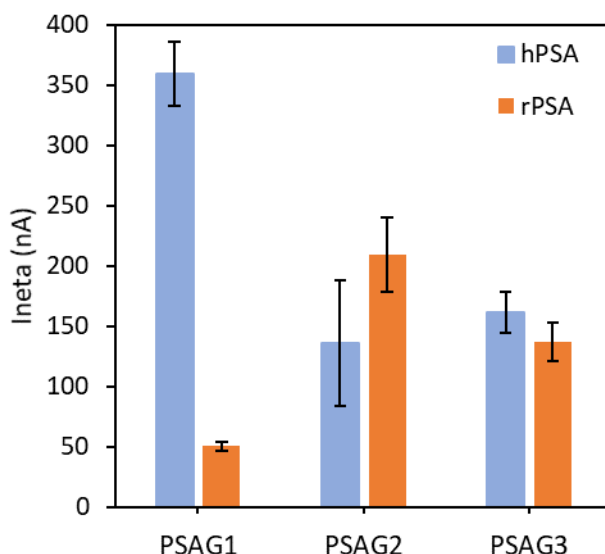


Figura 4.10: Intensidades de corriente netas obtenidas para la interacción de 500 nM de cada aptámero con la PSA humana (azul) y la PSA recombinante (naranja) inmovilizadas sobre electrodos de oro.

La afinidad del aptámero PSAG-1 se evaluó más en detalle construyendo una curva de enlace, haciendo interaccionar concentraciones crecientes del aptámero con la proteína hPSA inmovilizada sobre electrodos de oro. A medida que se aumentó la concentración de aptámero se observó un incremento en la intensidad de corriente medida, que se representó frente a la concentración de aptámero para obtener la curva de enlace (Figura 4.11). El ajuste de la curva al modelo de Langmuir permitió estimar una constante de disociación de  $72 \pm 8$  nM, siendo por lo menos un orden de magnitud mejor que las descritas para las lectinas (1-10  $\mu$ M)<sup>128</sup>. Por ejemplo, la afinidad del aptámero PSAG-1 es 160 veces mejor que la descrita para una lectina de algas que reconoce específicamente la fucosa  $\alpha$ 1-6 de los N-glicanos<sup>129</sup>, y 43 veces superior a la de la lectina PhoSL<sup>123</sup>.

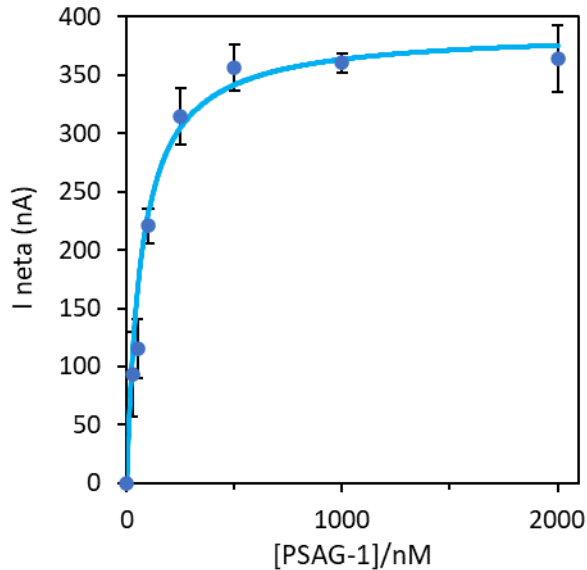


Figura 4.11: Curva de enlace del aptámero PSAG-1 en PBS-Na<sup>+</sup> obtenida con electrodos de oro modificados con hPSA.

El aptámero PSAG-1 tiene en su secuencia un alto contenido en guaninas, lo que podría permitir que en su estructura secundaria se formasen cuartetos de guaninas. De ser así, la estabilidad de esta estructura, y con ello la afinidad hacia la hPSA y la magnitud de las señales de saturación, podría aumentar en un medio con iones potasio, ya que está descrito que los iones potasio estabilizan los cuartetos de guaninas. Por esta razón, se ensayó un nuevo medio para hacer las interacciones, idéntico medio de selección pero en el que se cambian los iones sodio por iones potasio (PBS-K<sup>+</sup>), manteniendo la fuerza iónica constante.

Cuando se realizó la curva de enlace en el medio PBS-K<sup>+</sup> se observó un incremento en la señal de saturación de  $398 \pm 14$  nA para PBS-Na<sup>+</sup> a  $970 \pm 17$  nA en PBS-K<sup>+</sup>. Además, la constante de disociación estimada a partir de la curva de enlace pasó a ser de  $34 \pm 9$  nM. También se estimó la constante de disociación mediante medidas de afinidad por SPR (véase capítulo 3 sección 2.4 para el protocolo detallado) obteniéndose una  $K_D$

de  $1.9 \pm 0.2$  nM, confirmando la mejoría en la afinidad del aptámero en el medio con iones potasio (Figura 4.12).

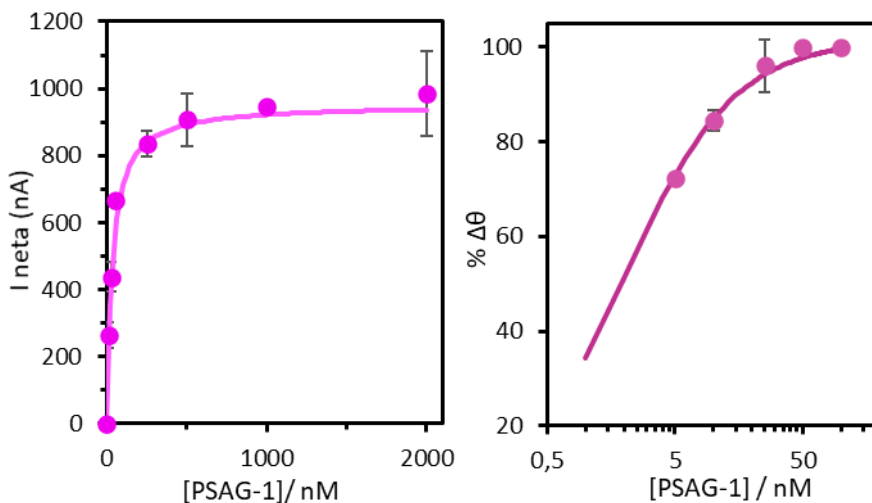


Figura 4.12: Curva de enlace del aptámero PSAG-1 obtenidas en el medio PBS-K<sup>+</sup> mediante medidas electroquímicas (izquierda) y SPR (derecha), ambas ajustadas al modelo no lineal de Langmuir.

A continuación, se evaluó la selectividad del aptámero frente a otras dos glicoproteínas que poseen fucosa  $\alpha$ 1-6 en el núcleo de su estructura: la lipocalina-2 o NGAL y la  $\alpha$ -fetoproteína (AFP). Se inmovilizaron estas proteínas sobre electrodos de oro, haciéndolas interaccionar con concentraciones crecientes del aptámero en PBS-Na<sup>+</sup>. Para ambas se observó una señal distinta del blanco para concentraciones altas de aptámero, pero al contrario que para la hPSA esta señal no aumenta significativamente al aumentar la concentración de aptámero. También se observó un comportamiento comparable para el de enlace a la rPSA (Figura 4.13). Así mismo se evaluó la selectividad en PBS-K<sup>+</sup> para una concentración de aptámero 500 nM, obteniéndose una selectividad frente a la rPSA y NGAL similar a la obtenida en PBS-Na<sup>+</sup>, pero un poco peor frente a la AFP (31 % en PBS-K<sup>+</sup> vs. 18 % en PBS-Na<sup>+</sup>).

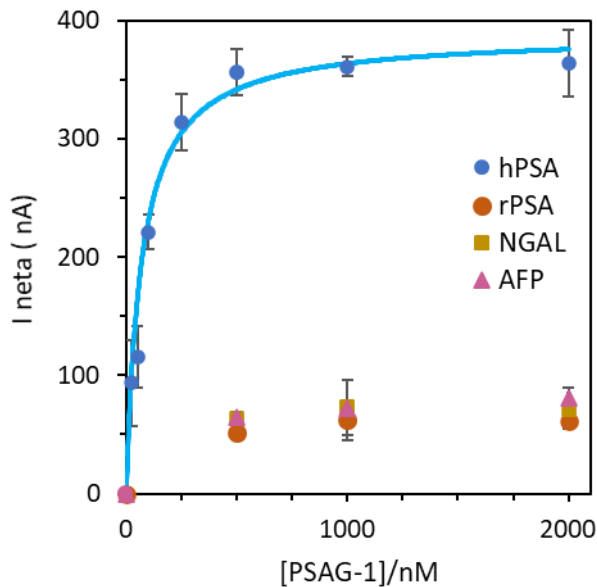


Figura 4.13 : Selectividad del aptámero PSAG-1. Bajo las mismas condiciones de unión (PBS-Na<sup>+</sup>) el aptámero no muestra una unión significativa hacia la rPSA, NGAL y AFP.

Además, se evaluó la selectividad del aptámero PSAG-1 frente a la ovoalbúmina, una glicoproteína con un alto contenido en manosas y sin fucosa del núcleo. De nuevo, para esta proteína se observó un decrecimiento en la capacidad de enlace del aptámero. La señal obtenida para la unión de una concentración 500 nM de PSAG-1 es un  $21 \pm 2$  % de la registrada para hPSA, siendo solamente un poco mayor que la obtenida para la rPSA ( $13 \pm 5$  %). Incluso para una proteína como la transferrina, con más de un sitio de N-glicosilación pero sin fucosa del núcleo, se observa una menor capacidad de enlace del aptámero, con una señal para 500 nM de aptámero del  $45 \pm 5$  % de la registrada para hPSA. Los resultados obtenidos demuestran la excelente selectividad de este aptámero frente a otras glicoproteínas.

Si comparamos este aptámero con el obtenido en el anterior SELEX, el PSA-1, observamos que a diferencia del PSA-1 que no era capaz de distinguir entre la hPSA y la NGAL, este nuevo aptámero obtenido sí que

es capaz de diferenciar entre glicoproteínas. Además, ambos aptámeros mantienen una baja unión a la PSA recombinante (Figura 4.14).

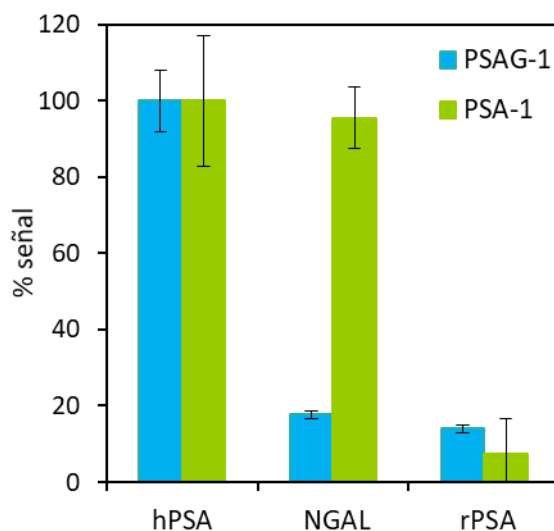


Figura 4.14 : Comparación de la selectividad de los aptámeros PSAG-1 (azul) y PSA-1 (verde) hacia las proteínas hPSA, rPSA y NGAL mediante ensayos electroquímicos.

Los resultados de afinidad y selectividad del aptámero PSAG-1 obtenidos en el medio con iones potasio apuntan a la presencia de cuartetos de guanina en la estructura secundaria del aptámero, para corroborar la presencia de estos se realizó un estudio estructural del aptámero que se describe a continuación.

#### 4.3.2.1 Estudio estructural del aptámero PSAG-1

Debido al alto contenido de guaninas presentes en la secuencia del PSAG-1 y a los resultados obtenidos en su caracterización, es posible que este aptámero presente una estructura secundaria de cuartetos de guanina. Los cuartetos de guanina de los ácidos nucleicos son estructuras no canónicas estabilizadas por pares de bases G-G, en las que cuatro guaninas se unen en una conformación plana mediante enlaces de hidrógeno de Hoogsteen y las bases intermedias se posicionan formando bucles de cadena sencilla. Se pueden apilar dos o más tetraedros unos

encima de otros, provenientes de la misma cadena o juntándose múltiples cadenas<sup>130</sup>.

En primer lugar se utilizó el programa QGRMapper<sup>131</sup> para predecir los posibles cuartetos de guanina. Este programa analiza la secuencia e identifica las guaninas que forman el cuarteto y el resto de bases que formarían los bucles entre las guaninas. De este análisis se obtiene que en efecto la estructura podría presentar un cuarteto de guanina y que los residuos de guanina que formarían el cuádruplex son las guaninas en las posiciones 5, 6, 7, 8, 15, 16, 24 y 25 (en rosa subrayadas), y el resto de bases entre ellas formarían los bucles (en azul).

GAGCGGGGTTGCTGGGATGATAAGGCCCCTTTGATGTCTG

Para corroborar si la estructura secundaria del aptámero es de cuartetos de guanina se realizó un estudio estructural del mismo mediante dos técnicas, la espectroscopia de dicroísmo circular y el *remelting* VIS-UV.

La espectroscopia de dicroísmo circular permite el estudio de la conformación de las moléculas y se basa en la diferente absorción de la luz polarizada. Las diferentes estructuras secundarias de los aptámeros se asocian con diferentes perfiles del espectro de dicroísmo circular. Para las estructuras secundarias de cuartetos de guaninas está descrito un máximo a 260 nm y un mínimo a 240 nm, mientras que para la estructura secundaria de horquilla o *hairpin* se describe un máximo sobre 280 nm y un mínimo sobre 245 nm<sup>132,133</sup>. Se realizó el espectro de dicroísmo circular de una disolución 5 µM del aptámero en ambos medios, con iones sodio y con iones potasio, a una temperatura de 25 °C controlada mediante una bomba Peltier en un espectropolarímetro JASCO J-815 empleando una cubeta de cuarzo de 2 mm de paso óptico. El espectro de dicroísmo se registró desde 500 nm hasta 200 nm con una velocidad de 200 nm/min y con una resolución de 1 nm. Cada espectro es la media de tres espectros realizados de forma consecutiva y tras la corrección de la



línea base con el espectro del disolvente. Como se observa en la Figura 4.15 los espectros de dicroísmo circular obtenidos en el medio con iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  son idénticos, observándose un máximo a 276 nm y un mínimo a 240 nm, que sugieren que la estructura secundaria del aptámero se trata de una horquilla y no de un cuarteto de guaninas.

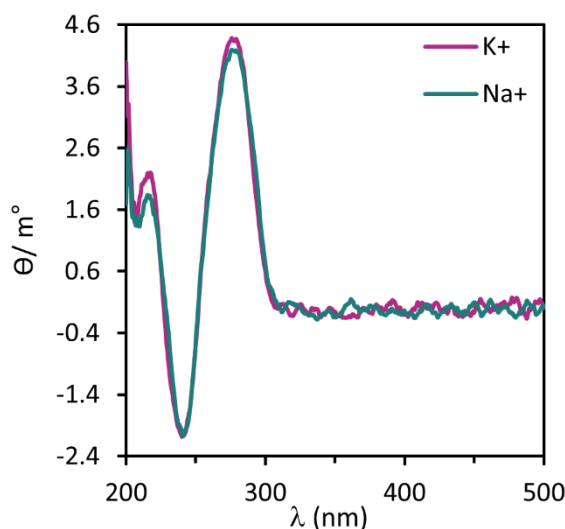


Figura 4.15: Espectro de dicroísmo circular de una disolución 5  $\mu\text{M}$  del aptámero PSAG-1 obtenido en una disolución de fosfato 0.1 M pH 7.4 con una concentración 154 mM de iones  $\text{Na}^+$  (azul) o iones  $\text{K}^+$  (rosa).

Esta misma conclusión se obtiene de los estudios de *remelting* VIS-UV. Este estudio consiste en monitorizar la absorbancia del aptámero a 295 y 260 nm con la temperatura durante el calentamiento en el que se produce la disociación o *melting* y durante el enfriamiento en el que se produce la reasociación o *annealing*. Este experimento se llevó a cabo en un espectrofotómetro Carry 60 UV-VIS equipado con una celda Peltier y una cubeta con control de temperatura. Para ello se colocó una disolución 5  $\mu\text{M}$  del aptámero en la disolución reguladora con iones potasio (PBS- $\text{K}^+$ ) en una celda de cuarzo de alta precisión y se calentó hasta 90  $^{\circ}\text{C}$ , enfriándose a continuación lentamente hasta los 25  $^{\circ}\text{C}$  y por último se calentó nuevamente hasta los 90  $^{\circ}\text{C}$ . La absorbancia se monitorizó entre 500 nm y 200 nm con una velocidad de barrido de 600

nm/min y las medidas se realizaron cada 10 °C excepto entre 25 y 30 °C. El espectro final a cada temperatura se obtiene restando al espectro del aptámero el del disolvente para corregir la señal de fondo. Como se observa en la Figura 4.16, la absorbancia del aptámero a 295 nm se mantiene prácticamente constante sin observarse una pendiente negativa para la curva de *melting* tal y como se describe para los cuartetos de guanina. Se obtiene un perfil de absorbancia a 260 nm normal para la estructura secundaria de horquilla, en la que la curva de *annealing* y *melting* son iguales y se observa un aumento de la absorbancia con la temperatura<sup>134,135</sup>. Además, a longitudes de onda más altas (405 nm) la absorbancia se mantiene prácticamente constante y con valores bajos mostrando que no se han producido artefactos durante las medidas.

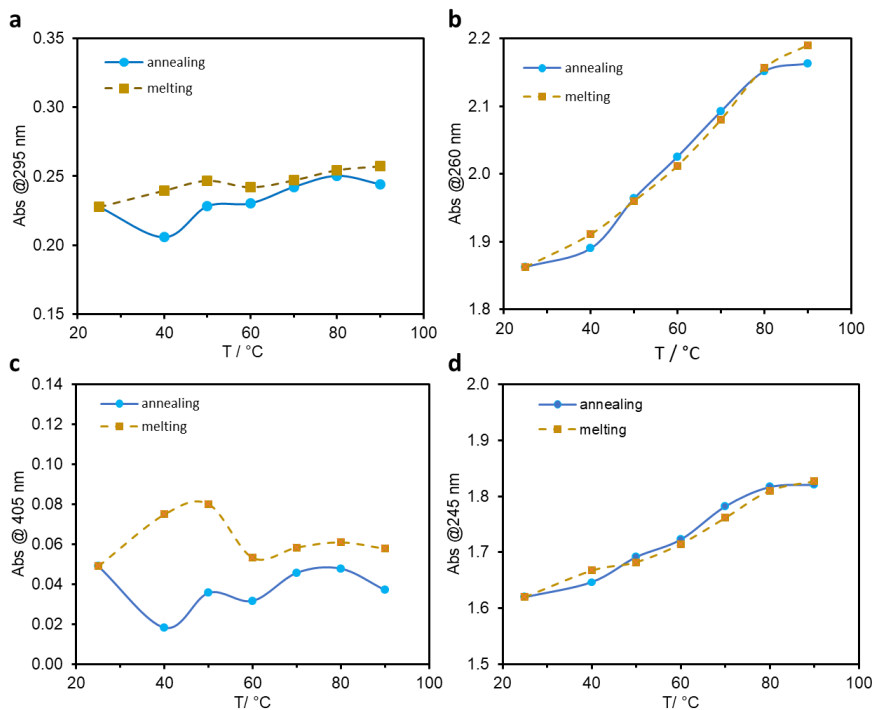


Figura 4.16: Curvas de remelting UV-VIS. Representación de la absorbancia frente a la temperatura a 295 nm (a), 260 nm (b), 405 nm (c) y 245 nm (d) de una disolución 5 μM del aptámero PSAG-1 en PBS-K<sup>+</sup>. El ciclo de enfriamiento (*annealing*) se muestra en azul y el de calentamiento (*melting*) en dorado.

De ambos estudios se concluye que el aptámero no presenta una estructura secundaria de cuartetos de guanina si no una de horquilla como la predicha por el software Mfold.

En resumen, en este capítulo se ha descrito por primera vez una metodología generalizable para dirigir el proceso de selección de aptámeros para obtener un reconocimiento binario de glicoproteínas. Los aptámeros que se identifican mediante este proceso reconocen tanto los glicanos como la región peptídica de la glicoproteína, mejorando así la selectividad de los receptores sintéticos para glicoproteínas descritos hasta el momento. Mediante esta estrategia de selección se ha desarrollado un aptámero PSAG-1 capaz de reconocer selectivamente los glicanos de la PSA humana y con la capacidad de discriminar esta proteína de otras glicoproteínas.



## **CAPÍTULO 5**

*Estudio empírico y computacional  
del sitio de unión de los  
aptámeros*



## 5.1. Introducción

En los capítulos 3 y 4 se han descrito dos aptámeros capaces de enlazarse a los glicanos de la PSA, el PSA-1 y el PSAG-1, con diferentes características de unión. Aunque se han discutido resultados que apuntan a que los azúcares de la glicoproteína están involucrados en el reconocimiento molecular, no se posee información sobre qué azúcares participan en su unión al aptámero. Con el fin de identificar los azúcares que reconocen los aptámeros y conocer si alguno de ellos son los que se ven alterados en presencia del cáncer de próstata, en el presente capítulo se describen los trabajos, tanto experimentales como mediante simulaciones computacionales, diseñados para identificar los azúcares que participan en el evento de reconocimiento del aptámero y predecir el sitio de unión de los aptámeros a las proteínas. Los trabajos experimentales se basan en estudios de eliminación de azúcares paso a paso para posteriormente estudiar la capacidad de interacción del aptámero<sup>136</sup>. Mientras que mediante simulaciones computacionales se puede determinar la estructura secundaria y terciaria de los aptámeros y estudiar su interacción con proteínas<sup>137</sup>.

## 5.2. Protocolos

### *5.2.1 Estudio de desglicosilación.*

En la desglicosilación selectiva de la glicoproteína PSA se utilizaron enzimas glicosidasas específicas, que catalizan la hidrólisis de ciertos enlaces glucosídicos del glicano unido a la proteína<sup>136</sup>. La interacción con las enzimas específicas se realizó sobre electrodos serigrafados de oro modificados con la hPSA como se ha descrito anteriormente (capítulo 3).

Se emplearon enzimas específicas para la eliminación sucesiva de los azúcares de la proteína en el siguiente orden: sialidasa-A (P0722S),  $\beta$ -galactosidasa (P0746S), N-acetilhexosaminidasa (P0744), manosidasa

(P0768S), fucosidasa (P0748S) y péptido:N-glicosidasa F o PNGaseF (P0704S), obtenidas de New England Biolabs (Reino Unido). Todas las enzimas se prepararon en el medio y en la concentración especificados en los protocolos proporcionados por la casa comercial.

Las interacciones se realizaron en un volumen de 10  $\mu$ L a 37 °C en atmósfera húmeda durante 2 horas, excepto la interacción con la enzima PNGaseF que fue de 24 horas. Tras la interacción con las enzimas, de forma sucesiva, se realizó un ensayo de unión con detección electroquímica, utilizando una concentración 100 nM de PSAG-1 en PBS- $K^+$  o 500 nM de PSA-1 en BS durante 30 minutos. Se utilizaron los dos aptámeros marcados con fluoresceína en su extremo 5'. Para obtener información sobre la cantidad de aptámero enlazada a la PSA en los diferentes estados de desglicosilación, la superficie de trabajo se incubó a continuación con el conjugado enzimático: fragmento Fab de anti-fluoresceína-Peroxidasa, realizándose finalmente la medida electroquímica de la actividad de peroxidasa inmovilizada siguiendo el protocolo detallado en el capítulo 3.

### *5.2.2 Ensayo de desplazamiento.*

El ensayo de desplazamiento consiste en un ensayo de unión de los aptámeros a la proteína bloqueada con la lectina PhoSL, seguido de detección electroquímica. Para ello se inmovilizó covalentemente la proteína sobre electrodos serigrafados de oro siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 3. Antes de la realización de la curva de enlace con concentraciones crecientes del aptámero PSA-1 o PSAG-1 marcados con fluoresceína y la detección electroquímica, tuvo lugar el bloqueo de la hPSA con la lectina.

Esta etapa de bloqueo consistió en la incubación del electrodo sobre el que se había inmovilizado la hPSA con 10  $\mu$ L de una disolución de la lectina PhoSL, a una concentración 1  $\mu$ g/mL preparada en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se lavó el



electrodo con PBS y se secó con corriente de nitrógeno para llevar a cabo la unión del aptámero, el marcaje enzimático y la medida electroquímica del aptámero capaz de unirse a la PSA, con un protocolo idéntico al utilizado para obtener las curvas de enlace de los aptámeros.

### 5.2.3 Ensayo de enlace competitivo.

Este ensayo también consiste en un ensayo de unión de los aptámeros a la hPSA pero en presencia de L-(-)-fucosa en disolución, con detección electroquímica. En primer lugar, se inmovilizó la hPSA a la superficie de electrodos serigrafados de oro siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 3. A continuación, se incubó esta superficie durante 30 minutos con tres concentraciones distintas (10, 50 y 500 nM) del aptámero PSAG-1, marcado con fluoresceína y en el medio de PBS-K<sup>+</sup>, en presencia de dos concentraciones de L-(-)-fucosa en disolución (1 y 10 μM). Tras lavar el electrodo y secarlo con corriente de nitrógeno tuvo lugar el marcaje enzimático y la medida electroquímica del aptámero enlazado mediante el protocolo ya descrito.

### 5.2.4 Modelización computacional

#### 5.2.4.1 Predicción de la estructura tridimensional de los aptámeros.

Para predecir la estructura 3D de los aptámeros PSAG-1 y PSA-1 se partió de la estructura secundaria predicha mediante la herramienta bioinformática Mfold<sup>122</sup> a 25 °C y con una fuerza iónica de 0.154 M. La estructura secundaria obtenida en formato Vienna (puntos y paréntesis) se transformó en una estructura 3D empleando el programa RNAComposer<sup>138</sup>. Este programa reconoce la estructura secundaria y la transforma en una estructura tridimensional. Como se trata de un programa pensado para ARN, proporciona una estructura tridimensional en las que las timinas han sido cambiadas por uracilos y las bases son ribosas en vez de desoxirribosas. Para tener la estructura tridimensional del aptámero de ADN se empleó el programa de edición molecular

Discovery Studio Visualizer. Con la herramienta “Built and Edit nucleic acid” se cambiaron las bases uracilo por timinas y se añadió un grupo OH para transformar las ribosas en desoxirribosas. De esta forma, se obtuvo un primer modelo para la estructura tridimensional del aptámero de ADN, que finalmente se refinó mediante simulaciones de dinámica molecular en la escala de los  $\mu$ s. Más en detalle, se utilizó la técnica de muestreo reforzado denominada GaMD (Gaussian accelerated Molecular Dynamics) para explorar distintas conformaciones del aptámero, ya que gracias a la introducción de potenciales armónicos, se suavizan las barreras energéticas para su interconversión. A partir de la simulación GaMD, se seleccionó entonces una estructura de baja energía para comenzar una simulación de dinámica molecular convencional, que finalmente nos proporcione un muestreo de equilibrio extenso de las características estructurales y dinámicas del aptámero en cuestión.

#### *5.2.4.2 Adecuación de la estructura cristalina de la PSA.*

Se escogió como estructura en 3D de la PSA la estructura cristalina 3QUM obtenida mediante rayos-X<sup>139</sup>, en la que la hPSA se encuentra formando un complejo tipo sándwich con dos anticuerpos monoclonales que se eliminaron de la misma empleando el programa de edición molecular Discovery Studio Visualizer. La estructura resultante, correspondiente solamente a la proteína PSA, está compuesta por dos moléculas de proteína, etiquetadas como P y Q en el archivo PDB. Ambas están glicosiladas con un carbohidrato triantenario con ácidos siálicos terminales (15 monosacáridos en total), unido mediante un enlace tipo N-glicosídico a la asparagina 69 de la cadena peptídica (Figura 1.8). La molécula P también contiene un pequeño disacárido con un enlace tipo O-glicosídico unido a la treonina 125, pero este se eliminó y solamente se incluyó el glicano unido a la asparagina 69 en el modelo molecular para la realización de los cálculos con el método de acoplamiento molecular o *docking* de la proteína con el aptámero. A pesar de que las coordenadas de la PSA en las moléculas P y Q tiene solamente pequeñas diferencias

estructurales, la falta de similitud en los enlaces entre la manosa en la posición 4 y la N-acetilglucosamina de la 5, y el entorno cristalino da lugar a una diferente orientación de los glicanos en la molécula de PSA. Sin embargo, en la resolución de la estructura cristalina la forma de los carbohidratos se modeló a partir de la molécula P, ya que la interpretación de los glicanos de la forma Q no es tan certera. Por este motivo, solamente se tomaron las coordenadas de la molécula P para la realización de los cálculos del *docking*. El estado de protonación de los residuos de la hPSA se asignó de acuerdo con cálculos de  $pK_a$  realizados con la plataforma web H++ (versión 3.1). Como resultado de los valores obtenidos, se asignó una carga positiva a todas las lisinas y argininas, y una negativa a todos los ácidos aspártico y glutámico. Todas las histidinas son neutras y protonadas en el nitrógeno Ne del anillo de imidazol, salvo la histidina 57 que se protonó en el nitrógeno Nd del anillo de imidazol.

### 5.2.4.3 Docking rígido entre el aptámero y la PSA.

En el análisis de docking se utilizaron las coordenadas del clúster más abundante obtenido del análisis de la simulación de dinámica molecular convencional del aptámero. Las coordenadas iniciales de la hPSA se obtuvieron de la estructura cristalina 3QUM refinada como se ha descrito anteriormente. Para la realización del docking se empleó el programa Autodock<sup>140</sup>, en los que la proteína PSA fue el receptor que permaneció fijo, y el aptámero fue el ligando que se desplazó y roto rígidamente alrededor de la proteína. Para explorar múltiples opciones de enlace se necesita disponer de los mapas de cuadrícula para el ligando (PSA) en los que se recoge la información sobre interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno y repulsiones estéricas de capa átomo. Los mapas se centraron sobre el átomo C1 del residuo fucosa y debido al gran tamaño del ligando se definieron 256 puntos de cuadrícula a lo largo de cada eje cartesiano con un espaciado de 0.333 Å. Este mapa define un espacio centrado de docking sobre la superficie de los azúcares de la PSA pero lo suficientemente amplio para permitir al aptámero rotar y trasladarse

alrededor de la PSA dando lugar a diferentes posiciones de enlace y diferentes tipos de complejos hPSA/aptámero. Cada cálculo de Autodock generó 500 configuraciones para el complejo hPSA/aptámero, cuyas geometrías se relajaron mediante minimización de la energía con el fin de introducir cierta flexibilidad en el protocolo de docking. Finalmente se reevaluó la estabilidad relativa de los distintos complejos mediante la función de *scoring* de Autodock y se visualizaron empleando el programa Chimera<sup>141</sup>. La relevancia y estabilidad de las interacciones del complejo hPSA/aptámero más favorable energéticamente obtenido del docking fueron evaluadas con más detalle llevando a cabo simulaciones de dinámica molecular sin restricciones, usando el algoritmo convencional. El sistema hPSA-aptámero fue sujeto a minimización, termalización y presurizado empleando el programa SANDER/PMEMD, y se llevaron a cabo simulaciones en la escala de los  $\mu$ s para relajar el complejo. Las poses resultantes fueron clusterizadas y se visualizaron empleando el programa Chimera.

### 5.3. Resultados y discusión

#### 5.3.1 Estudio empírico del sitio de unión de los aptámeros

Para estudiar el papel de los azúcares en el reconocimiento de los aptámeros PSA-1 y PSAG-1 hacia la PSA se realizó un estudio de desglicosilación selectiva de la proteína inmovilizada sobre electrodos de oro empleando diferentes enzimas desglicosidasas. Estas enzimas tienen la capacidad de eliminar un azúcar específico de la estructura de glicanos dejando el resto intactos.

Las enzimas empleadas en la desglicosilación y su función se recogen en la Tabla 5.1 y la Figura 5.1. A excepción de la sialidasa-A y la PNGaseF, que son enzimas endonucleasas, el resto de enzimas empleadas son exonucleasas. Esto quiere decir que para poder hidrolizar el azúcar este

necesita ser un azúcar terminal. Por este motivo deben emplearse de forma secuencial para eliminar previamente los azúcares que están unidos al azúcar que nos interesa eliminar.

Tabla 5.1: Enzimas empleadas en la hidrólisis de los azúcares de la PSA y azúcares que hidrolizan.

Enzima	Azúcar que hidrolizan
Sialidasa-A	Ácidos siálicos con enlace $\alpha$ 2-3,6,8,9
$\beta$ -galactosidasa	Galactosas con enlace $\beta$ 1-3,4
Manosidasa	Manosas con enlace $\alpha$ 1-2,3,6
N-acetil-hexosaminidasa	N-acetilglucosaminas con enlace $\beta$ 1-3,4,6
Fucosidasa	Fucosas con enlace $\alpha$ 1-2,3,4,6
PNGaseF	Todos los N-glicanos unidos a la proteína



Figura 5.1: Cadena de azúcares de la hPSA en la que se identifica el sitio de hidrólisis de las diferentes enzimas glicosidasas.

Tras la eliminación de cada azúcar se estudió la capacidad de enlace de cada aptámero mediante un ensayo de unión con detección electroquímica. Con fines comparativos, la capacidad de unión se expresó como el porcentaje de señal obtenido para cada estado de glicosilación con relación a la señal electroquímica obtenida para la unión del aptámero a la PSA intacta.

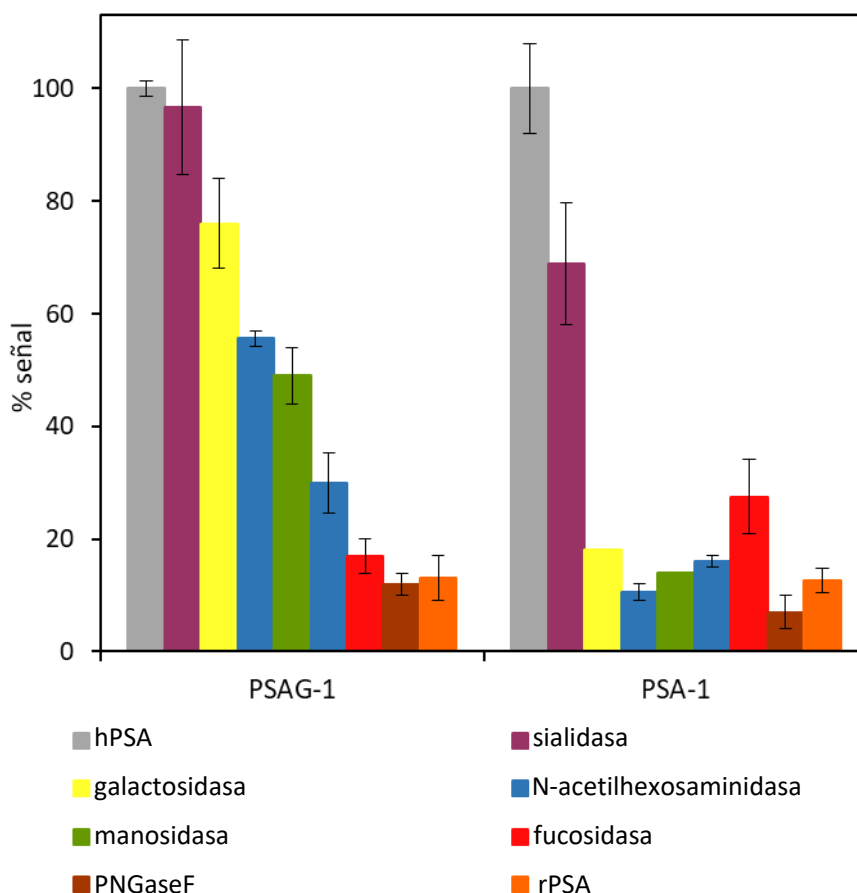


Figura 5.2: Resultados del experimento de desglicosilación. Se representa la capacidad de enlace de los aptámeros PSAG-1 y PSA-1 a la proteína intacta (hPSA), después de la eliminación de cada azúcar y a la PSA recombinante (rPSA). El % señal es la relación entre la señal obtenida tras cada desglicosilación y la que se obtuvo para la hPSA intacta.

Como se observa en la Figura 5.2 el patrón de unión es completamente diferente para ambos aptámeros, indicando que estos reconocen diferentes azúcares de la PSA. La eliminación del ácido siálico no afecta a la capacidad de enlace del aptámero PSAG-1 pero reduce en un 30 % la del aptámero PSA-1. Para el aptámero PSA-1, la eliminación de la galactosa supone una disminución del enlace a valores residuales (< 20 %), comparables con los obtenidos para la proteína recombinante (sin azúcares) o cuando se trata a la hPSA con la enzima PNGaseF que elimina todos los azúcares. Estos resultados indican que el aptámero PSA-1

reconoce la zona externa del glicano, lo que concuerda con los resultados anteriores, en los que se había observado que PSA-1 no reconoce la región peptídica de la PSA.

Por el contrario, el aptámero PSAG-1 mostró una disminución progresiva de la capacidad de enlace cuando se eliminaron secuencialmente los azúcares más cercanos a la región peptídica. Las disminuciones más importantes, entre el 13 % y el 21 % de decrecimiento, se observaron para la eliminación de la galactosa (azúcar 6 en la figura 1), la N-acetilglucosamina (azúcares 5 y 2) y la fucosa  $\alpha$ 1-6 del núcleo (azúcar 8). La señal obtenida tras la eliminación de todos los azúcares con la enzima PNGaseF fue comparable a la obtenida para la proteína PSA recombinante. Estos resultados sugieren que el aptámero PSAG-1 reconoce gran parte de los azúcares del glicano, especialmente los azúcares más internos y cercanos a la cadena peptídica, incluyendo a la fucosa  $\alpha$ 1-6 del núcleo.

La importancia de la fucosa  $\alpha$ 1-6 del núcleo en el reconocimiento de la hPSA por ambos aptámeros se estudió más en detalle mediante dos tipos de ensayo: de desplazamiento y competitivo. En el ensayo de desplazamiento se bloqueó la hPSA inmovilizada sobre electrodos de oro con la lectina PhoSL y después se hizo interaccionar con concentraciones crecientes de los aptámeros marcados con fluoresceína. Dado que la lectina PhoSL reconoce específicamente la fucosa  $\alpha$ 1-6 del núcleo de los N-glicanos, se supuso que el enlace de esta a la hPSA podría inhibir la interacción del aptámero si este reconoce a la fucosa  $\alpha$ 1-6 del núcleo. Además, si la afinidad del aptámero por este azúcar es mayor que la de la lectina este debería ser capaz de desplazarla y unirse a la glicoproteína. Para la interacción del aptámero PSA-1 con la hPSA bloqueada con la lectina se obtuvieron prácticamente las mismas señales que las obtenidas para la PSA sin bloquear (Figura 5.3). Este resultado indica que la lectina y el aptámero PSA-1 no comparten sitio de unión, ya que la presencia de esta no afecta a la unión del aptámero. Esta observación

está en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio de desglicosilación, en los que se observó que el aptámero PSA-1 reconoce la región más externa del glicano.

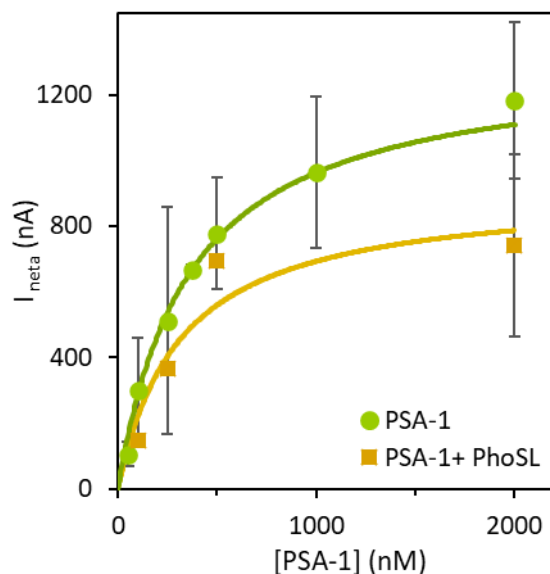


Figura 5.3: Curvas de enlace del aptámero PSA-1 a la hPSA (verde) y la hPSA bloqueada con la lectina PhoSL (naranja). Los ensayos se realizaron en PBS, midiendo cronoamperométricamente la cantidad de aptámero enlazado.

Sin embargo, para el aptámero PSAG-1 se observó un claro desplazamiento de la curva de enlace hacia concentraciones de aptámero mayores cuando la interacción se produjo con la hPSA bloqueada con la lectina PhoSL (Figura 5.4). Para concentraciones bajas de aptámero no se observó enlace a la hPSA bloqueada y a medida que se aumentó la concentración de aptámero, este fue capaz de desplazar a la lectina observándose unión a la proteína. Sin embargo, la señal de saturación en estas condiciones no llegó a alcanzar a la obtenida para la hPSA, posiblemente debido a que parte de las moléculas de lectina aun permanecían unidas a la PSA, imposibilitando estéricamente la unión de más aptámero (Figura 5.4). Los resultados obtenidos apuntan a que ambos receptores, lectina PhoSL y PSAG-1, comparten sitios de unión.



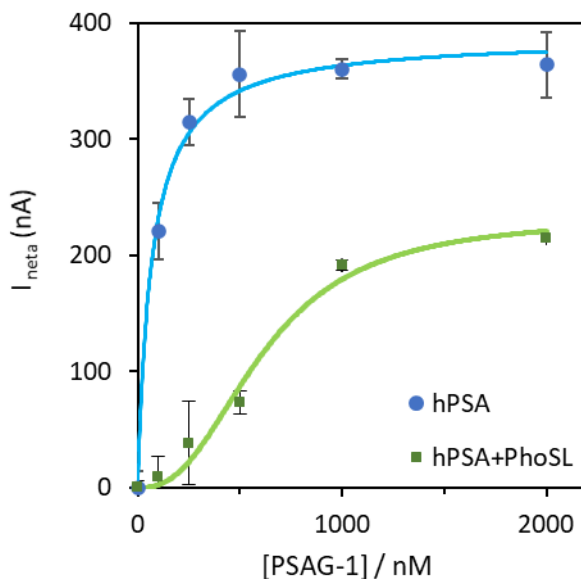


Figura 5.4: Curvas de enlace del aptámero PSAG-1 a la hPSA (azul) y la hPSA bloqueada con la lectina PhoSL (verde) en PBS-Na<sup>+</sup> obtenidas mediante medidas electroquímicas.

La estructura cristalina de la lectina unida a diferentes glicanos muestra que además de la fucosa  $\alpha$ 1-6 del núcleo también están involucrados en el enlace los azúcares N-acetilgalactosamina (azúcar 2) del cuerpo del glicano y los azúcares N-acetilgalactosamina (azúcar 5), galactosa (azúcar 6) y el ácido siálico terminal (azúcar 8) de la antena  $\alpha$ 1-6 del glicano<sup>142</sup>. Estos azúcares son también posibles sitios de unión del aptámero, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el ensayo de desglucosilación.

Por otra parte, se estudió la capacidad del aptámero PSAG-1 de reconocer a la fucosa libre mediante un ensayo de unión a la proteína inmovilizada sobre electrodos de oro en presencia de L-(-)-fucosa en disolución. Este ensayo competitivo, se realizó con concentraciones crecientes del aptámero en ausencia de L-(-)-fucosa y en presencia de dos concentraciones diferentes de la misma. Como puede observarse en la Figura 5.5, la presencia de fucosa en disolución produjo un pequeño desplazamiento en la curva de enlace a la hPSA, demostrando que el

aptámero PSAG-1 se une a la fucosa del núcleo. Este desplazamiento requiere concentraciones relativamente altas de fucosa en disolución, lo que es indicativo de también otros azúcares están involucrados en el reconocimiento de la glicoproteína, como se había observado en el ensayo de desglucosilación.

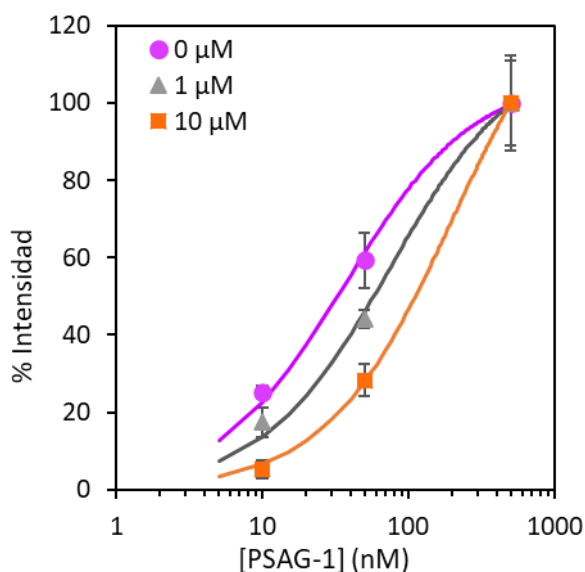


Figura 5.5: Enlace del aptámero PSAG-1 a la hPSA en ausencia (rosa) y en presencia de dos concentraciones diferentes de L-(-)-fucosa en disolución: 1 μM (gris) y 10 μM (naranja).

### 5.3.2 Estudio computacional del sitio de unión del aptámero PSA-1.

Los métodos de modelización computacional son útiles a la hora de predecir la estructura tridimensional de los aptámeros. Una vez obtenida esta y junto con la estructura tridimensional de la proteína (ver protocolos), es posible utilizar cálculos de *docking* para predecir cómo es la unión del aptámero a la proteína. El estudio del modelo del complejo formado permite además conocer las bases del aptámero y las zonas de la proteína involucradas en el reconocimiento.

El programa Mfold solamente proporcionó una posible estructura secundaria del aptámero PSA-1, con una energía libre de Gibbs de - 3.07

kcal/mol. A partir de esta estructura se construyó la estructura 3D del aptámero que se sometió a un protocolo de relajación mediante simulaciones de dinámica molecular. Las estructuras resultantes se agruparon en clústeres. Se encontró que los cuatro clústeres más poblados tienen una abundancia similar (18 %, 17 %, 15 % y 13 %) por lo que no es posible concretar cual de las cuatro estructuras es la más probable. En todas ellas se observó que el aptámero tiene poca estructura y adopta una conformación bastante abierta (Figura 5.6).

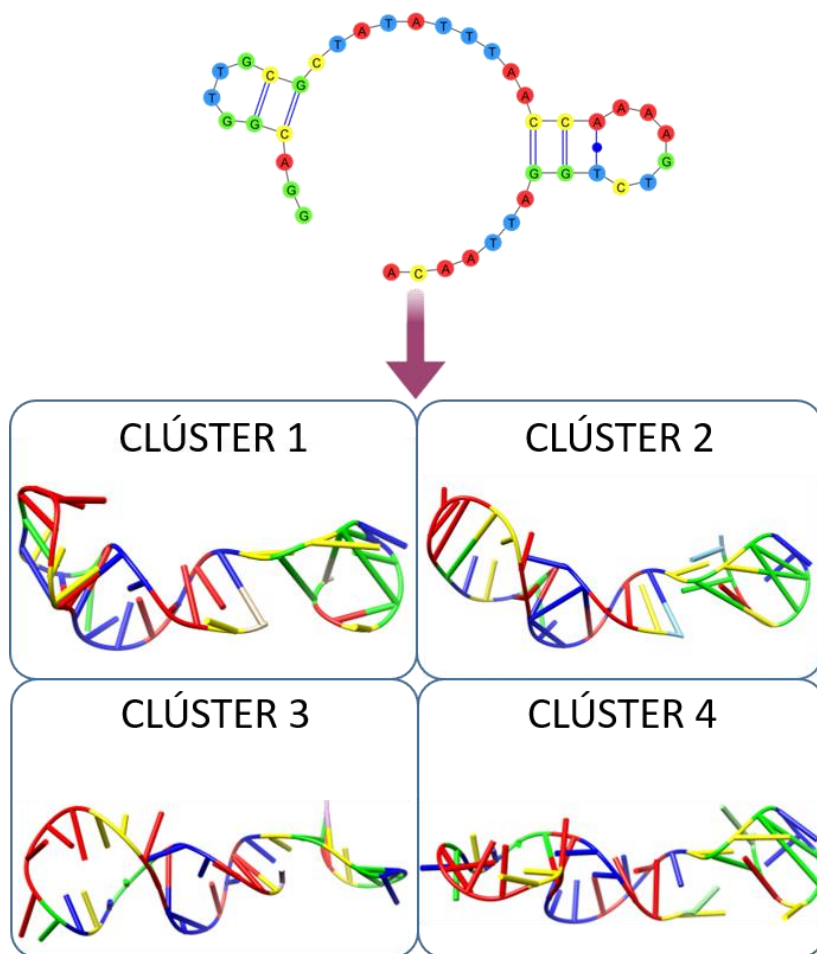
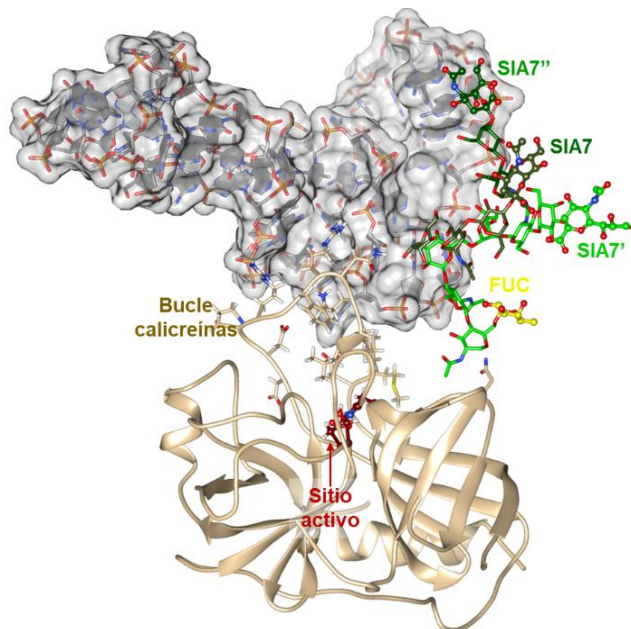


Figura 5.6: Estructura secundaria de partida del aptámero PSA-1, y las cuatro estructuras tridimensionales de los 4 clústeres más poblados.

Para obtener información sobre el modo de enlace entre el aptámero PSA-1 y la PSA se llevaron a cabo cálculos con Autodock en los que la proteína se trató como el receptor fijo y el aptámero como el ligando rígido. Como no se pudo establecer una sola estructura tridimensional del aptámero, se partió de cada una de las estructuras representativas de cada clúster y junto con la estructura tridimensional de la proteína obtenida mediante rayos-X (3QUM) se llevó a cabo el *docking*. Los resultados obtenidos no son concluyentes ya que hay distintos complejos próximos en energía ( $\leq 1$  kcal/mol) y es imposible predecir cual de ellos es el más favorable. Sin embargo, si se analizan dos de las conformaciones más favorables energéticamente, correspondientes a los complejos con la estructura tridimensional del aptámero del clúster 1 (-16.46 kcal/mol) y del clúster 4 (-15.64 kcal/mol), se observó que los ácidos siálicos intervienen en el reconocimiento, interaccionando con uno en el caso del aptámero del clúster 1 (Figura 5.7A) y con dos ácidos siálicos para el clúster 4 (Figura 5.7B). También tienen lugar contactos con algunos aminoácidos del bucle de las calicreínas. Además, en ninguno de ellos la fucosa interviene en el reconocimiento, quedando accesible al medio.

A



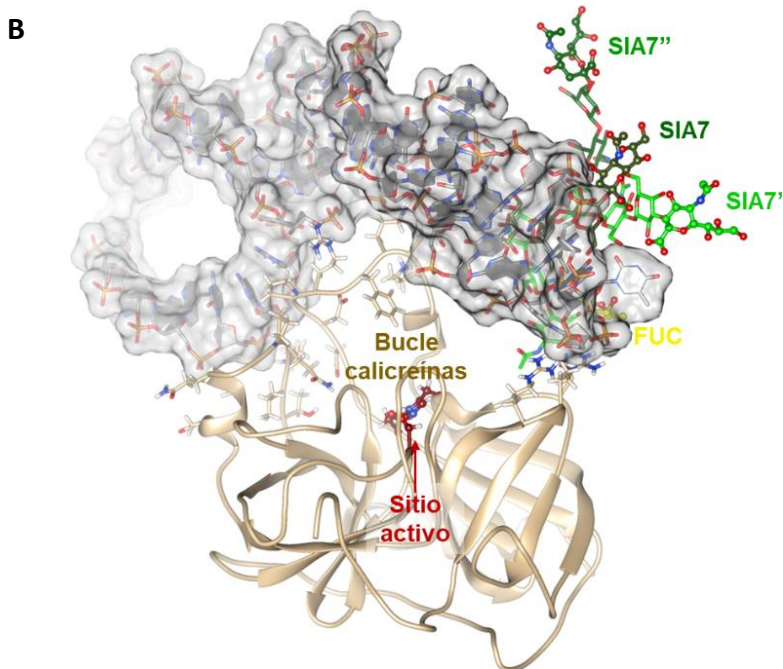


Figura 5.7: A) Representación del complejo más favorable energéticamente resultado de los cálculos de docking para la PSA y el aptámero PSA-1 (clúster 1). B) Representación del segundo complejo más favorable energéticamente resultado de los cálculos de docking para la PSA y el aptámero PSA-1 (clúster 4).

Para conocer cual es la estructura tridimensional más favorable del complejo aptámero-proteína mediante estudios de *docking* sería necesario refinar la estructura tridimensional del aptámero. A pesar de esto, los resultados preliminares obtenidos están en concordancia con lo observado experimentalmente, es decir el aptámero PSA-1 parece involucrar en el reconocimiento solo azúcares de la parte externa del glicano.

### 5.3.3 Estudio computacional del sitio de unión del aptámero PSAG-1.

#### 5.3.3.1 Predicción de la estructura tridimensional del aptámero PSAG-1

Como se ha indicado anteriormente, es necesario disponer de la estructura en tres dimensiones del aptámero para poder realizar a continuación el *docking* con una estructura en 3D de la proteína PSA.

Para ello se utilizó el mismo protocolo que el utilizado para el aptámero PSA-1. El programa Mfold proporcionó tres estructuras secundarias para el aptámero PSAG-1 con valores similares de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) de - 3.16, - 3.16 y - 2.72 kcal/mol. Con las tres estructuras secundarias (Figura 5.8) se construyeron tres estructuras 3D diferentes del aptámero que se sometieron al protocolo de relajación GaMD/MD.

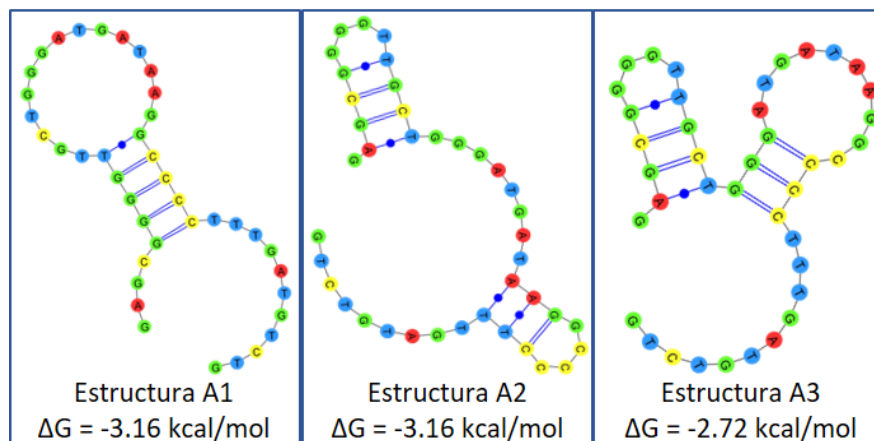


Figura 5.8: Estructuras secundarias del aptámero PSAG-1 obtenidas con el programa Mfold a 25 °C y con una fuerza iónica de 0.154 M.

Para discriminar entre los tres modelos, se calculó y promedió la energía de las distintas estructuras generadas a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular convencional, utilizando la técnica MM-PBSA (Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area). De este modo, se obtuvo que el modelo A1 es inequívocamente el más estable de los tres. La estructura secundaria de A1 (predicha con Mfold) se caracteriza por tener un bucle de horquilla (bases de la 13 a la 18 - TGGGAT-), una región helicoidal de seis bases constituida por emparejamientos canónicos, una pareja canónica aislada (C12 - G19) y tres parejas de bases no canónicas (T13 - T21, G14 - A17 y A17 - A20). El extremo final 3' de la cadena del aptámero muestra una conformación extendida monocatenaria. En la estructura tridimensional obtenida de las simulaciones se observa que la zona de los pares de bases canónicas/oscilantes se encuentra bien conservada durante la

simulación, pero la estructura helicoidal adyacente al bucle de horquilla se ve alterada tras la ruptura y formación de nuevos contactos de bases no canónicas. Los nuevos contactos que se forman son G14 - T21, G15 - A20 y G16 - G19. También se encontraron otras interacciones sin emparejamientos igualmente estabilizadas, especialmente en el caso de interacciones de  $\pi$ -apilamiento fuera del tronco, por ejemplo, entre los residuos 28 y 38 (Figura 5.9A). Estas interacciones son un compendio de las obtenidas para los tres clústeres representativos de la relajación mediante dinámica molecular de la estructura inicial (Figura 5.9B).

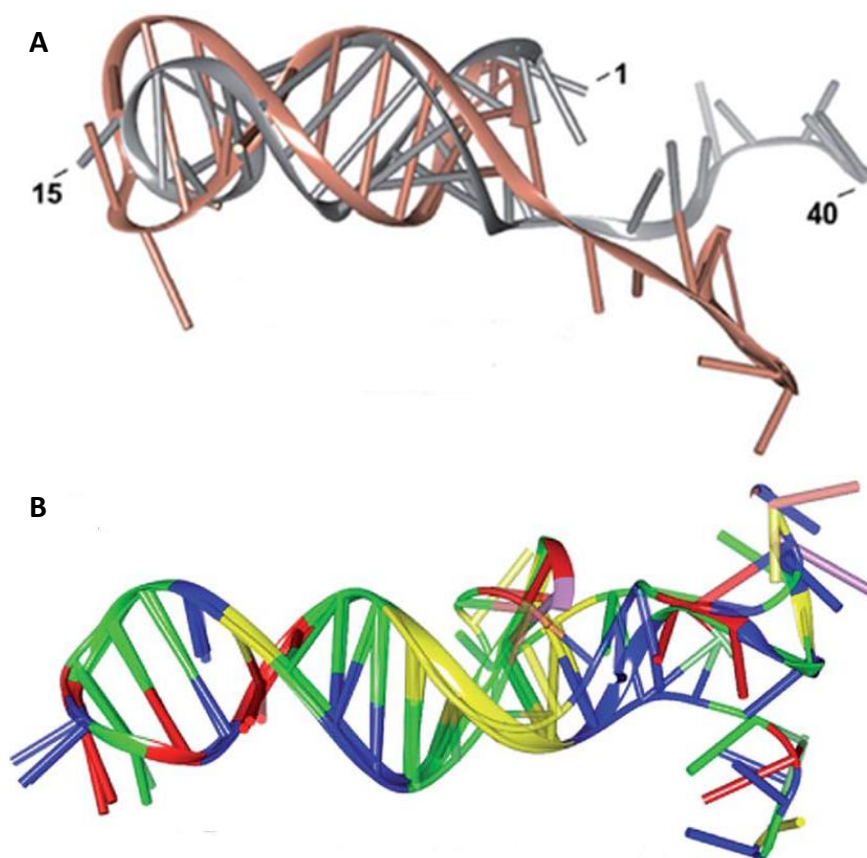
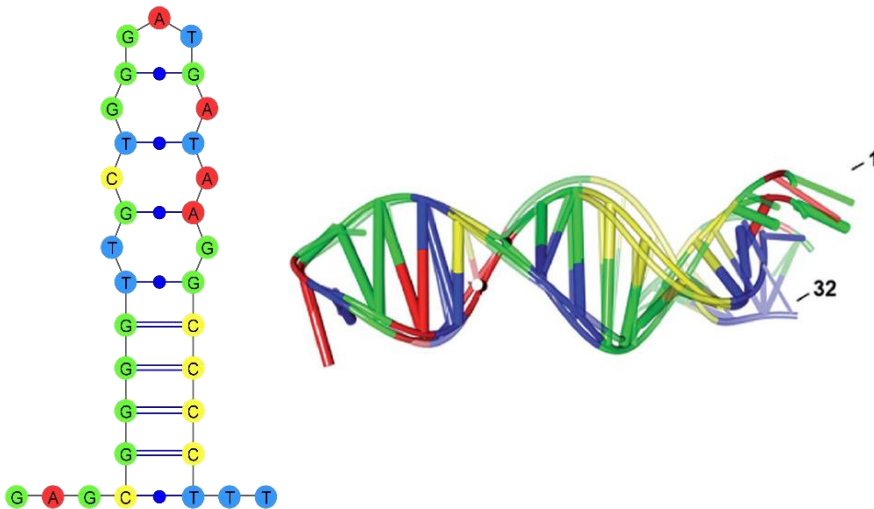


Figura 5.9: A) Comparación de la estructura tridimensional del aptámero PSAG-1 antes (gris) y después (dorado) de la relajación mediante MD. B) Apilamiento de tres estructuras tridimensional representativas de los clústeres obtenidos tras la relajación por MD.

Claramente los surcos mayor y menor de la superficie molecular del bucle de horquilla y la región helicoidal del aptámero podrían adaptarse, constituyendo los sitios de unión selectiva de la glicoproteína PSA.

De la observación de la estructura tridimensional del aptámero y para validar el modelo computacional propuesto, se diseñó un truncamiento del aptámero PSAG-1, en el que se elimina la región 3' monocatenaria terminal, que no parece que vaya a jugar un papel crucial en el reconocimiento. El nuevo aptámero truncado (T-PSAG-1) carece de las últimas 8 bases del aptámero PSAG-1, teniendo, por tanto, una longitud de 32 bases.

Para este aptámero truncado también se obtuvo la estructura secundaria y la estructura tridimensional, que se relajó de igual modo mediante MD, de la forma descrita anteriormente. Las simulaciones confirmaron que el bucle de horquilla y la región helicoidal son también estables en el aptámero truncado (Figura 5.10).



*Figura 5.10: Estructura secundaria (izquierda) y tridimensional (derecha) del aptámero truncado T-PSAG-1.*

En comparación con el aptámero PSAG-1, el truncado muestra el mismo patrón de contactos entre las bases en los mismos lugares a



excepción de algunos cambios que ocurren en el extremo superior del bucle de horquilla. Por ejemplo, los contactos entre las bases G14 - T21, G15 - A20 y G16 - G19 que aparecen en el PSAG-1 son remplazados por los contactos T13 - T21 y G15 - G21 en el T-PSAG-1. En consecuencia, el bucle de horquilla podría ser más sensible a los efectos de entorno mientras que la superficie de los surcos sobre la región helicoidal sería más rígida. Por consiguiente, las simulaciones realizadas avalan la hipótesis de que tanto el aptámero PSAG-1 como el aptámero truncado T-PSAG-1 podrían proporcionar complejos similares en el *docking* con la proteína PSA, facilitando las simulaciones computacionales.

Antes de realizar el *docking* entre el aptámero truncado y la PSA se comprobó empíricamente si este nuevo aptámero mantiene las características de enlace y selectividad hacia la PSA del aptámero completo.

#### 5.3.3.2 Caracterización del aptámero T-PSAG-1

Para validar el modelo de truncado propuesto para el aptámero PSAG-1 se sintetizó el aptámero T-PSAG-1 de 32 bases. Con el objetivo de obtener una curva de enlace de este nuevo aptámero a la hPSA y evaluar su selectividad frente a otras proteínas, se realizaron ensayos de unión con detección electroquímica similares a los descritos para el aptámero completo, empleando para ello el aptámero con una marca de fluoresceína en su extremo 5'.

Este aptámero truncado es capaz de reconocer con suficiente efectividad a la hPSA. En la figura 11 se muestra la curva de enlace obtenida para el T-PSAG-1 frente a hPSA inmovilizada sobre electrodos de oro en PBS-Na<sup>+</sup>. La cantidad de aptámero enlazada se representó como porcentaje de la señal obtenida para cada concentración de aptámero ensayada con respecto a la señal de saturación. El ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Langmuir permitió obtener una constante de disociación de  $121 \pm 25$  nM. Este valor es menos del doble

del valor obtenido para el PSAG-1, demostrando que el aptámero truncado es capaz de mantener una alta afinidad de enlace frente a la PSA glicosilada (Figura 5.11).

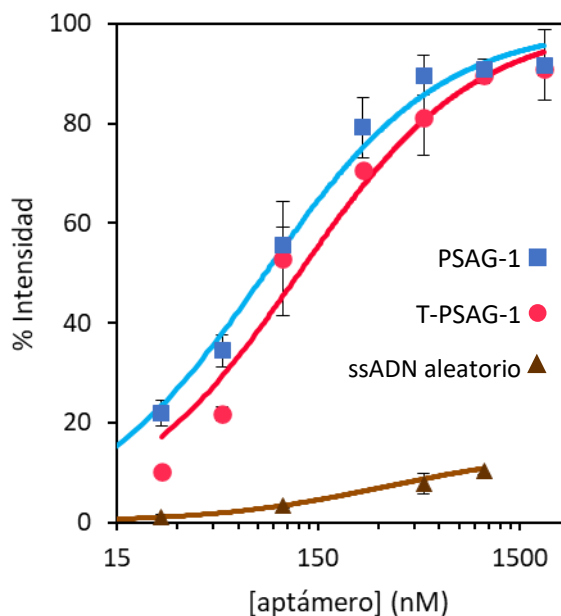


Figura 5.11: Comparación de la afinidad del aptámero truncado T-PSAG-1 (rojo) y PSAG-1 (azul) por la hPSA inmovilizada sobre electrodos de oro. Como control se utiliza una secuencia aleatorio de ssADN que no muestra enlace significativo a la hPSA (marrón).

A continuación, se estudió la selectividad del aptámero T-PSAG-1 frente a las proteínas rPSA y NGAL inmovilizadas sobre electrodos de oro. Estas proteínas se hicieron interaccionar con una disolución 500 nM del aptámero en PBS-Na<sup>+</sup>, expresándose la cantidad de aptámero enlazado en términos relativos como el porcentaje de señal obtenida respecto a la señal para la interacción del aptámero con la hPSA. Como se muestra en la Figura 5.12 se obtienen unos valores de  $19 \pm 6$  % para la interacción entre T-PSAG-1 y la rPSA y de  $23 \pm 3$  % para la NGAL, estadísticamente iguales a los valores de selectividad obtenidos con el aptámero completo (PSAG-1).

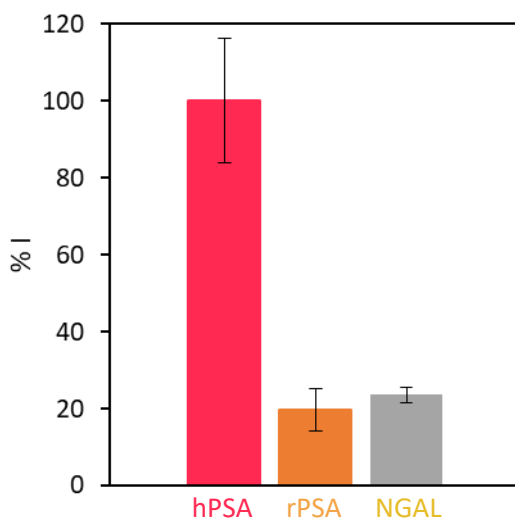


Figura 5.12: Selectividad del aptámero T-PSAG-1 frente a la rPSA (naranja) y a la NGAL (gris) en comparación con la respuesta obtenida para la hPSA (rojo).

En comparación con estos resultados, cuando se eliminaron de la secuencia completa de 40 bases del aptámero PSAG-1 algunas de las bases involucradas en el reconocimiento (parte del tronco) y se conservaron solamente los primeros 26 nucleótidos del extremo 5' del PSAG-1, se observó que esta nueva secuencia perdía por completo su capacidad de enlace selectivo a la hPSA, confirmando que la parte del tronco de la estructura del aptámero juega un papel crucial en la interacción.

Con estos experimentos se demostró que el aptámero T-PSAG-1 mantiene tanto la afinidad como la selectividad hacia la glicoproteína PSA con características comparables a las del PSAG-1. Por este motivo y con el fin de simplificar los cálculos computacionales se empleó el aptámero truncado para la realización del estudio de *docking* con la proteína.

### 5.3.3.3 Modelización del complejo aptámero/proteína

Para obtener información sobre el modo de enlace entre el aptámero T-PSAG-1 y la hPSA se llevaron a cabo en primer lugar cálculos con Autodock en los que la proteína se trató como el receptor fijo y el aptámero como el ligando rígido. Del *docking* se obtuvieron un total de 500 poses que se agruparon en 35 clústeres y se relajaron en términos de minimización de energía. Las estructuras relajadas de los complejos obtenidos se clasificaron en función de la puntuación proporcionada por Autodock que estima la contribución de varias energías libres de enlace (electrostáticas, Van der Waals, puentes de hidrógeno y de solvatación). La energía libre de enlace resultante de los 35 clústeres está en el intervalo de -15.8 a -6.9 kcal/mol, observándose que el aptámero se une a la PSA a través de contactos muy persistentes.

En el complejo de *docking* más estable, el aptámero se une a la PSA manteniéndose alineado casi perpendicularmente al sitio activo de la hPSA. Esta orientación proporciona contactos favorables tanto entre el aptámero y la parte proteica como con el residuo de glicanos de la hPSA. Las simulaciones de dinámica molecular muestran que estos contactos son muy persistentes.

En las simulaciones realizadas, la estructura proteica de la PSA se mantiene estable mientras que la orientación relativa de los glicanos y la conformación interna de sus cadenas se ve alterada. Las antenas del glicano adoptan una forma más compacta que facilita la interacción con el aptámero y la proteína. Una de las antenas del glicano se acerca a la superficie de la proteína en la región circundante a la Asn69, con el ácido siálico terminal interaccionando de manera fluctuante con la Arg36 (según la numeración de los aminoácidos en el PDB). Las otras dos antenas del glicano interaccionan entre sí. En la estructura del aptámero T-PSAG-1, la región helicoidal se mantiene inalterada y está involucrada en la mayoría de las interacciones con la PSA. También se observa cierta plasticidad en la región del bucle de horquilla, en el que se están

formando y rompiendo contactos de pares de bases no canónicos a lo largo de la simulación.

Por una parte, los aminoácidos Arg95G, Asn95F y Lys95E de la cadena lateral de la región del bucle de calicreínas se unen mediante puentes de hidrógeno/interacciones electrostáticas con los grupos fosfato del esqueleto del aptámero, produciéndose las siguientes interacciones: Arg95G - C4, Arg95G - G5 y Lys95E - T32. Además, las cadenas laterales del bucle se acercan a las bases C4 y G5 dando lugar a la unión mediante puentes de sales entre la Arg95J y el grupo fosfato de la base T31. Otros aminoácidos del bucle de las calicreínas (Asp95, Met95A, Leu95D y Asn95F) también contribuyen al enlace del aptámero a través de contactos polares mediados por el agua y/o con interacciones de Van der Waals.

Por otro lado, el aptámero truncado está firmemente anclado a la región interna del cuerpo del glicano (Asn61-NAG1-NAG2-Man3-Man4-Man4') a través de puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals muy estables. Entre los contactos polares se encuentran las interacciones de los grupos hidroxilo de los azúcares tanto con los grupos fosfatos como con los grupos polares del surco principal del tallo del aptámero, produciéndose las siguientes interacciones: NAG1@O3H...OP2@G7, Man4'@O4H...OP2@G24, NAG2@O3H...N7@G8, Man3@O2H...O6@G7 y Man3@O4...HN4@C26. En particular, el azúcar fucosa que se encuentra en una posición central tiene una interacción estable de puente de hidrógeno (Fuc8@O3H...OP2@G6) e interacciones de Van der Waals con el anillo de azúcar de la base G6 (Figura 5.13).

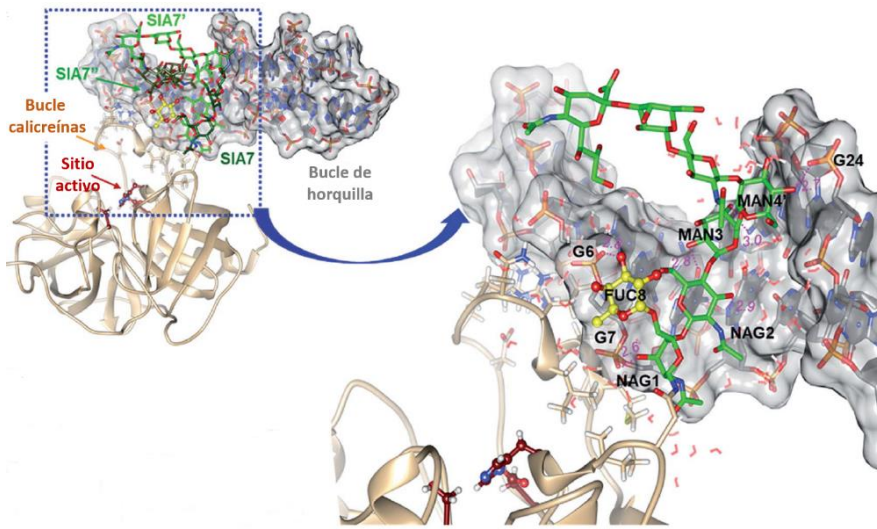


Figura 5.13: Representación de la unión del aptámero T-PSAG-1 a la proteína hPSA, en la que se resaltan los azúcares involucrados en la interacción.

Los contactos moleculares revelados en las simulaciones indican que todos los azúcares excepto los ácidos siálicos son importantes para la unión del aptámero. Los azúcares más internos, hasta la manosa 4 e incluyendo la fucosa del núcleo, juegan un papel directo en la unión al aptámero mediante contactos polares e interacciones de van der Waals. Y a pesar de que los azúcares externos N-acetilglucosamina y galactosa no interactúan con el aptámero, los contactos entre las antenas NGA5 - NAG5' y NAG5 - Gal6' contribuyen a estabilizar los glicanos en una conformación más favorable para la unión del aptámero. Estas observaciones están en concordancia con los resultados empíricos obtenidos en el estudio de desglicosilación.

En conclusión, el modelo computacional propuesto para la interacción entre la hPSA y el aptámero T-PSAG-1 muestra claramente un patrón de reconocimiento binario, estando involucrados varios residuos de la parte proteica y azúcares del glicano, entre los que se encuentra la fucosa  $\alpha$ 1-6 del núcleo.

## **CAPÍTULO 6**

### *Aptasensores electroquímicos para detectar la PSA glicosilada*





En el desarrollo de ensayos analíticos para la detección de la PSA con capacidad para diferenciar sus patrones de glicosilación es necesario disponer de receptores con alta afinidad y selectividad hacia el sitio de glicosilación de la proteína. Una vez obtenidos estos receptores es posible diseñar métodos de detección potencialmente útiles en el diagnóstico precoz del cáncer de próstata, que podrían mejorar la especificidad diagnóstica de los inmunoensayos para PSA que actualmente se usan en los laboratorios clínicos. En este capítulo se propone utilizar como receptores específicos para la PSA los aptámeros descritos en los capítulos 3 y 4, que están dirigidos hacia los glicanos de la proteína con diferentes características de afinidad y selectividad.

Se emplearon estos aptámeros en el diseño, construcción y validación de aptasensores electroquímicos con dos formatos diferentes: ensayos directos y tipo sándwich. A continuación, se exponen las características de respuesta de los aptasensores desarrollados, así como la evaluación de su potencial diagnóstico mediante el análisis de muestras de suero de pacientes con diferentes patologías.



## 6.1 Aptasensores con formato sándwich

### 6-1.1 Introducción

Al igual que los métodos inmunoquímicos de análisis o inmunoensayos, los aptaensayos se basan en el estudio del complejo que se forma entre el analito y un aptámero como resultado de la reacción de reconocimiento molecular entre ambos. La distribución del analito entre las formas enlazada y libre se relaciona cuantitativamente con su concentración total en la muestra. Esta simple observación constituye el principio general de los aptaensayos. Cuando la reacción de reconocimiento molecular se produce directamente sobre la superficie de un transductor se habla de aptasensores.

Para poner de manifiesto que se ha producido la reacción aptámero-analito y medir la distribución del analito entre las formas enlazada y libre se puede aprovechar algún cambio producido directamente por la reacción de reconocimiento (ensayos directos) o añadir al medio de reacción una cantidad fija (en concentración conocida) del analito o de un aptámero unido a una molécula indicadora que facilite la etapa final de medida. Este reactivo marcado se denomina trazador o marcador. Los aptasensores con marcadores suelen dar lugar a métodos de análisis más sensibles, por lo que fue el primer tipo de diseño que se exploró para evaluar el potencial diagnóstico de los aptámeros frente a PSA descritos en los capítulos anteriores.

Como moléculas indicadoras se han utilizado en general moléculas que puedan medirse con elevada sensibilidad y de forma relativamente sencilla. Además, deben poder unirse al aptámero manteniendo su actividad, sin que, idealmente, se alteren sus características de reconocimiento (afinidad y selectividad). Las enzimas son las moléculas más utilizadas con este fin, tanto en el desarrollo de ensayos electroquímicos como ópticos. Su papel como catalizadores hace posible una amplificación previa a la detección, permitiendo el desarrollo de

métodos analíticos con excelente sensibilidad. Para evitar que su gran tamaño molecular pueda afectar a la reacción aptámero-analito, las enzimas se incorporan habitualmente tras esta reacción a través de una interacción de afinidad (biotina-estreptavidina o antígeno-anticuerpo). En este trabajo se ha optado por emplear los aptámeros marcados con una molécula de 6-FAM, incorporando la enzima peroxidasa mediante un conjugado de esta enzima a un fragmento Fab de un anticuerpo anti-fluoresceína.

Se pueden desarrollar aptasensores con marcadores utilizando un formato de ensayo con reactivo limitante (competitivo) o un formato de ensayo con reactivo en exceso (no competitivo). En general, estos últimos dan lugar a mejores características analíticas, tanto en términos de sensibilidad como de selectividad, y son el formato de ensayo seleccionado en este trabajo.

En el formato de ensayo no competitivo tipo sándwich se utilizan como reactivos analíticos dos aptámeros distintos, capaces de unirse a la molécula diana a través de sitios de reconocimiento diferentes. El primer aptámero (aptámero de captura) enlaza todo el analito de la muestra. A continuación, se incorpora el segundo aptámero marcado (aptámero de detección), de manera que pueda detectarse fácilmente la cantidad de complejo aptámero-analito formado en la primera reacción. La cantidad de aptámero marcado capturado por el complejo, formando el sándwich, es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

El objetivo que se persigue es desarrollar aptasensores para detectar las fracciones de PSA en suero que muestren patrones de glicosilación alterados. Por esta razón, se propone utilizar en el diseño de aptasensores tipo sándwich un aptámero de captura que se enlace específicamente a la PSA y no a otras proteínas, permitiendo así capturar la PSA total de la muestra. Como aptámero de detección se propone utilizar los aptámeros seleccionados en esta Tesis Doctoral, que se enlazan a diferentes fracciones glicosiladas de la proteína.

En la presente sección se presentan los resultados obtenidos utilizando distintas combinaciones de los aptámeros descritos en los capítulos 3 y 4 junto con un aptámero ya descrito en la literatura para la PSA<sup>104</sup> (anti-PSA) para la construcción de aptasensores electroquímicos con formato sándwich empleando electrodos de oro y carbono como transductor.

## 6-1.2 Protocolos

### 6-1.2.1 Ensayo sándwich sobre electrodos de oro

Para la fabricación del sensor, se inmoviliza el aptámero de captura biotinilado sobre electrodos serigrafiados de oro a través de la interacción estreptavidina-biotina. En primer lugar, los electrodos se modifican covalentemente con estreptavidina a través de una monocapa autoensamblada (SAM) mixta de ácido 11-mercapto-1-undecanóico (MUA) y mercaptohexanol (MH) (protocolo en capítulo 3, sección 2.4). Una vez modificados los electrodos con estreptavidina y bloqueados con etanolamina, se incuban con una disolución 1  $\mu\text{M}$  del aptámero anti-PSA biotinilado durante 30 minutos en TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  pH 7.4).

El ensayo para detectar PSA tiene lugar en varias etapas. En primer lugar, se incuba la superficie sensora con diluciones seriadas del estándar de PSA durante 30 minutos. A continuación, se produce la interacción con el aptámero de detección (PSA-1) marcado con fluoresceína mediante incubación con una disolución 1  $\mu\text{M}$  en TBS durante 30 minutos. Después tiene lugar el marcaje enzimático con el conjugado Fab-anti-fluoresceína-peroxidasa en una concentración 0.5 U/mL preparado en disolución TBS - 0.5 % caseína, dejando que la interacción con la superficie tenga lugar durante 30 minutos. Finalmente se procede

a la detección electroquímica de la actividad enzimática inmovilizada mediante cronoamperometría del producto oxidado del TMB a -0.2 V, previa incubación con el sustrato de peroxidasa (TMB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 30 s (protocolo en sección 2.4 del capítulo 3).

Tras cada etapa, el sensor se lava con la disolución de la etapa siguiente y se seca con corriente de nitrógeno. En todas las etapas, se emplea un volumen de incubación de 10 µL y estas se realizan a temperatura ambiente. Los electrodos de referencia y contraelectrodos de los electrodos serigrafiados se bloquean con una capa transparente de esmalte y en consecuencia en las medidas electroquímicas se emplea un electrodo de referencia y un contraelectrodo externos. Cuando se utilizan a la vez un gran número de electrodos modificados, la etapa inicial se retrasa convenientemente para mantener un control estricto del tiempo.

#### *6-1.2.2 Ensayo sándwich sobre electrodos de carbono*

Para la fabricación del sensor, se enlaza el aptámero de captura biotinilado (btn-anti-PSA) a través de la interacción estreptavidina-biotina sobre electrodos serigrafiados de carbono. En primer, lugar se modifica el electrodo de trabajo con estreptavidina, incubando los electrodos limpios con una disolución de estreptavidina de 1 mg/mL durante toda la noche a 4 °C y en condiciones de atmósfera húmeda, para limitar la evaporación. A continuación, tiene lugar la unión del aptámero de captura haciendo interaccionar el electrodo de trabajo con una disolución 1 µM de btn-anti-PSA durante 30 min en PBS. Por último, se bloquea la superficie del electrodo con una disolución al 1 % de BSA en PBS durante 30 min.

En el análisis de PSA, se incuba el sensor con diluciones seriadas de PSA en PBS durante 30 minutos, y a continuación se lleva a cabo la interacción con el aptámero de detección marcado con fluoresceína (6FAM-PSAG-1) en PBS-K<sup>+</sup> durante 30 minutos. Después se realiza el

marcaje enzimático con una disolución 0.5 U/mL del conjugado Fab-antifluoresceína-peroxidasa preparado en PBS - caseína 0.5 % y la detección electroquímica mediante cronoamperometría a 0 V del producto oxidado del TMB.

Tras cada etapa, el electrodo se lava con la disolución de la etapa siguiente y se seca con corriente de nitrógeno. En cada etapa se emplea un volumen de 10  $\mu$ L y la incubación se realiza a temperatura ambiente.

### **6-1.2.3 Muestras de suero**

Se utilizaron muestras de suero de 35 hombres y una mezcla de suero de mujer, que fueron proporcionados por el laboratorio de análisis clínico del Hospital de Cabueñes (Gijón, España). Se seleccionaron muestras de suero de hombre con distintos niveles de PSA medidos mediante el ensayo ELISA quimioluminiscente que se emplea en el Hospital de Cabueñes. Estas muestras procedían de pacientes en consulta por diferentes patologías, con un diagnóstico final confirmado mediante biopsia de próstata. El suero de mujer se utilizó como control negativo de PSA, estando certificado por el método ELISA con un contenido de PSA < 0.01 ng/mL.

## **6-1.3 Resultados y discusión**

### **6-1.3.1 Selección y caracterización del aptámero de captura**

El aptasensor propuesto se basa en un ensayo tipo sándwich utilizando electrodos de oro como transductor y dos aptámeros, uno de captura y otro de detección. El fin de este sensor es la detección de los cambios en la glicosilación de la PSA que se producen en presencia de cáncer de forma que el ensayo sea específico de cáncer y no de cualquier alteración de la próstata. Con este propósito es necesario disponer de un receptor para la PSA total y otro para los glicanos. Entre los aptámeros

descritos en la literatura para PSA, se seleccionó el primero de ADN descrito para esta proteína, denominado anti-PSA y que en el momento de realización de la Tesis Doctoral era el aptámero más empleado en el diseño de aptaensayos para la detección de la PSA en suero humano. Se propone el empleo de este aptámero como aptámero de captura, del que se conoce que su afinidad está en el orden nM, pero se desconoce su capacidad de reconocer a los azúcares de la PSA, por lo que previamente a la realización del sensor es necesario caracterizar este aptámero.

El aptámero de captura (anti-PSA) fue seleccionado mediante un proceso SELEX tradicional frente a la PSA humana sin ningún intento para dirigir la selección hacia el glicano de la proteína<sup>104</sup>. No obstante, como no se encontró en la literatura información acerca de la parte de la molécula de PSA que participa en la interacción con este aptámero, se realizó un estudio de caracterización de su afinidad. Para ello se efectuaron medidas de SPR empleando discos de oro modificados tanto con PSA humana como recombinante (protocolo en sección 2.4 del capítulo 3).

Las superficies modificadas se hicieron interaccionar con concentraciones crecientes del aptámero. Como se observa en la Figura 6-1.1, los cambios en el ángulo de resonancia obtenidos con este aptámero son muy similares para la PSA humana y recombinante, demostrando que este aptámero reconoce la parte peptídica de la proteína. Además, el ajuste de las curvas obtenidas a la ecuación de Langmuir permitió estimar las constantes de disociación, muy similares para ambas proteínas, siendo de  $177 \pm 5$  nM para la PSA humana, y  $70 \pm 5$  nM para la recombinante.



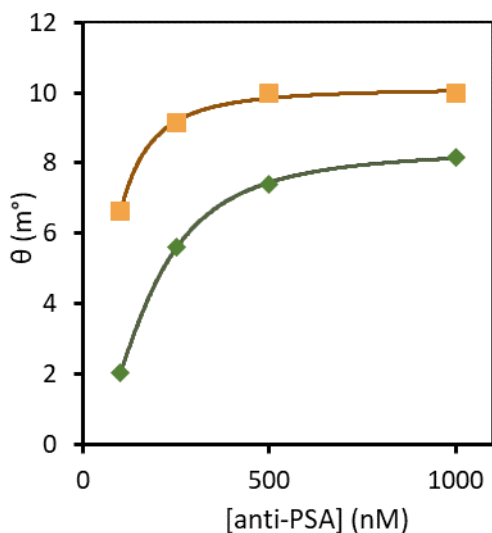


Figura 6-1.1: Curva de enlace del aptámero anti-PSA frente a la PSA humana (verde) y la PSA recombinante (naranja) obtenidas mediante medidas de SPR.

También se estimó la constante de afinidad mediante medidas con detección electroquímica, inmovilizando la PSA sobre electrodos de oro y haciéndola interactuar con concentraciones crecientes del aptámero anti-PSA marcado con fluoresceína. A medida que se aumentó la cantidad de aptámero se observó un incremento en la señal medida, que da lugar a una curva de enlace que se ajuste al modelo de Langmuir, estimándose una constante de disociación de  $229 \pm 25$  nM (Figura 6-1.2).

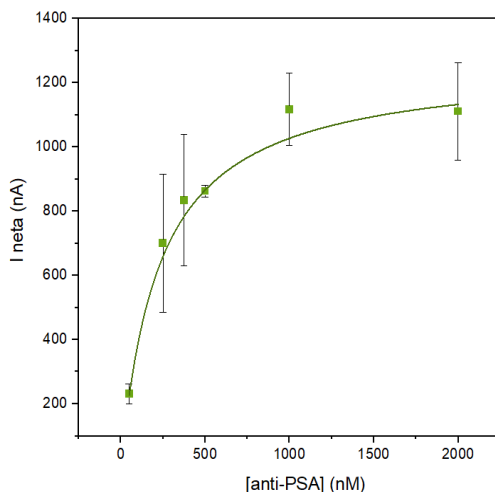


Figura 6-1.2: Curva de enlace del aptámero anti-PSA frente a la PSA humana obtenida mediante medidas electroquímicas y ajustada al modelo de Langmuir.

Por sus características de enlace a la PSA este aptámero es un excelente candidato para actuar como aptámero de captura en el ensayo sándwich. Además, otro punto importante en el diseño de sensores en formato sándwich basados en el empleo de aptámeros es la complementariedad entre las dos secuencias empleadas, que deberá ser lo menor posible para evitar hibridaciones no deseadas que aumentan las señales inespecíficas. Para los aptámeros anti-PSA y PSA-1 se estudió su complementariedad empleando el servidor web Mfold que estima la energía libre de la hibridación ( $\Delta G$ ) de las posibles combinaciones entre ellos, con las condiciones salinas del medio TBS. El dúplex formado por ambos aptámeros es poco estable energéticamente, teniendo una energía libre de -5.6 kcal/mol (Figura 6-1.3).

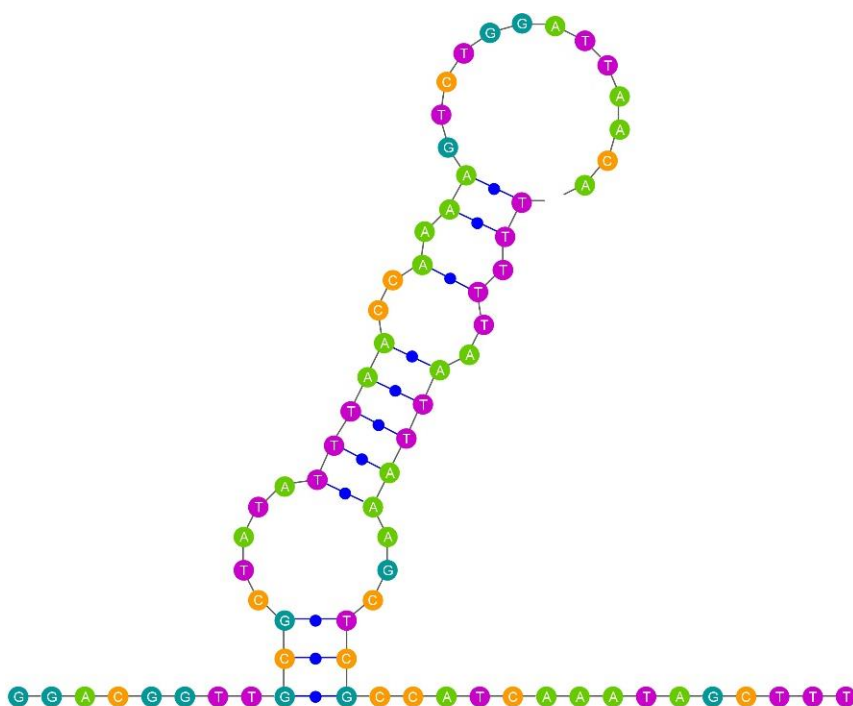


Figura 6-1.3: Representación de la hibridación entre los aptámero anti-PSA y PSA-1 obtenida con Mfold en el medio de TBS a 25 °C.

Por estas razones, se seleccionaron los aptámeros anti-PSA y PSA-1 en el diseño del ensayo sándwich para la cuantificación de PSA.

## 6-1.3.2 Ensayo sándwich empleando el aptámero PSA-1

## 6-1.3.2.1 Caracterización del aptasensor

Para la construcción del sensor se inmovilizó covalentemente el aptámero anti-PSA marcado con biotina a la superficie de electrodos de oro modificados con estreptavidina. Tras la interacción con concentraciones crecientes de PSA, se empleó el aptámero PSA-1 marcado con fluoresceína como aptámero de detección y se llevó a cabo la medida cronoamperométrica tras el marcaje enzimático (Figura 6-1.4).

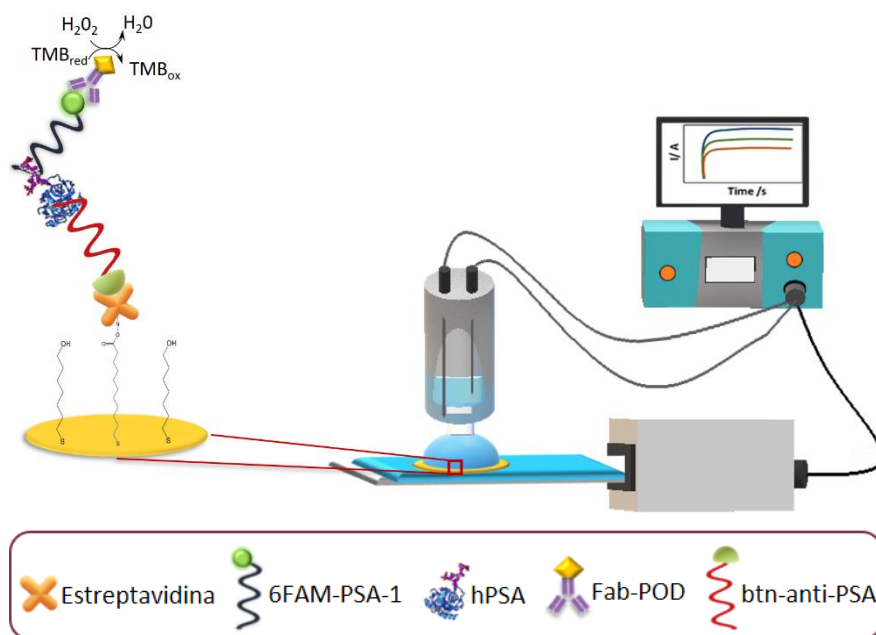


Figura 6-1.4: Esquema del ensayo sándwich realizado sobre electrodos de oro.

Para la realización de este ensayo con aptámeros es importante mantener las condiciones similares al proceso de selección. En este caso, el medio de interacción óptimo del aptámero PSA-1 es diferente al medio en el que se seleccionó el aptámero anti-PSA, lo que podría ser un inconveniente debido a la susceptibilidad de los aptámeros a la variabilidad del medio. Sin embargo, estudios preliminares de unión del aptámero PSA-1 a la PSA inmovilizada sobre electrodos de oro en TBS

muestran que el aptámero mantiene la afinidad por la proteína en este medio. Para la interacción de una disolución 500 nM del aptámero PSA-1 con la proteína se obtienen señales netas de  $779 \pm 133$  nA y  $1570 \pm 415$  nA, en PBS y TBS respectivamente, lo que demuestra la buena tolerancia del aptámero obtenido en esta Tesis a la variación de las condiciones de interacción. A la vista de los resultados se decidió utilizar el medio TBS, el óptimo para el aptámero anti-PSA, para maximizar la capacidad de captura de la PSA.

A continuación, se evaluó la respuesta del sensor a cantidades crecientes de PSA en TBS y en suero humano diluido 1:1 con TBS para establecer una correlación entre la señal obtenida y la concentración de PSA. Se optó por normalizar la intensidad de corriente para minimizar las fluctuaciones debido a pequeñas variaciones en las condiciones experimentales (fundamentalmente temperatura) y poder comparar las curvas obtenidas en días sucesivos, observándose que prácticamente se superponen, lo que demuestra la robustez de este método. Como se observa en la curva de calibrado promedio (Figura 6-1.5) se obtiene una respuesta creciente en el intervalo de concentraciones entre 0.66 ng/mL y 62.5 ng/mL cuando la interacción se realiza en TBS, y este se reduce cuando la interacción se realiza en suero (diluido 1:1 con TBS) siendo de 0.66 ng/mL a 25 ng/mL, aunque en ambos casos se cubre la denominada zona gris (4 - 10 ng/mL). La curva de calibrado en suero se ajusta a la ecuación de Langmuir ( $y = y_{\max} \cdot x / P + x$ ) con un valor de P de  $1.06 \pm 0.09$  ng/mL e  $y_{\max}$  de  $100 \pm 2$  % con una correlación de 0.998. El límite de detección del sensor es de 0.66 ng/mL de PSA, estimado como la concentración correspondiente a la señal que corresponde a tres veces la desviación estándar del blanco.

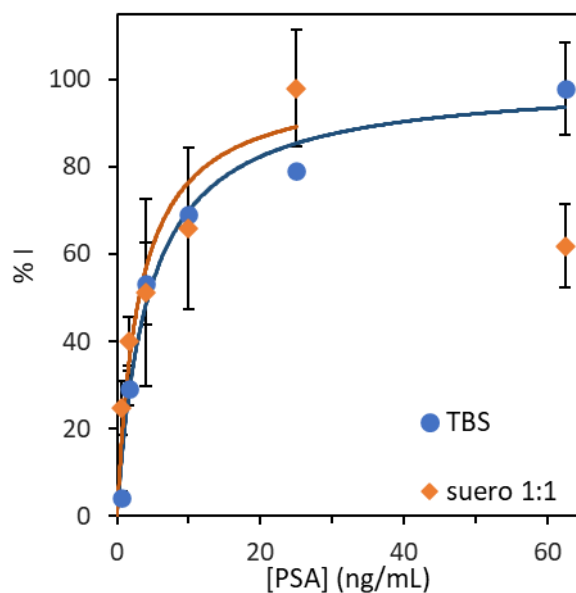


Figura 6-1.5: Curvas de calibrado del aptasensor con PSA realizadas en TBS (azul) y en suero diluido 1:1 con TBS (naranja).

Para concentraciones altas de PSA en suero (62.5 ng/mL) se observa una disminución de la señal, siendo este un fenómeno muy frecuente también en los inmunoensayos ELISA y que puede solventarse con la realización de diluciones (Figura 6-1.5).

También se evaluó la respuesta del sensor empleando diferentes patrones comerciales de PSA, debido a que se ha descrito la obtención de resultados discordantes en los laboratorios clínicos cuando se utilizan diferentes patrones de PSA en los métodos ELISA<sup>27,143</sup>. Con el fin de estudiar la robustez del ensayo desarrollado se evaluó la respuesta del sensor utilizando un material de referencia certificado BCR-613®, el cual se reconstituyó en agua y se diluyó con suero 1:1 en TBS para realizar la curva de calibración (Figura 6-1.6). La curva de calibrado obtenida, expresada en tanto por ciento de señal, no es significativamente distinta a la obtenida con el patrón no certificado de PSA (BBI solutions), demostrando las prometedoras características del sensor para aplicaciones clínicas.

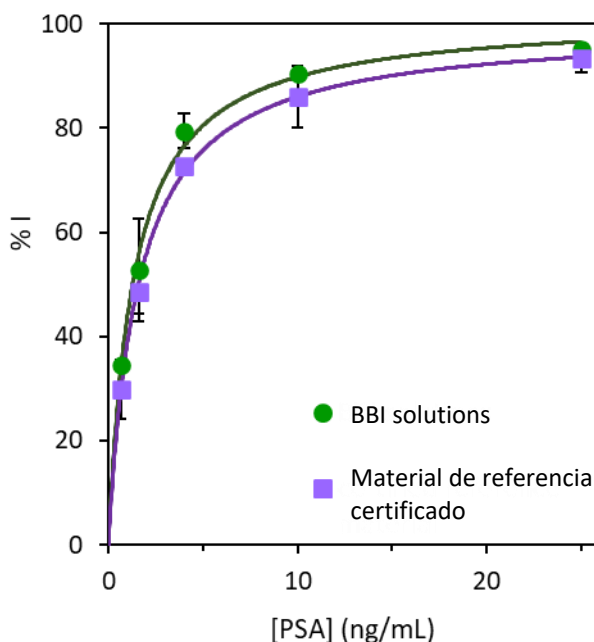


Figura 6-1.6: Comparación de las curvas de calibrado obtenidas empleando dos estándares distintos de PSA.

El aptasensor desarrollado muestra características analíticas similares e incluso superiores a las del único sensor tipo sándwich descrito en la literatura para la cuantificación de la PSA glicosilada. Este sensor emplea como elemento de captura el aptámero anti-PSA y como reactivo de detección una lectina, presentando un intervalo de trabajo entre 3 y 50 ng/mL de fPSA glicosilada y un límite de detección para la fPSA glicosilada de 3 ng/mL. Se demuestra así que el empleo del aptámero seleccionado en el capítulo 3 mejora las características analíticas de los ensayos basados en lectinas para detectar la fracción glicosilada de la PSA<sup>112</sup>.

#### 6-1.3.2.2 Selectividad del ensayo sándwich

En un principio se evaluó la selectividad del sensor frente a la PSA recombinante (no glicosilada) y a la NGAL (una glicoproteína con patrón de glicosilación similar a PSA) a una concentración de 25 ng/mL en suero humano diluido 1:1 con TBS. En ambos casos, la señal obtenida es

significativamente menor que la obtenida para la misma concentración de PSA (Figura 6-1.7).

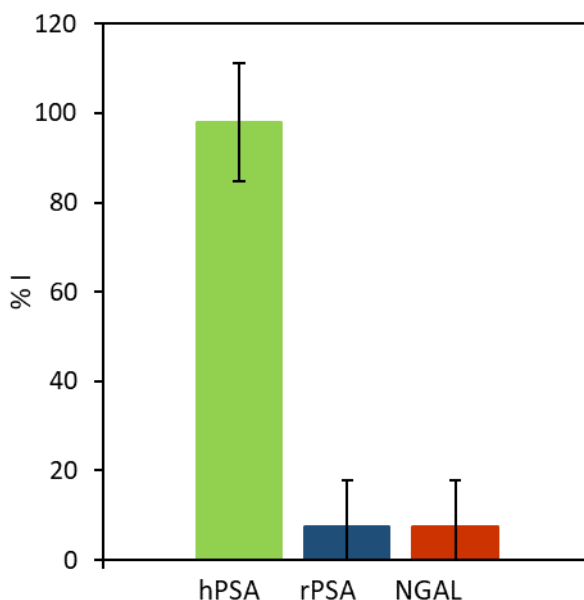


Figura 6-1.7: Respuesta del sensor a 25 ng/mL de PSA (verde), rPSA (azul) y NGAL (naranja).

A continuación, se diseñó un estudio de selectividad con un espectro de analitos más amplio, analizando dos disoluciones control utilizadas rutinariamente en los hospitales para verificar el ensayo ELISA (la composición se especifica en el anexo A1). Estas disoluciones contienen 92 analitos diferentes incluyendo la PSA total y la PSA libre a dos niveles de concentración. El control liofilizado se reconstituyó en agua, quedando en una matriz de suero y a continuación se diluyó 1:1 con TBS, y se analizó con el sensor.

Los resultados obtenidos, resumidos en la Tabla 6-1.1, muestran que el sensor proporciona una concentración de PSA que concuerda con los valores del control para la PSA total, indicando que el aptámero de captura atrapa tanto a la PSA libre como a la complejada, y que el aptámero de detección es capaz de unirse a ambas. Además, estos

resultados demuestran que el sensor no presenta interferencias significativas en presencia de una amplia variedad de moléculas en concentraciones fisiológicas.

Tabla 6-1.1: Selectividad del ensayo sándwich. Comparación de los valores obtenidos con el aptasensor y los certificados por BIO-RAD.

Control	Concentración encontrada	Concentración BIO-RAD control	
		fPSA	tPSA
Nivel 2	1.9 ± 0.4 ng/mL	1.06 ± 0.05 ng/mL	1.9 ± 0.1 ng/mL
Nivel 3	14 ± 3 ng/mL	9.7 ± 0.5 ng/mL	15.5 ± 0.9 ng/mL

#### 6-1.3.2.3 Análisis de PSA en muestras de suero

Para evaluar la aplicación del sensor al diagnóstico clínico, este se utilizó para analizar la concentración de PSA en 34 muestras de suero con diferentes niveles de PSA total y provenientes de pacientes con distintas patologías. Las muestras fueron proporcionadas por el Laboratorio Central del Hospital de Cabueñes y también fueron analizadas en el mismo utilizando el ensayo ELISA automático ADVIA Centaur® (Siemens) para la cuantificación de PSA total. La concordancia entre los valores obtenidos mediante el sensor y el método ELISA se muestra en la Figura 6-1.8, excluyendo de la gráfica las muestras con valores por debajo del límite de detección del ELISA, (muestras 1-5 Tabla 6-3.1) y el valor más elevado para mayor claridad.



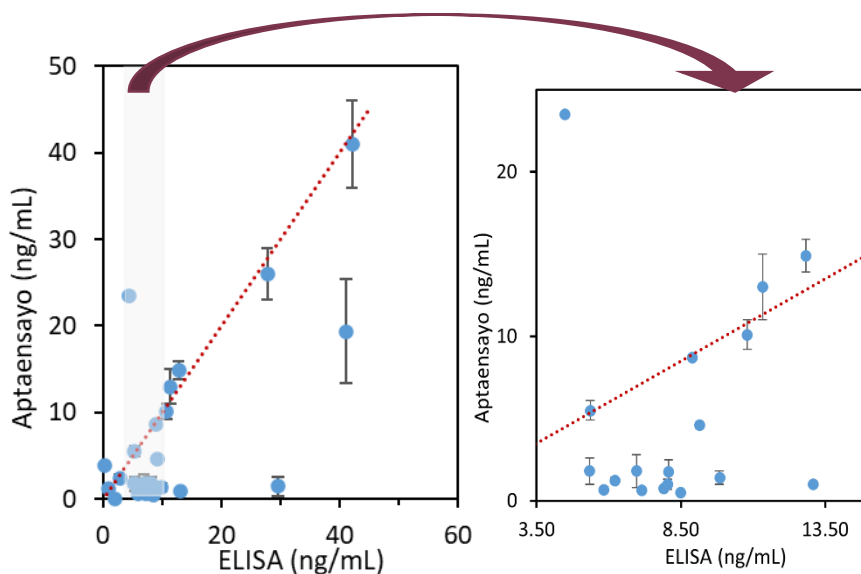


Figura 6-1.8: (Izquierda) Correlación entre los niveles de PSA obtenidos con el aptasensayo y el método ELISA. (Derecha) Ampliación de las muestras de la zona gris.

Los resultados proporcionados por el sensor para las muestras analizadas concuerdan en un 50 % con los obtenidos mediante el método ELISA. Las diferencias observadas pueden presumiblemente relacionarse con diferencias en las estructuras de los glicanos de la PSA de las muestras analizadas. Dentro de los 17 valores discordantes, en quince de ellos el aptasensor proporciona una concentración de PSA menor que con el ensayo ELISA, lo que apunta a que con el aptámero se está midiendo una fracción de la PSA total medida con el ELISA. Esto puede ser debido a que la concentración de PSA total en suero no solamente se eleva en hombres con cáncer de próstata si no también en aquellos que padecen hiperplasia benigna de próstata o prostatitis, pero con patrones de glicosilación diferentes.

Los valores discordantes se analizaron con más detalle teniendo en cuenta la patología diagnosticada a cada paciente. Once de las muestras discordantes para las que el ELISA proporciona una concentración mayor que el aptasensor corresponden a muestras que dieron un falso positivo

con el método ELISA, mientras que el aptasensor las clasifica correctamente con valores por debajo de la zona gris. Otro caso discordante se corresponde con un paciente con cáncer de próstata clasificado correctamente por ambos métodos, pero con valores muy diferentes 19.4 ng/mL con el aptasensor y 41.1 ng/mL con el ELISA. Sin embargo, en otra muestra ambos métodos clasifican erróneamente al paciente, aunque el aptasensor muestra un valor cercano al de corte (4.6 ng/mL vs 9.15 ng/mL. Otro valor discordante corresponde a un valor de PSA cercano al límite de detección del método ELISA y que es indetectable por el aptasensor. Para otro paciente, el aptasensor proporciona un valor menor que el ELISA pero clasificando erróneamente al paciente ya que este padece cáncer de próstata (1.8 ng/mL con el aptasensor vs. 5.34 ng/mL con el ELISA).

Entre los valores discordantes con valores inferiores por el ensayo ELISA encontramos un paciente sin cáncer clasificado correctamente por ambos métodos aunque el valor del aptasensor se aproxima al valor de corte (3.86 ng/mL vs 0.37 ng/mL) y a un paciente con prostatitis que el ELISA clasifica en la zona gris y el aptasensor lo clasifica incorrectamente con un valor elevado de PSA (4.48 ng/mL vs. 23.5 ng/mL). Meses después este paciente fue diagnosticado de cáncer de próstata, lo que podría interpretarse como una detección temprana de cáncer con el sensor. Sin embargo, esta afirmación debe tomarse con cuidado.

Estos resultados apuntan a que el nuevo ensayo basado en aptámeros puede mejorar la especificidad en el diagnóstico de cáncer con respecto al método ELISA utilizado en la actualidad en los hospitales, proporcionando un menor número de falsos positivos y, por tanto, de biopsias innecesarias. Es importante destacar que el número de muestras analizadas es pequeño pero los resultados muestran el gran potencial que tiene el sensor desarrollado para mejorar la especificidad de los ensayos para la detección de PSA.

### 3.3 Ensayo sándwich empleando el aptámero PSAG-1

También se ha explorado el uso del aptámero PSAG-1 seleccionado en el capítulo 4 como aptámero de detección en un ensayo tipo sándwich. Como su sitio de enlace a la proteína es diferente al del aptámero PSA-1, la comparación de los resultados obtenidos en ensayos similares podría mejorar la utilidad clínica.

Al igual que para el formato anterior, se utilizó el aptámero anti-PSA como aptámero de captura. Sin embargo, en este formato se emplearon electrodos serigrafados de carbono en vez de electrodos de oro para la construcción del sensor, con el fin de acortar el tiempo de preparación de la fase sensora. Para ello se inmovilizó covalentemente el aptámero de captura sobre electrodos de carbono sobre los que se adsorbió estreptavidina. Tras la interacción con concentraciones crecientes de PSA, se empleó el aptámero PSAG-1 marcado con fluoresceína como aptámero de detección y se llevó a cabo la medida cronoamperométrica a 0 V.

En primer lugar, se evaluó la respuesta del sensor a concentraciones crecientes de PSA preparadas en PBS-K<sup>+</sup> o en suero diluido 1:1 con la misma disolución. En ambos medios se obtiene una intensidad de corriente creciente en el intervalo de concentraciones de 1.6 ng/mL a 62.5 ng/mL en PBS-K<sup>+</sup>, y de 1.6 ng/mL a 25 ng/mL cuando la interacción tiene lugar en suero 1:1 (Figura 6-1.9).

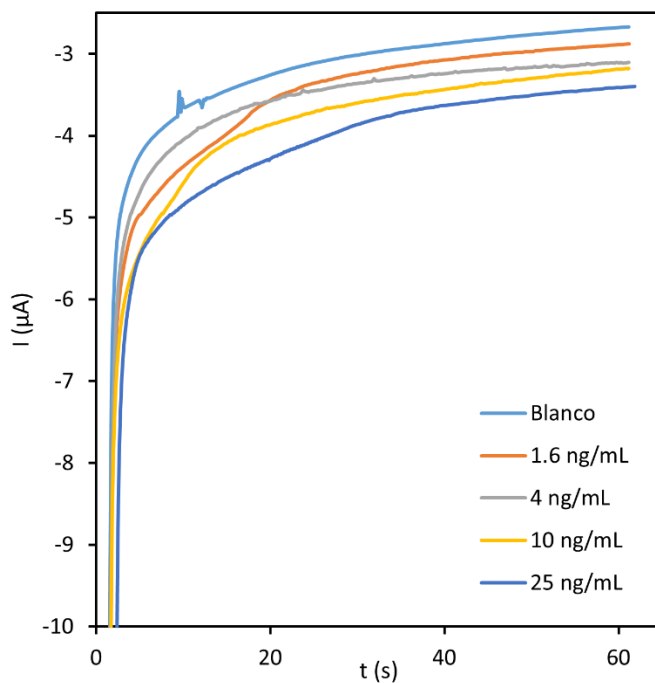


Figura 6-1.9: Cronoamperogramas obtenidos para concentraciones crecientes de hPSA en suero diluido 1:1 con PBS- $\text{K}^+$ .

Las curvas de calibrado normalizadas y expresadas en porcentaje respecto a la señal máxima en PBS y en suero son prácticamente iguales. La curva de calibrado en suero se ajusta a la ecuación de Langmuir ( $y = y_{\text{max}} \cdot x / (P + x)$ ) con un valor de P de  $6.2 \pm 0.8$  ng/mL e  $y_{\text{max}}$  de  $123 \pm 6$  % con una correlación de 0.997 (Figura 6-1.10).

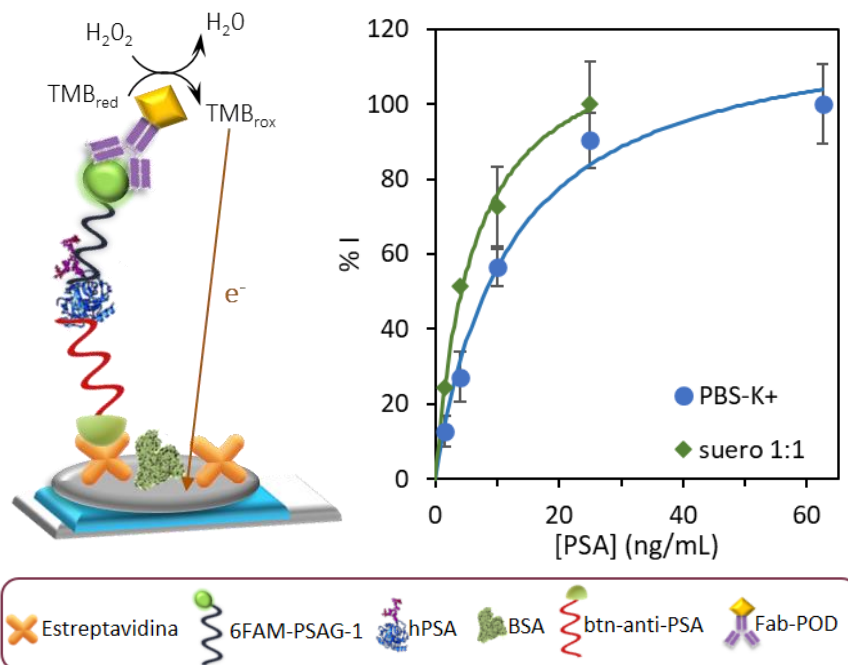


Figura 6-1.10: (Izquierda) Esquema del ensayo sándwich con los aptámero anti-PSA y PSAG-1 sobre electrodos de carbono. (Derecha) Curvas de calibrado obtenidas en PBS- $K^+$  (azul) y en suero diluido 1:1 (verde).

El sensor desarrollado se empleó en el análisis de la concentración de PSA en 4 muestras de suero previamente analizadas con el ensayo sándwich con el aptámero PSA-1. Se escogieron 2 con resultados concordantes con el ELISA y 2 discordantes. Una de las muestras concordantes correspondía a un paciente con cáncer de próstata (verdadero positivo) mientras que la otra pertenecía a un paciente con prostatitis (falso positivo). El ensayo con PSAG-1 corroboró el diagnóstico de cáncer y clasificó acertadamente como negativo el falso positivo obtenido tanto por ELISA como con el ensayo sándwich con PSA-1. Entre las muestras discordantes, una de ellas mostró un valor de PSA muy superior mediante el aptaensayo con PSA-1 pero mostró un valor inferior al de corte con PSAG-1, clasificándolo correctamente como negativo. La otra muestra discordante en la que el aptasensor de PSA-1 había clasificado correctamente al paciente como negativo mostró un valor dudoso ( $4.4 \pm 0.4$ ) ng/mL, puesto que teniendo en cuenta la

incertidumbre es difícil afirmar que sea negativo. Estos resultados apuntan a que el aptámero con reconocimiento binario puede discriminar mejor las enfermedades benignas de próstata del cáncer que el aptámero previamente descrito (PSA-1).

## 6.2 Aptasensor con formato directo

### 6-2.1 Introducción

Como se ha observado en la sección anterior, los resultados del análisis mediante los aptasensores tipo sándwich muestran que la medida de la PSA glicosilada puede mejorar la especificidad de los métodos actuales de diagnóstico del cáncer de próstata. La detección de los cambios en los glicanos de la PSA puede ser por tanto un biomarcador más específico para el diagnóstico del cáncer de próstata que la concentración total de la PSA en sangre, reduciendo el número de falsos positivos y la realización de biopsias innecesarias.

Antecedentes con otras proteínas, como la  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) avalan esta hipótesis. Esta proteína es también una glicoproteína y su concentración en suero se ve elevada en presencia de cáncer hepatocelular, pero al igual que para la PSA, la concentración también se eleva por enfermedades benignas del hígado, haciendo que la concentración total de esta proteína no sea un buen marcador y dé lugar a un elevado número de falsos positivos. Sin embargo, se descubrió que en presencia del cáncer se producen cambios en la fucosilación de la AFP y que la medida de estos cambios mediante la lectina *Lens culinaria* permite un diagnóstico más fiable del cáncer hepatocelular. En la actualidad ya se está empleando con éxito un test para la medida de la relación entre la fracción de la AFP reactiva a la lectina *Lens culinaria*, denominada AFP-L3, y la AFP total en una muestra<sup>144</sup>. Este test ha sido aprobado por la FDA en 2005 para su uso clínico como biomarcador del riesgo de padecer cáncer hepatocelular y no así para su diagnóstico<sup>145</sup>. Es importante resaltar que la FDA nunca llegó a aprobar la cuantificación de la proteína total AFP como biomarcador de cáncer<sup>146</sup>.

En vista del éxito del diagnóstico del cáncer hepatocelular a partir de la medida de los cambios en la glicosilación de la AFP y los resultados obtenidos en el análisis de las muestras por los aptasensayos tipo

sándwich de la sección anterior se propone la medida de un índice de glicanos de la PSA para el diagnóstico del cáncer de próstata. Este índice de glicanos reflejará los cambios en los glicanos de la PSA mediante la medida de la fracción reactiva al aptámero PSAG-1 con respecto a la PSA total en una muestra de suero.

Con este fin se propone el diseño de un ensayo basado en aptámeros para la medida de la PSA total y la PSA glicosilada en una muestra. Se propone un formato directo, en el que el aptámero se encuentra inmovilizado directamente sobre el transductor y el evento de reconocimiento aptámero-proteína produce un cambio en la superficie que da lugar a una señal que se relaciona con la cantidad de proteína atrapada por el aptámero.

Como método de detección se propone el uso de la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), concretamente de impedancia faradaica, porque es una técnica muy sensible, que no requiere el marcaje de los aptámeros y que ha sido ampliamente utilizada como sistema de detección en la construcción de ensayos basados en aptámeros o anticuerpos para la detección de proteínas. La espectroscopía de impedancia faradaica es muy sensible a cambios producidos en la interfase electrodo/electrolito como pueden ser los eventos de reconocimiento molecular en superficie, relacionando el cambio producido en la resistencia a la transferencia de carga con la cantidad de proteína atrapada por el aptámero<sup>147,148</sup>. Además, esta técnica ya ha sido empleada con éxito para el diseño de aptasensores impedimétricos para la detección de la PSA<sup>149,150</sup>.

En el ensayo propuesto se emplearán electrodos de oro nanoestructurados con nanopartículas de oro (AuNPs). Estas se emplean en el diseño de sensores por su excelente biocompatibilidad, baja toxicidad y sus propiedades catalíticas y conductoras, que dan lugar a una amplificación de la señal eléctrica resultante. Además, la respuesta del biosensor se puede ver incrementada debido al aumento de la



relación área/volumen que hace que se puedan unir a la superficie sensora un mayor número de receptores<sup>151,152</sup>.

En la presente sección se presenta una plataforma dual impedimétrica, con dos sensores nanoestructurados con AuNPs y modificados con los aptámeros PSAG-1 y anti-PSA, para la detección de la fracción de PSA glicosilada reactiva al aptámero PSAG-1 y de la PSA total, respectivamente, presentes en una muestra de forma simultánea. Aunque se dispone de dos aptámeros para detectar una fracción glicosilada de la PSA (PSA-1 o PSAG-1), se emplea el aptámero PSAG-1 por estar dirigido contra la zona donde se ubica la fucosa del núcleo, ya que se han descrito variaciones en el porcentaje de fucosa entre la proteína normal y la aberrante<sup>66,43</sup>, y la excelente selectividad frente a otras glicoproteínas.

## 6-2.2 Protocolos

### 6-2.2.1 Fabricación de los electrodos de oro evaporados

Los electrodos de trabajo de oro se fabricaron en el laboratorio mediante evaporación térmica sobre portaobjetos de vidrio. En primer lugar, se limpiaron los portaobjetos sumergiéndolos en una disolución de  $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2$  5:1:1 durante 30 minutos. A continuación, se limpiaron de forma secuencial con acetona, isopropanol y agua, y se secaron con nitrógeno. Por último, se limpiaron con plasma de oxígeno a una presión de 0.2 mbar y un voltaje de 10 mV durante 10 minutos.

Antes de llevar a cabo la evaporación térmica, las perlas de oro y cromo de un tamaño entre 1 y 3 mm se limpiaron con acetona e isopropanol y se depositaron sobre los portaobjetos de vidrio con una máscara para definir la forma del electrodo de trabajo (círculo de 4 mm de diámetro). En primer lugar, se creó una capa de adhesión de 10 nm de cromo y a continuación se depositó una capa de oro 100 nm, siendo

evaporadas secuencialmente empleando el evaporador térmico BOC Edwards.

Una vez fabricados los electrodos de oro, se limpiaron 4 o 5 veces con vapor de acetona y con UV-ozono durante 15 minutos antes de utilizarlos (Figura 6-2.1).

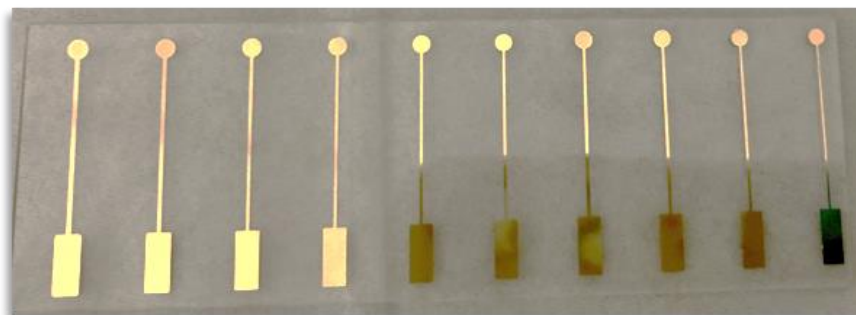


Figura 6-2.1: Electrodos de oro obtenidos mediante evaporación térmica sobre vidrio

#### 6-2.2.2 Fabricación del aptasensor

Los sensores impedimétricos se fabricaron empleando un protocolo previamente establecido<sup>153</sup>. En primer lugar, los electrodos de oro se nanoestructuraron con AuNPs. Con este propósito fue necesario formar una SAM de 11-amino-1-undecanotiol, incubando los electrodos durante toda la noche a 4 °C con 50  $\mu$ L de una disolución 1 mM de este compuesto preparada en etanol puro, en condiciones de atmósfera húmeda. A continuación, la superficie de los electrodos se limpió con etanol y se secó con nitrógeno y se llevó a cabo la etapa de bloqueo con una disolución 1 mM de 6- mercaptohexanol (MH) en etanol durante 1 hora a temperatura ambiente. Después los electrodos se limpiaron con etanol y agua y se secaron con nitrógeno. Por último, se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente con 50  $\mu$ L de una disolución de AuNPs de 20 nm, que se unen a los grupos amino de la SAM.

Sobre la nueva superficie de oro se formó una nueva SAM mixta de aptámero tiolado (anti-PSA o PSAG-1) y MH, incubando los electrodos con una disolución de aptámero/MH 1:100 en PBS-EIS (PBS 1× + 2.7 mM KCl, pH 7.4) durante 1 hora a temperatura ambiente. La concentración total de los tioles en la disolución fue 100  $\mu$ M. A continuación, los electrodos se lavaron con PBS-EIS y se incubaron en PBS-EIS durante 3 horas para estabilizar la SAM antes de realizar las medidas de impedancia.

#### **6-2.2.3 Detección de PSA**

A partir del patrón de PSA se prepararon mediante diluciones seriadas las disoluciones de PSA a emplear en el ensayo, en PBS-EIS o en suero diluido 1:5 con PBS-EIS. Para la detección de PSA con el sensor, 50  $\mu$ L de cada disolución se incubaron sobre los electrodos modificados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, los electrodos se lavaron con PBS-EIS y se registró el espectro de impedancia.

#### **6-2.2.4 Medidas de EIS**

Las medidas electroquímicas de impedancia se realizaron en una disolución 5 mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  y 5 mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  en PBS-EIS aplicando un potencial de 0.22 V vs. Ag|AgCl, el potencial formal del par redox medido mediante voltamperometría cíclica. La frecuencia se varió en el intervalo entre 100 kHz y 100 mHz con una amplitud de 0.01 V. Como electrodos de referencia y contraelectrodo se emplearon un electrodo externo de Ag|AgCl|KNO<sub>3</sub> y de platino, respectivamente.

#### **6-2.2.5 Medidas de SPR**

Los discos de oro del SPR se limpiaron con disolución piraña (70 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 2 minutos y a continuación se lavaron con agua y etanol, y se secaron con corriente de nitrógeno. Sobre la superficie de los discos se formó un monocapa autoensamblada mixta compuesta por el aptámero tiolado (anti-PSA o PSAG-1) y MH, incubando

el disco durante toda la noche a 4 °C con una mezcla del aptámero/MH 1:100, con una concentración total de tioles 100 μM en PBS-EIS. A continuación, se limpió el disco con PBS-EIS, se secó con nitrógeno y se colocó sobre un prisma semicilíndrico limpio, previamente cubierto con una capa de aceite con el mismo índice de refracción que el prisma ( $1.518 \pm 0.002$ ). Finalmente, se bloqueó la superficie con 50 μL de una disolución 1 mM de MH en PBS-EIS durante 1 hora.

La medida de la unión de la PSA a los aptámeros se realizó mediante las siguientes etapas: i) adquisición de la línea base en ambos canales mediante la inyección por triplicado de PBS-EIS durante 5 min; ii) etapa de asociación en la que se añadieron concentraciones crecientes de PSA en un canal y de NGAL en el canal de referencia, ambas preparadas en PBS-EIS y durante 10 minutos; iii) tras el lavado con PBS-EIS se registró la etapa de disociación durante 10 minutos también en PBS-EIS. La diferencia entre el ángulo de resonancia después de la etapa de disociación y el de la línea de base inicial se relaciona con la unión de la proteína al aptámero tras la sustracción de la señal inespecífica obtenida en el canal de referencia. A continuación, se realizó un nuevo ciclo con una concentración más alta de PSA sin regenerar la superficie.

Todas las inyecciones se realizaron automáticamente con el automuestreador y secuenciador del equipo ESPRIT. Durante cada inyección las disoluciones se agitaron de forma continua y todas ellas se realizaron a una temperatura termostatzada de  $25 \pm 1$  °C.

## 6-2.3 Resultados y discusión

### 6-2.3.1 Preparación y caracterización de la fase sensora.

Para obtener información sobre la fracción glicosilada de la PSA es necesario utilizar el aptámero PSAG-1 dirigido específicamente hacia el sitio de glicosilación de la proteína y compararla con el contenido de PSA

total, empleando el aptámero anti-PSA, que únicamente reconoce la fracción proteica. Ambos aptámeros se inmovilizaron a través de un grupo tiol sobre electrodos de oro nanoestructurados con AuNPs. Las nanopartículas de oro se unen a la superficie de oro a través de la interacción con el extremo amino de la SAM mixta de 11-amino-1-undecanotiol y mercaptohexanol como bloqueante para prevenir interacciones no específicas. El incremento del área activa que tiene lugar al nanoestructurar el electrodo permite aumentar la cantidad de aptámero inmovilizado no sólo por la mayor disponibilidad de superficie sino por la esfericidad que reduce las interacciones repulsivas entre las hebras de ADN polianiónicas y el impedimento estérico en el reconocimiento de la diana (Figura 6-2.2A).

Las diferentes etapas del proceso de fabricación se monitorizaron mediante medidas de espectroscopia de impedancia faradaica tras la realización de cada etapa (Figura 6-2.2B). La resistencia a la transferencia de carga ( $R_{ct}$ ) de los electrodos de oro sin modificar ( $759 \pm 20 \Omega$ ) decrece tras la formación de la primera monocapa ( $117 \pm 19 \Omega$ ), debido a las cargas positivas de los grupos amino que atraen electrostáticamente a las moléculas electroactivas en disolución. El recubrimiento con AuNPs provoca un incremento en el valor de  $R_{ct}$  ( $420 \pm 47 \Omega$ ) pero se mantiene en valores menores que el valor inicial de los electrodos de oro. Este resultado demuestra los beneficios de la creación de una superficie de oro nanoestructurada que conlleva un incremento en las propiedades de transferencia de electrones y en el área superficial favoreciendo las modificaciones posteriores. Finalmente, tras la inmovilización del aptámero se observa un incremento de  $R_{ct}$  ( $2864 \pm 155 \Omega$ ) debido a la repulsión electrostática de las moléculas electroactivas en disolución por las cargas negativas del oligonucleótido presente en la superficie del electrodo.

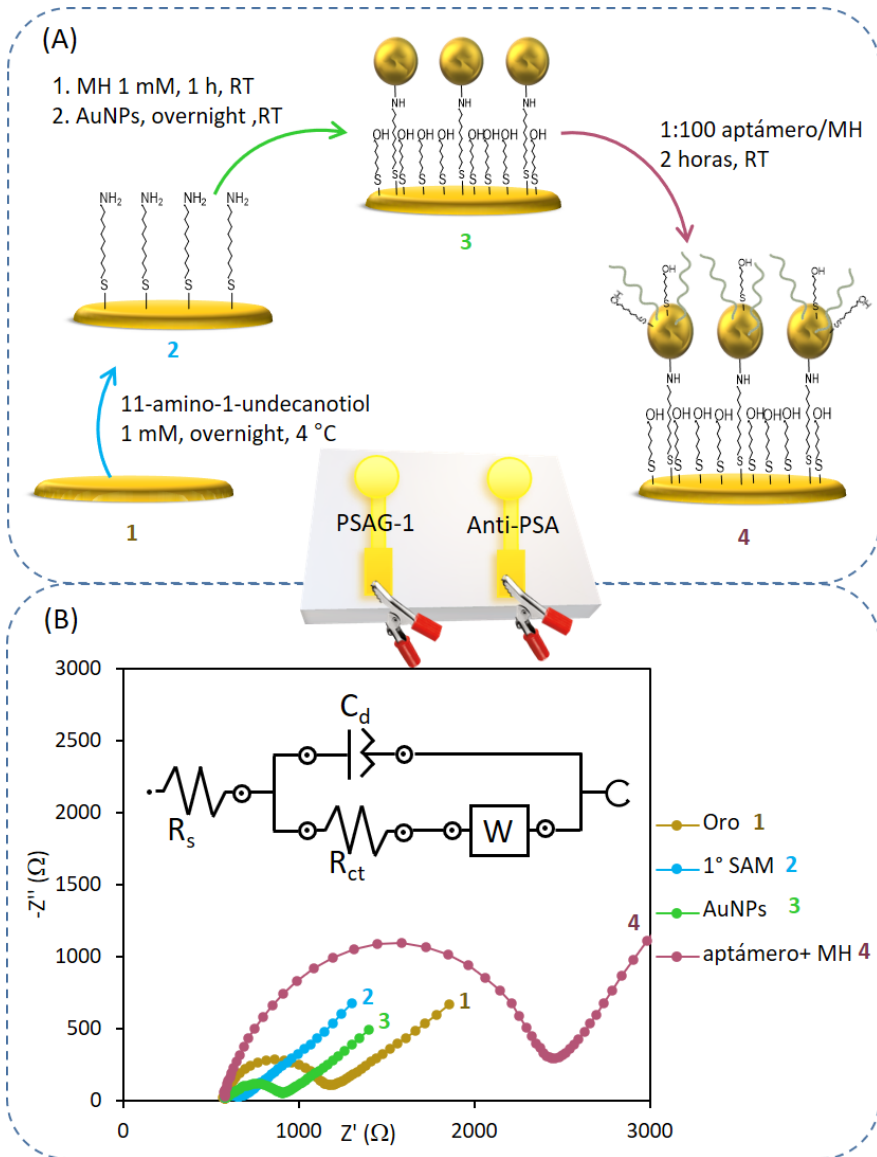


Figura 6-2.2: A) Etapas de la construcción de la plataforma dual impedimétrica basada en aptasensores. B) Diagramas de Nyquist obtenidos tras las distintas etapas del proceso de fabricación y el circuito equivalente de Randles al que se ajustaron.

Además, se comprobó la correcta nanoestructuración de la superficie mediante medidas de microscopía de fuerza atómica (AFM). Para ello se emplearon electrodos de oro con un tamaño de 10x10 mm y se realizaron las medidas antes y después de la inmovilización de las

nanopartículas de oro a través de la SAM. Como se observa en la Figura 6-2.3 la superficie inicial del electrodo de oro evaporado es bastante plana y poco rugosa. Tras la unión de las AuNPs se observa un cambio importante en la morfología de la superficie con un aumento de su rugosidad, lo que confirma una distribución relativamente homogénea de las nanopartículas a la superficie.

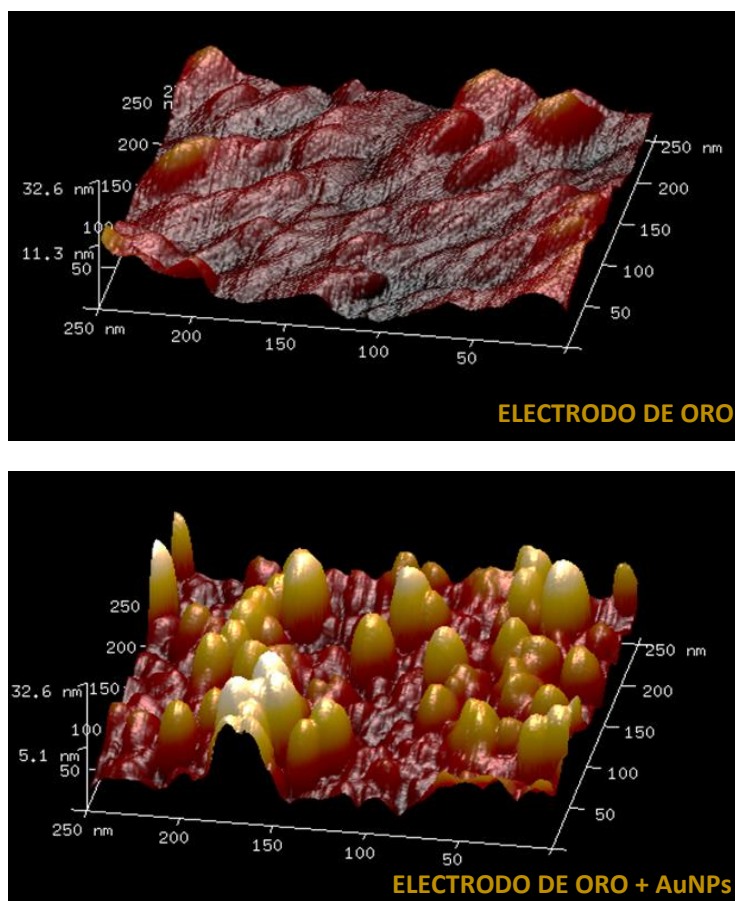


Figura 6-2.3: Imágenes de AFM de la superficie de oro sin modificar (arriba) y tras ser nanoestructurada con nanopartículas de oro (abajo).

Los resultados observados con ambas técnicas sugieren una correcta fabricación del aptasensor.

### 6-2.3.1 Caracterización de la afinidad de los aptámeros inmovilizados

En los capítulos anteriores se estudió la afinidad de los aptámeros hacia la PSA inmovilizando dicha proteína sobre una superficie adecuada (electrodos de oro o discos de oro de SPR). Los aptámeros seleccionados para la construcción del sensor han demostrado tener distinta afinidad hacia la glicoproteína PSA inmovilizada, estimando sus constantes de disociación en  $177 \pm 5$  nM para anti-PSA y  $1.9 \pm 0.2$  nM para PSAG-1 mediante medidas de SPR. Sin embargo, estudios previos han demostrado que la interacción aptámero-proteína depende de cuál de las moléculas participantes se encuentra inmovilizada debido a variaciones en las interacciones con la superficie<sup>154-156</sup> y a que la inmovilización puede alterar la conformación del aptámero y su capacidad de enlace. En el sensor propuesto los aptámeros se encuentran anclados a la superficie, al contrario que en los ensayos de afinidad, y esto podría modificar su afinidad de enlace hacia la PSA debido a impedimentos estéricos que dificulten la accesibilidad de la proteína al aptámero o a repulsiones estéricas entre aptámeros cercanos, que impidan el reconocimiento y unión de la proteína<sup>155</sup>.

Por esta razón se estudió la afinidad de ambos aptámeros hacia la PSA en el formato propuesto en el diseño del sensor: los aptámeros inmovilizados y la proteína en disolución. Para ello se inmovilizaron los aptámeros tiolados en discos de oro de SPR estableciendo en primer lugar una línea de base con PBS-EIS, y a continuación se hicieron interaccionar con concentraciones crecientes de PSA. La variación del ángulo de resonancia para cada concentración permitió construir las curvas de enlace que se ajustaron al modelo de Langmuir. Se estimó una constante de disociación de  $223 \pm 65$  nM para el PSAG-1 y  $336 \pm 63$  nM para el anti-PSA (Figura 6-2.4).



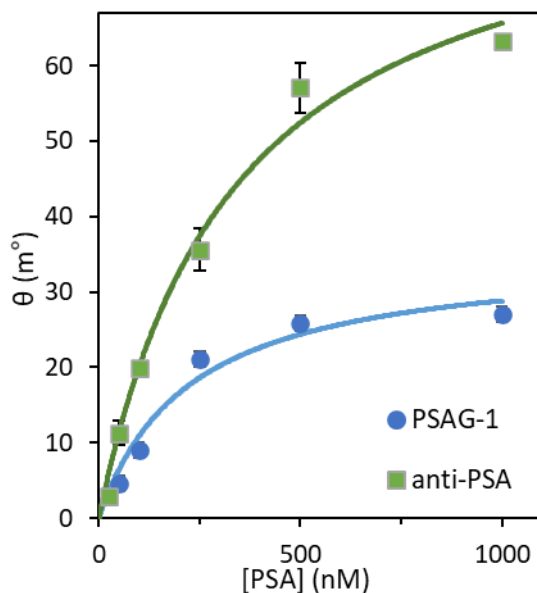


Figura 6-2.4: Curvas de enlace de los aptámeros anti-PSA (verde) y PSAG-1 (azul) frente a la PSA humana, obtenidas mediante medidas de SPR y ajustadas al modelo de Langmuir.

Al comparar estos valores con los obtenidos en el formato inverso se observa un decrecimiento en la afinidad hacia la PSA para ambos aptámeros, aunque la magnitud de la reducción es diferente para cada aptámero. Mientras que la afinidad del aptámero anti-PSA es dos veces menor, para el PSAG-1 esta es cien veces menor. Esto puede ser debido a varios motivos: el reconocimiento por los aptámeros de epítopos distintos de la proteína que pueden tener distinta accesibilidad, y la presencia de distintas glicofomas en el patrón de PSA. Sin embargo, las afinidades obtenidas con esta nueva configuración siguen encontrándose en el intervalo nM, en principio suficiente para permitir la medida de PSA en el intervalo de concentraciones con utilidad clínica.

#### 6-2.3.2 Caracterización analítica de la plataforma dual impedimétrica

Para obtener información simultánea sobre de la fracción de la PSA que es reactiva al aptámero PSAG-1 y de la PSA total en una muestra, se prepararon dos superficies sensoras adyacentes, inmovilizando sobre

cada una de ellas uno de los aptámeros. La plataforma dual así obtenida se incubó con concentraciones crecientes de PSA en PBS-EIS. El enlace de la proteína a los aptámeros produjo un incremento en el valor de  $R_{ct}$  obtenido del ajuste del diagrama de Nyquist al circuito de Randles (Figura 6-2.5).

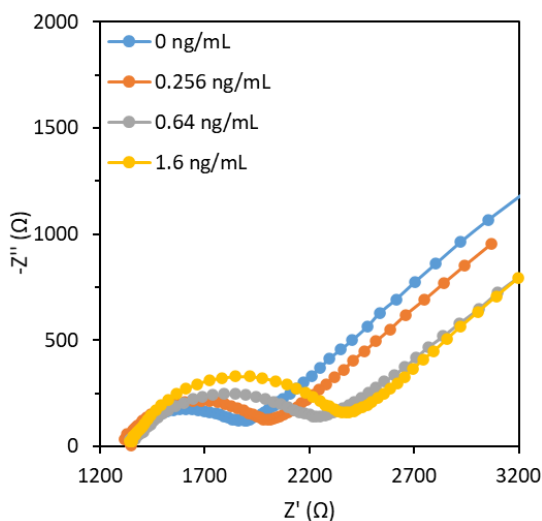


Figura 6-2.5: Diagramas de Nyquist obtenidos para la interacción de la fase sensora con concentraciones crecientes de PSA.

Para corregir las variaciones debidas a diferencias microscópicas en el área de los electrodos y al empaquetado de los aptámeros en superficie, se normalizó la señal como el porcentaje de cambio en el valor de  $R_{ct}$  respecto al valor inicial en ausencia de la proteína ( $R_{ct,0}$ ) empleando la fórmula  $[(R_{ct} - R_{ct,0}) / R_{ct,0}] \times 100$ .

Con ambos aptasensores la señal crece al aumentar la concentración de PSA hasta que se alcanza la saturación, obteniéndose unos porcentajes de aumento mayores para el aptámero PSAG-1 que para el anti-PSA para la misma concentración de PSA. Por ejemplo, en la saturación se obtiene una señal de  $39.7 \pm 0.5$  % con el PSAG-1, mientras que con el anti-PSA se obtiene un  $26.5 \pm 0.9$  %. Esta diferencia es más acentuada a concentraciones bajas de PSA, para la que la respuesta del sensor con el aptámero PSAG-1 es 2.7 veces mayor que la del anti-PSA,

para una concentración de PSA de 0.64 ng/mL. En consecuencia, el intervalo de concentraciones de PSA en el que la señal analítica crece con la proteína abarca desde 0.64 hasta 62.5 ng/mL para el aptámero anti-PSA, y desde 0.26 hasta 62.5 ng/mL para el PSAG-1. Esto puede ser debido a dos efectos: diferencias en las constantes de afinidad de ambos aptámeros y la diferente orientación de la proteína atrapada en la capa de reconocimiento debido a que los aptámeros la reconocen por distintas zonas, lo que puede ocasionar mayor o menor impedimento a la transferencia electrónica de las moléculas electroactivas en disolución.

La fase sensora con PSAG-1, produce un cambio mucho menor de la señal cuando se emplea la rPSA; mientras que con la fase sensora con anti-PSA se alcanzan cambios en la señal similares con la hPSA y la rPSA. Para el anti-PSA, la señal de saturación con la PSA es el 96 % de la señal para la hPSA, mientras que para el PSAG-1 esta es solamente del 37 %. Estas observaciones vuelven a confirmar que los aptámeros reconocen distintas zonas de la proteína, siendo el PSAG-1 el que reconoce los azúcares (Figura 6-2.6).

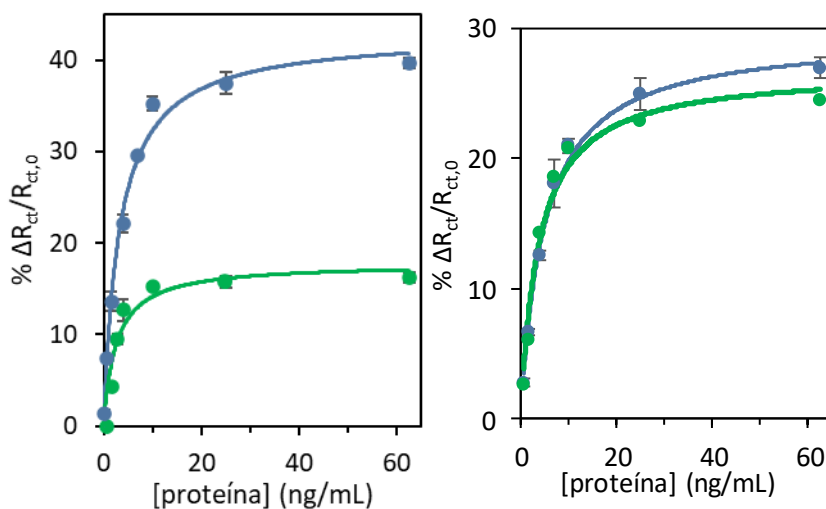


Figura 6-2.6: Curvas de calibrado obtenidas con la PSA humana (azul) y la PSA recombinante (verde) con el aptámero PSAG-1 (izquierda) y anti-PSA (derecha).

Para demostrar la selectividad de la plataforma dual esta se expone a la albúmina de suero humano (HSA), la proteína más abundante en suero humano. Tras la incubación de ambos aptasensores con 10 ng/mL de HSA en PBS-EIS durante 30 minutos se observa que el porcentaje de cambio en la  $R_{ct}$  ( $0.4 \pm 0.3$  % para PSAG-1 y  $2.9 \pm 0.5$  % para anti-PSA) es significativamente menor que el obtenido para la misma concentración de hPSA ( $36 \pm 2$  % para PSAG-1 y  $21.0 \pm 0.5$  % para anti-PSA) e iguales o ligeramente superior a los valores del blanco ( $0.8$  % para PSAG-1 y  $0.4$  % para anti-PSA).

Además, el sensor también es capaz de detectar efectivamente la PSA en muestras de suero. Cuando se trabaja con medios tan complejos es importante minimizar las adsorciones no específicas de otros componentes de la matriz sobre la superficie sensora. Por ello, se realizó un acondicionamiento previo de la fase sensora incubándola durante 30 minutos con suero de mujer diluido 1:5 con PBS-EIS, con un contenido de PSA menor de 0.01 ng/mL certificado por el ensayo ELISA quimioluminiscente. El valor de la  $R_{ct}$  obtenido tras esta etapa se utiliza como referencia ( $R_{ct,0}$ ) para calcular el porcentaje en muestras de suero. Tras esta etapa la fase sensora se incubó con concentraciones crecientes de PSA observándose un incremento de la señal con la concentración similar al observado en PBS-EIS para el intervalo de concentraciones bajas, siendo el intervalo de trabajo el mismo en suero que en PBS-EIS. Sin embargo, las señales de saturación son menores que las observadas en PBS-EIS probablemente debido a que el número de sitios de reconocimiento se ve reducido por la adsorción de otras proteínas presentes en la matriz del suero a la superficie durante el acondicionamiento (Figura 6-2.7).

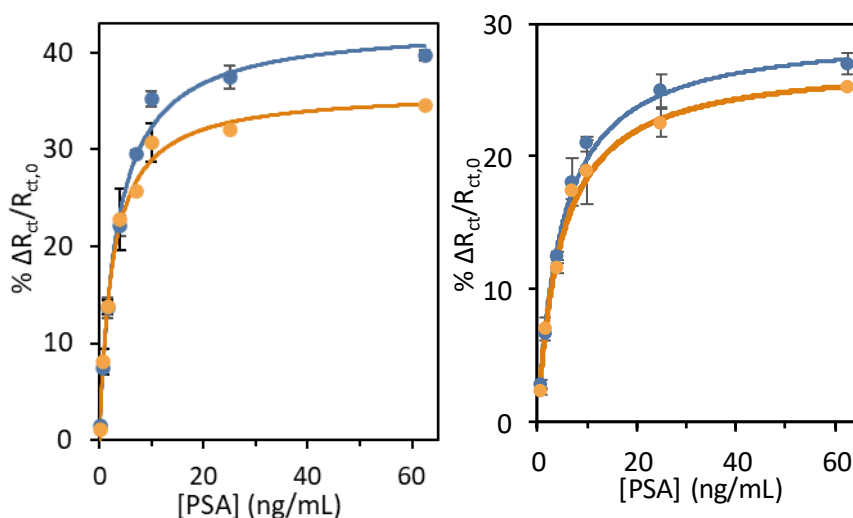


Figura 6-2.7: Curvas de calibrado obtenidas sobre la plataforma dual impedimétrica. A) en PBS-EIS (azul) y suero diluido 1:5 (naranja) con el aptámero PSAG-1. B) en PBS-EIS (azul) y suero diluido 1:5 (naranja) con el aptámero anti-PSA.

Las curvas de calibrado obtenidas en suero diluido se ajustaron a la ecuación de Langmuir ( $y = y_{\max} \cdot x / P + x$ ) con un valor de  $y_{\max}$  de  $27.2 \pm 0.8$  % y  $P$  de  $4.8 \pm 0.5$  ng/mL con una correlación de 0.996 para el aptámero anti-PSA, y un valor de  $y_{\max}$  de  $36 \pm 2$  % y  $P$  de  $2.3 \pm 0.4$  ng/mL con una correlación de 0.993 para el aptámero PSAG-1.

### 6-2.3.3 Análisis de PSA en muestras reales

Para explorar la utilidad clínica de la plataforma diseñada, esta se empleó para detectar las alteraciones en los glicanos de la PSA asociadas al cáncer de próstata. Las muestras de suero, proporcionadas por el Hospital de Cabueñes, corresponden a 12 pacientes clasificados en tres grupos: pacientes con hiperplasia benigna de próstata, con cáncer de próstata y sanos. Las muestras tienen unos niveles de PSA total en la zona gris o por encima ( $> 4$  ng/mL), cuantificadas con el ensayo ELISA automatizado ADVIA Centaur® (Siemens) realizado en el laboratorio central del hospital.

En el análisis de las muestras, en primer lugar, se acondicionó la plataforma sensora con suero de mujer y después se incubó con las muestras de suero de pacientes diluidas cinco veces con PBS-EIS. El porcentaje de cambio de  $R_{ct}$  obtenido con cada fase sensora se interpola en la curva de calibrado correspondiente para obtener la concentración de PSA. Los resultados obtenidos con la fase sensora modificada con el aptámero anti-PSA concuerdan perfectamente con los obtenidos en el hospital con el ensayo ELISA (

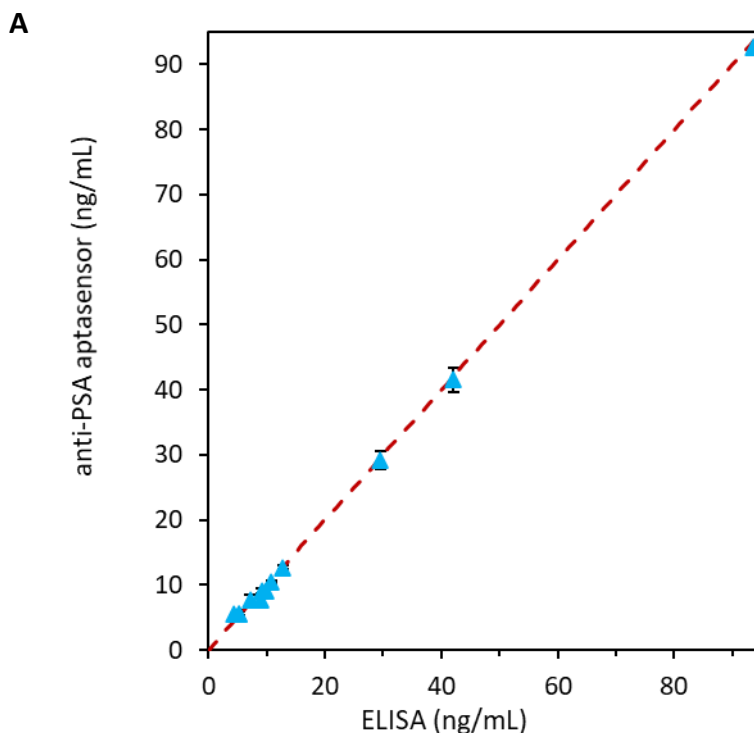
Figura 6-2.8A y Tabla 6-2.1), mientras que con la fase sensora con el aptámero PSAG-1 se obtienen valores de PSA menores que los obtenidos con el sensor con anti-PSA. Esto concuerda con el hecho de que solo una fracción de PSA en la muestra es reactiva al aptámero PSAG-1.

Tabla 6-2.1: Niveles de PSA total y glicosilada, valor del Glycan Score, el valor proporcionado por el ELISA y el diagnóstico de cada muestra.

Muestra	ELISA (ng/mL)	[tPSA] (ng/mL)	[gPSA] (ng/mL)	Glycan score	Diagnóstico
24	9.83	9.2 ± 0.2	2.6 ± 0.5	28 ± 5	Diabetes tipo II (DMII), hipertensión
25	5.36	5.6 ± 0.3	1.22 ± 0.01	22 ± 1	DMII
27	9.15	9.1 ± 0.4	2.7 ± 0.2	29 ± 2	Gonalgia
35	7.2	8 ± 1	1.83 ± 0.08	24 ± 3	Obesidad mórbida
19	12.83	12.7 ± 0.3	10 ± 1	82 ± 9	Cáncer de próstata
21	42.11	42 ± 2	35 ± 2	83 ± 6	Cáncer de próstata
10	5.34	5.6 ± 0.6	4.8 ± 0.1	86 ± 10	Cáncer de próstata
14	10.83	10.4 ± 0.2	8.8 ± 0.4	84 ± 3	Cáncer de próstata
9	4.48	5.48	2.0 ± 0.8	37 ± 13	Prostatitis
13	8.89	7.6 ± 0.9	2.6 ± 0.5	30 ± 6	Cáncer de próstata

20	29.59	29 ± 1	8.8 ± 0.4	30 ± 2	HBP
18	93.57	92.6 ± 0.2	25 ± 2	27 ± 2	HPB

Con el fin de evaluar el valor diagnóstico de la plataforma dual desarrollada se define el índice de glicanos o “*Glycan score*” (GS) como la relación entre la concentración de PSA medida con el aptámero PSAG-1 y la concentración de PSA medida con el anti-PSA (tPSA) y multiplicado por cien. Si se compara las concentraciones de PSA obtenidas con ambos sensores y los valores de GS con el diagnóstico final se observa que los valores de las concentraciones no concuerdan con el estado de salud del paciente. Por el contrario, el valor de GS se correlaciona con el diagnóstico final siendo posible distinguir entre pacientes sin cáncer de próstata y pacientes que lo tienen (Figura 6-2.8B).



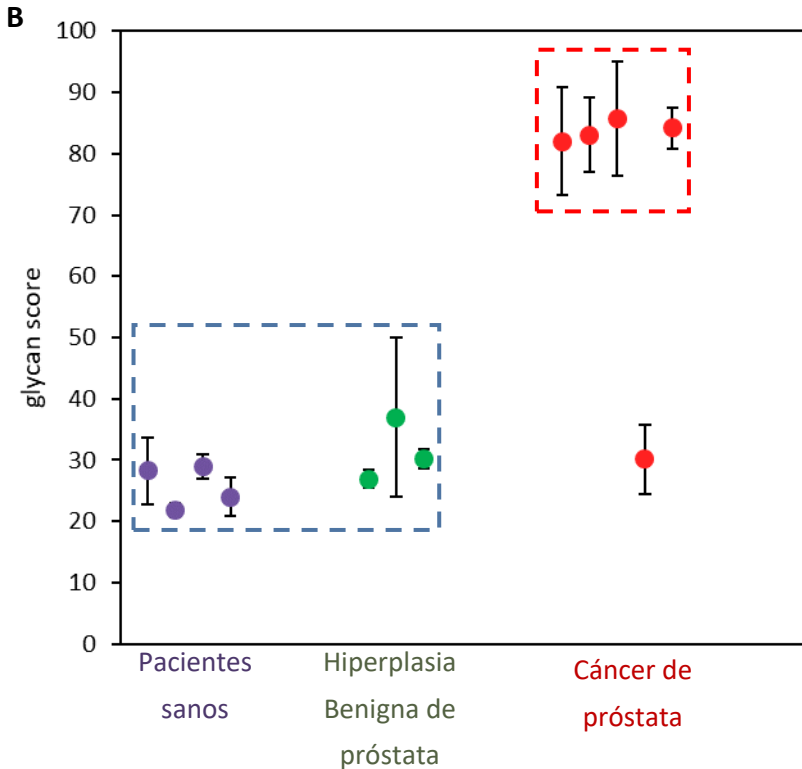


Figura 6-2.8: Resultado del análisis de muestras de suero con la plataforma dual impedimétrica. A) Correlación entre los niveles de PSA total obtenidos con el método ELISA y con el sensor impedimétrico con el aptámero anti-PSA. B) Correlación entre el valor de Glycan Score y el diagnóstico.

Los valores de GS obtenidos permiten diferenciar dos grupos. El primero incluye valores de GS entre 22 y 37 y corresponde a pacientes sin cáncer de próstata, entre los que se incluyen individuos sanos y pacientes con patologías benignas de la próstata (prostatitis o HBP). El otro grupo, con valores de GS en general más altos corresponde a pacientes con cáncer de próstata. Se observa un grupo claro con GS entre 82 y 86, en el que se encuentran cuatro de las cinco muestras analizadas correspondientes a pacientes con cáncer, y solo una muestra de este grupo con GS de 26 se asignaría incorrectamente con este criterio (falso negativo) (Figura 6-2.8B y Tabla 6-2.1). Estos resultados concuerdan con un incremento significativo en la PSA reactiva al aptámero PSAG-1 en pacientes con cáncer, que pueden ser asociados a cambios en los niveles



de fucosilación del núcleo<sup>157</sup> o a un incremento en estructuras muy ramificadas<sup>158</sup>.

De esta forma, la plataforma dual impedimétrica desarrollada y el parámetro *Glycan Score* tienen el potencial para mejorar el diagnóstico del cáncer de próstata, debido a la capacidad de GS de separar a los pacientes con cáncer de pacientes sin cáncer con un 80 % de sensibilidad y un 100 % de especificidad. Aunque es necesaria la validación y el análisis de más muestras, los resultados obtenidos demuestran que la implementación del índice GS podría reducir el número de biopsias innecesarias sin comprometer el diagnóstico de cáncer de próstata.



## 6.3 Utilidad clínica de los aptasensores

Los resultados obtenidos con los tres aptasensores desarrollados pueden ser una herramienta útil para la detección de la fracción de la PSA glicosilada que se ve alterada en la presencia del cáncer de próstata, y por tanto, podrían ser una alternativa al inmunoensayo ELISA para el diagnóstico del cáncer de próstata, si mejoran su utilidad clínica (selectividad y especificidad diagnósticas).

Todos los resultados obtenidos para el análisis de las muestras con los diferentes sensores, junto con el valor proporcionado por el ELISA y el diagnóstico final se recogen en la Tabla 6-3.1. Para facilitar la interpretación de los resultados se representan en verde los verdaderos negativos, en azul los verdaderos positivos, en rojo los falsos positivos y en naranja los falsos negativos. Se ha considerado un valor de corte de 4 ng/mL por debajo del cual se consideraría que el individuo no tiene cáncer para todos los ensayos excepto para el *Glycan Score*. En este último caso el valor de corte fue de 29.5.

El ensayo sándwich con el aptámero PSA-1 reduce el número de falsos positivos de 20 proporcionados por el ELISA a solamente 7, para las 34 muestras analizadas por ambos métodos. De esta forma se mejora la especificidad del método ELISA, siendo del 65 % para el ensayo sándwich y del 23 % para el ensayo ELISA. La sensibilidad de ambos métodos es muy similar, aunque un poco mejor la del ELISA (75 % para el ELISA vs. 70 % para el sándwich con PSA-1). Hay que tener en cuenta que las muestras están sesgadas hacia aquellas que son falsos positivos en ELISA. De ahí la baja especificidad que debe circunscribirse al subconjunto de muestras analizadas pero que no se corresponde con la especificidad general del ensayo ELISA.

Con el ensayo sándwich con el aptámero PSAG-1 se analizó un menor número de muestras (4), pero los resultados obtenidos mejoran tanto la sensibilidad (100 % para el sándwich con PSAG-1 vs. 75 % para el ELISA)

como la especificidad (50 % para el sándwich con PSAG-1 vs. 23 % ELISA), al proporcionar un menor número de falsos positivos, solamente uno para el aptasensor frente a tres del ensayo ELISA, y ningún falso negativo.

El uso del índice de glicanos (*"Glycan Score"*), en el que se relaciona una fracción reactiva de la PSA al aptámero PSAG-1 con la cantidad de PSA total, medido mediante la plataforma dual impedimétrica clasifica correctamente 11 de las 12 muestras ensayadas. Solamente proporciona un falso negativo. Por tanto, la especificidad es del 100 % mientras que la sensibilidad es del 80 %. El GS mejoraría la especificidad respecto al ELISA, su punto débil, pero empeoraría la selectividad. Sin embargo, debido al exiguo número de muestras ensayadas es prematuro afirmarlo con rotundidad. Se requieren más variedad de muestras para establecer un punto de corte adecuado y determinar así la verdadera selectividad y especificidad del nuevo índice.

### 6.3 Utilidad clínica de los aptasensores

Tabla 6-3.1: Resultados obtenidos para el análisis de las muestras con el ensayo ELISA, los aptasensores desarrollados, el valor del Glycan Score y el diagnóstico final.

■ Verdadero positivo    
 ■ Verdadero negativo    
 ■ Falso positivo    
 ■ Falso negativo

Muestra	ELISA (ng/mL)	Sándwich PSA-1 (ng/mL)	Sándwich PSAG-1 (ng/mL)	Impedimétrico anti-PSA (ng/mL)	Impedimétrico PSAG-1 (ng/mL)	Glycan Score	Diagnóstico
1	< 0.01	< LD					Otras patologías no relacionadas
2	< 0.01	< LD					HBP
3	< 0.01	< LD					Cáncer de próstata
4	< 0.01	< LD					HBP. Biopsia negativa
5	0.37	3.86 ± 0.02					Elevación de PSA/2 biopsias negativas
6	0.96	1.2 ± 0.2					Cáncer de próstata
7	1.94	< LD					Hipercolesterolemia
8	2.79	2.4 ± 0.4					Otras patologías no relacionadas
9	4.48	23.5	1.5 ± 0.6	5.48	2.0 ± 0.8	37 ± 13	Prostatitis

10	5.34	1.8 ± 0.8		5.6 ± 0.6	4.8 ± 0.1	86 ± 10	cáncer de próstata
11	6.34	4.7 ± 0.6					elevación PSA
12	8.03	1.0 ± 0.3					hipertiroidismo
13	8.89	8.7		7.6 ± 0.9	2.6 ± 0.5	30 ± 6	Cáncer de próstata
14	10.83	10.1 ± 0.9		10.4 ± 0.2	8.8 ± 0.4	84 ± 3	Cáncer de próstata
15	11.33	13 ± 2					Rectorragia
16	41.1	19.4 ± 6					Cáncer de próstata
17	27.79	26 ± 3	3 ± 1				Hipertensión arterial
18	93.57	91 ± 8		92.6 ± 0.2	25 ± 2	27 ± 2	HBP
19	12.83	14.9 ± 1	10 ± 1	12.7 ± 0.3	10 ± 1	82 ± 9	cáncer de próstata
20	29.59	1.5 ± 1.1	4.4 ± 0.4	29 ± 1	8.8 ± 0.4	30 ± 2	HBP
21	42.11	41 ± 5		42 ± 2	35 ± 2	83 ± 6	cáncer de próstata
22	8.49	< L.D.					diabetes tipo II (DMII), hipertensión
23	13.08	1					neoplasia de recto
24	9.83	1.4 ± 0.4		9.2 ± 0.2	2.6 ± 0.5	28 ± 5	DM II, hipertensión

6.3 Utilidad clínica de los aptasensores

25	5.36	5.5 ± 0.6		5.6 ± 0.3	1.22 ± 0.01	22 ± 1	DMII
26	6.96	1.8 ± 1					Otras patologías no relacionadas
27	9.15	4.6 ± 0.2		9.1 ± 0.4	2.7 ± 0.2	29 ± 2	Gonalgia
28	6.20	1.23 ± 0.2					prótesis aorta
29	7.15	0.63 ± 0.07					biopsia negativa/ poliposis
30	7.90	0.7 ± 0.2					hipertensión arterial
31	7.85	9.2 ± 0.8					secuelas traumatismo craneocefálico
32	5.83	0.7 ± 0.2					sin importancia
33	5.51	5 ± 2					sin importancia
34	8.07	1.8 ± 0.7					sin importancia
35	7.20			8.1 ± 1	1.83 ± 0.08	24 ± 3	no biopsia, obesidad mórbida





# CAPÍTULO 7

## *Conclusiones y perspectivas de futuro*



## 1. Conclusiones

Las principales conclusiones que se extraen de la presente Tesis Doctoral se presentan a continuación:

1. Se ha diseñado una estrategia de selección de aptámeros frente a la región de los glicanos de la PSA basada en la incorporación de contra-selecciones frente a la forma recombinante de la PSA (sin glicanos). Tras seis rondas de selección, de las cuales dos fueron contra-selecciones, se ha identificado un aptámero, PSA-1, capaz de discriminar la PSA de la PSA recombinante. Este aptámero muestra gran afinidad hacia la proteína humana, con una constante de disociación de  $357 \pm 42$  nM obtenida a través de ensayos de unión con detección electroquímica y de  $177 \pm 65$  nM, mediante medidas de SPR. PSA-1 reconoce también a otras glicoproteínas humanas con patrones de glicosilación similares al de la PSA, de lo que se deduce que este aptámero se une fundamentalmente a los glicanos de las proteínas y no a la región peptídica.
2. Se han explorado dos opciones para dirigir el proceso SELEX para obtener aptámeros capaces de reconocer a la PSA tanto a través de la región de los glicanos como de la zona peptídica. De las dos metodologías propuestas, la opción basada en la elución competitiva con la lectina PhoSL es la que proporciona un enriquecimiento de la librería inicial en secuencias con afinidad hacia la PSA.
3. Se ha identificado un aptámero, el PSAG-1, capaz de distinguir entre la PSA recombinante y la humana, con una afinidad por la PSA glicosilada de  $34 \pm 9$  nM, obtenida mediante ensayos de unión con detección electroquímica, y de  $1.9 \pm 0.2$  nM mediante medidas de SPR. Ambas constantes son al menos un orden de magnitud mejores que las descritas para lectinas naturales. Este aptámero también es capaz de reconocer la región peptídica

cercana al sitio de glicosilación, siendo capaz de discriminar la PSA de otras glicoproteínas con una estructura de glicanos similar (NGAL, AFP, ovoalbúmina y transferrina).

4. Mediante un ensayo de desglucosilación selectiva de la PSA se pudo obtener información sobre los azúcares involucrados en la interacción entre los aptámeros y la proteína. Con este estudio se concluye que ambos aptámeros presentan un perfil de reconocimiento de los azúcares de la PSA completamente distinto. El aptámero PSA-1 reconoce a los azúcares externos, principalmente a los ácidos siálicos y a las galactosas, lo que concuerda con la falta de reconocimiento de la parte peptídica por este receptor; mientras que el aptámero PSAG-1 reconoce a los azúcares más internos del glicano (galactosa, N-acetilglucosamina y fucosa  $\alpha$ 1-6 del núcleo).
5. Se estudió la influencia de la fucosa  $\alpha$ 1-6 del núcleo en el enlace de ambos aptámeros mediante ensayos de desplazamiento de la lectina PhoSL unida a la PSA y competitivos con fucosa en disolución. Ambos muestran que la fucosa  $\alpha$ 1-6 del núcleo no interviene en el enlace del PSA-1 a la PSA, mientras que si es importante para el enlace del PSAG-1, aunque también están involucrados otros azúcares.
6. Se ha desarrollado un método para obtener un modelo de la estructura tridimensional de los aptámeros. Se parte de la estructura secundaria predicha por el programa Mfold, que se transforma en tridimensional empleando el programa de predicción RNAcomposer. De esta forma se obtiene una estructura tridimensional para el aptámero como si de un ARN se tratase. Esta estructura se transforma en ADN empleando el programa de edición molecular Discovery Studio Visualizer y finalmente se relaja con simulaciones de dinámica molecular, empleando un muestreo mejorado y algoritmos convencionales. El modelo que mejor define la estructura tridimensional del

aptámero PSAG-1 muestra que este aptámero posee unos elementos estructurales bien definidos, un bucle de horquilla y dos segmentos helicoidales de pares de bases.

7. El modelo tridimensional del aptámero PSAG-1 obtenido permitió diseñar de manera racional una nueva secuencia más corta, el aptámero truncado T-PSAG-1 de 32 bases, que resulta de la eliminación de las últimas 8 bases del extremo 3' del aptámero completo. Este aptámero truncado mantiene similares características de afinidad ( $121 \pm 25$  nM) hacia la hPSA y selectividad frente a otras glicoproteínas que el aptámero completo.
8. El modelo tridimensional del aptámero T-PSAG-1 y la estructura cristalina de la proteína (3QUM) fueron el punto de partida para la construcción de un modelo molecular del complejo aptámero-PSA. Mediante el método de acoplamiento molecular o docking seguido de simulaciones de dinámica molecular se obtuvo un modelo del complejo que predice que el aptámero se enlaza simultáneamente a residuos del bucle de las calicreínas (zona peptídica de la PSA) y de la región interna de su glicano, incluyendo a la fucosa  $\alpha$ 1-6 del núcleo.
9. Se comprobó mediante medidas de afinidad con SPR que uno de los aptámeros ya descritos para la PSA, el anti-PSA, no reconoce la fracción glicosilada de la misma ya que se une de igual forma a la PSA glicosilada y a la recombinante. Se estimó mediante ensayos de unión con detección electroquímica y ajuste al modelo de Langmuir una constante de disociación de  $229 \pm 25$  nM.
10. La combinación de los aptámeros anti-PSA y PSA-1 permitió obtener un aptasensor electroquímico con formato tipo sándwich sobre electrodos de oro para cuantificar la PSA glicosilada en suero humano. Este dispositivo se caracteriza por un límite de detección de 0.66 ng/mL y un intervalo de trabajo

desde 0.66 ng/mL hasta 25 ng/mL para medidas en muestras de suero con una mínima dilución, lo que abarca el intervalo de concentraciones de PSA en suero con relevancia clínica en el diagnóstico del cáncer de próstata. Además, el sensor muestra una excelente selectividad frente a otras glicoproteínas y componentes de la sangre. La validación del sensor mediante la medida de PSA en muestras de suero de pacientes con diferentes patologías mostró que este método presenta una mejor capacidad de discriminación entre cáncer de próstata e hiperplasia benigna de próstata que el ELISA utilizado como referencia.

11. Los aptámeros PSAG-1 y anti-PSA se han utilizado para construir una plataforma sensora dual impedimétrica, que no requiere marcas, para la cuantificación de la PSA total y glicosilada en suero tras una simple dilución de la muestra. Los sensores incorporados en esta plataforma presentan un intervalo dinámico útil entre 0.26 y 62.5 ng/mL para el basado en PSAG-1 y 0.64 y 62.5 ng/mL para el que utiliza anti-PSA.
12. Con la plataforma impedimétrica dual descrita se obtiene un índice empírico, "Glycan Score", calculado a partir de las concentraciones de PSA obtenidas con los dos sensores del sistema dual. Este índice mide la relación entre la cantidad de PSA reactiva al PSAG-1 y la concentración de PSA total. La correlación de este parámetro con el diagnóstico permite la diferenciación en dos grupos claramente separados entre pacientes con cáncer y pacientes sanos o con patologías benignas de la próstata.
13. Los dispositivos desarrollados en esta Tesis Doctoral podrían ser una alternativa para la detección de PSA, con potencial para mejorar los resultados clínicos del test ELISA de PSA y reducir el número de biopsias innecesarias que se llevan a cabo para diagnosticar el cáncer de próstata.

## 2. Perspectivas de futuro

La investigación llevada a cabo y los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral abren la puerta a nuevas propuestas de investigación, desarrollo e innovación, como las que se recogen a continuación:

1. Por las características que presenta el aptámero PSA-1 este podría ser empleado como reactivo genérico para la detección de glicanos de cualquier glicoproteína, imitando de esta forma a los receptores naturales, las lectinas, pero con una mayor afinidad y con las ventajas de estabilidad y síntesis que presenta un receptor sintético.
2. La estrategia para obtener aptámeros descrita en el capítulo 4 no se restringe solamente a las proteínas con un solo sitio de glicosilación y con fucosa del núcleo, si no que se podrían emplear otras lectinas específicas para dirigir la selección a diferentes azúcares de una proteína que hayan sido asociados con la aparición del cáncer.
3. La adaptación de los sensores descritos a un formato miniaturizado, portátil, fácil de usar y de bajo coste, podría utilizarse como método analítico en el laboratorio de los hospitales y también en la realización de análisis a la cabecera del paciente (POC, point-of-care), acoplando estos dispositivos a móviles o pantallas donde se muestren los resultados.

### 3. Conclusions

From this Doctoral Thesis we can draw the following conclusions:

1. We have designed a strategy to direct the selection of aptamers toward prostate-specific antigen (PSA)-glycans, which is based on the incorporation of counter-selection steps against the recombinant form of PSA (without glycans). After six rounds of selection with two counter-selections, we have identified an aptamer, PSA-1, which can discriminate between human and recombinant PSA. This aptamer shows a great affinity for human PSA with a dissociation constant of  $357 \pm 42$  nM obtained with electrochemical binding assays, and  $157 \pm 65$  nM with SPR measurements. PSA-1 also recognizes other human glycoproteins with glycan patterns similar to PSA. Therefore, we deduced that this aptamer fundamentally binds to the glycan moiety and not to the peptide region of the protein.
2. We have explored two options to direct the SELEX procedure to obtain aptamers with the ability to recognize PSA through both the glycans and the peptide region. The strategy based on the competitive elution with the lectin PhoSL gives an enrichment of the initial library in sequences with affinity for PSA.
3. We have identified an aptamer, PSAG-1, that can distinguish between human and recombinant PSA, with an affinity for the glycosylated PSA of  $34 \pm 9$  nM, obtained with electrochemical binding assays, and  $1.9 \pm 0.2$  nM with SPR measurements. Both dissociation constants are at least one order of magnitude better than the ones described for natural lectins. This aptamer is also able to recognize the peptide region near to the glycosylation site, being able to distinguish between PSA and other glycoproteins with a similar glycan structure (NGAL, AFP, ovalbumin and transferrin).



4. We were able to get information about the sugars involved in the interaction between the aptamers and the protein with a selective deglycosylation assay. From this study, we observed that both aptamers present a completely different recognition profile of PSA sugars. PSA-1 aptamer recognizes the external sugars, mainly the sialic acids and galactose, which is in concordance with its lack of recognition of the peptide part. On the contrary PSAG-1 aptamer recognizes the innermost sugars of the glycan (galactose, N-acetylglucosamine, and  $\alpha$ 1-6 core fucose).
5. We have studied the influence of  $\alpha$ 1-6 core fucose in the binding of both aptamers to the protein using displacement assays of the PSA-bound PhoSL and competitive assays with fucose in solution. Both assays show that core fucose is not involved in the binding of PSA-1 to PSA, while it is important for the binding of PSAG-1, although other sugars are also involved.
6. We have developed a methodology to obtain a model of the 3D structure of aptamers. It started with the secondary structure predicted by Mfold that is transformed into 3D with the prediction software RNAcomposer. In this way, we obtained a 3D structure like an RNA aptamer that is transformed into a DNA aptamer with the molecular edition software Discovery Studio Visualizer. Finally, the structure was relaxed with molecular dynamics simulations using refined sampling and conventional algorithms. The best model that describes the 3D structure of PSAG-1 shows that the aptamer has very well-defined structural elements: a hairpin loop and two base-pairs helicoidal segments.
7. The 3D model obtained for PSAG-1 allows us to rationally design a new shorter sequence, the truncated T-PSAG-1 aptamer containing only 32 bases, which results from the elimination of the last 8 bases at the 3' end of the complete aptamer. This truncated aptamer keeps similar affinity characteristics to PSA

- (121 ± 25 nM) and selectivity against other glycoproteins as the complete aptamer.
8. The 3D model of T-PSAG-1 aptamer and the crystalline structure of PSA (3QUM) were the starting point for building a molecular model of the aptamer-protein complex. Using the molecular docking method, followed by molecular dynamics simulations we have obtained a model of the complex predicting that the aptamer simultaneously binds to the kallikrein loop (peptide region of the PSA) and the innermost region of the glycans, including the  $\alpha$ 1-6 core fucose.
  9. We have proved by SPR measurement that an already described aptamer for PSA, anti-PSA, is not able to recognize the glycosylation moiety of PSA because it binds with similar affinity to the glycosylated and recombinant PSA. We estimated a dissociation constant of 229 ± 25 nM by electrochemical binding assays.
  10. Combining anti-PSA and PSA-1 aptamers we have designed and electrochemical sandwich aptasensor for the quantification of glycosylated PSA in human serum using gold electrodes as a support. This device has a detection limit of 0.66 ng/mL and a working concentration range between 0.66 ng/mL and 25 ng/mL in serum samples with minimal dilution, covering the range of serum PSA concentrations with clinical relevance in the diagnosis of prostate cancer. Moreover, the sensor has an excellent selectivity against other glycoproteins and compounds of the serum. We have validated the sensor by measuring PSA in serum samples from patients with different pathologies, showing that the sensor has a better discrimination capacity between prostate cancer and benign prostate hyperplasia than the ELISA test used as a reference.
  11. We have used PSAG-1 and anti-PSA aptamers for building an impedimetric label-free dual sensor platform for the

quantification of total and glycosylated PSA in serum after a simple dilution. The sensors of this platform have a working concentration range between 0.26 and 62.5 ng/mL for PSAG-1, and between 0.64 and 62.5 ng/mL for anti-PSA.

12. Using the impedimetric platform we have obtained an empiric index, "Glycan score", calculated from the concentrations of PSA obtained with both sensors of the dual platform. This index measures the relation between the concentration of PSA reactive to PSAG-1 aptamer and the total PSA concentration. The correlation between the Glycan score and the diagnoses allows us to differentiate two groups that clearly separate patients with prostate cancer from healthy patients or with a benign pathology of the prostate.
13. The devices developed in this Doctoral Thesis could be an alternative for the detection of PSA, with the potential to improve the clinical outcomes of the ELISA test for PSA and reduce the number of unnecessary biopsies performed to diagnose prostate cancer.

### 4. Future perspectives

The investigation carried out and the results obtained in this Doctoral Thesis opens the door to new research, development and innovation proposals to be addressed in the future. We highlight the following ones:

1. Due to the characteristics of PSA-1 aptamer, it could be employed as a generic reagent for the detection of the glycans of any glycoprotein, mimicking the natural receptors (lectins). This aptamer has a higher affinity than the lectins and the stability and synthesis advantages of a synthetic receptor.
2. The strategy to obtain the aptamers described in chapter 4 is not restricted to proteins with one glycosylation site and with core

fucose. Otherwise, other specific lectins could be used to direct the selection of aptamer against other sugars of a protein that are associated with cancer.

3. The described sensors could be adapted to a miniaturized, portable, easy-to-use and low-cost device that could be used as an analytical method in the hospital laboratories and also as a point-of-care device, coupling the device with mobile phones or screens where the results are displayed.

# BIBLIOGRAFÍA



1. National Institute Cancer. National Cancer Institute: Diccionario de cáncer. *United States* (2004).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Rawla, P. Epidemiology of prostate cancer. *World J. Oncol.* **10**, 63–89 (2019).
4. El cáncer en España, datos y estadísticas. <https://www.epdata.es/datos/cancer-espana-datos-estadisticas/289> (2020).
5. Damborský, P., Damborská, D., Belický, Š., Tkáč, J. & Katrlík, J. Sweet strategies in prostate cancer biomarker research: Focus on a prostate specific antigen. *Bionanoscience* **8**, 690–700 (2018).
6. Simoes, G. F., Sakuramoto, P., Santos, C. B. dos, Furlan, N. K. C. & Augusto, T. M. An overview on prostate pathophysiology: New insights into prostate cancer clinical diagnosis. *Pathophysiol. - Altered Physiol. States* (2018) doi:10.5772/intechopen.74269.
7. Lee, C. H., Akin-Olugbade, O. & Kirschenbaum, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **40**, 565–575 (2011).
8. Taylor, R. A. & Risbridger, G. P. Prostatic tumor stroma: A key player in cancer progression. *Curr. Cancer Drug Targets* **8**, 490–497 (2008).
9. Chiarugi, P., Paoli, P. & Cirri, P. Tumor microenvironment and metabolism in prostate cancer. *Semin. Oncol.* **41**, 267–280 (2014).
10. Madu, C. O. & Lu, Y. Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *J. Cancer* **1**, 1 (2010).
11. Grossmann, M., Cheung, A. S. & Zajac, J. D. Androgens and prostate cancer; Pathogenesis and deprivation therapy. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 603–616 (2013).
12. Waldron, N. & Chowdhury, S. Prostate Cancer. *Medicine (Baltimore)*. **48**, 119–122 (2019).
13. Leitzmann, M. F. & Rohrmann, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: Age, location, and behavioral correlates. *Clin. Epidemiol.* **4**, 1–11 (2012).

14. Nelson, W. G., Antonarakis, E. S., Carter, H. B., De Marzo, A. M. & De Weese, T. L. Prostate cancer. in *Abeloff's Clinical Oncology* 1401-1432.e7 (2020).
15. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST ( Biomarkers , EndpointS , and other Tools ). *Silver Spring Food Drug Adm.* 55 doi:10.1164/rccm.201301-0153OC.
16. Sharma, S., Zapatero-Rodríguez, J. & O'Kennedy, R. Prostate cancer diagnostics: Clinical challenges and the ongoing need for disruptive and effective diagnostic tools. *Biotechnol. Adv.* **35**, 135–149 (2017).
17. Wang, M. C., Valenzuela, L. A., Murphy, G. P. & Chu, T. M. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest. Urol.* **17**, 159–163 (1979).
18. Lundwall, Å., Clauss, A. & Olsson, A. Y. Evolution of kallikrein-related peptidases in mammals and identification of a genetic locus encoding potential regulatory inhibitors. *Biol. Chem.* **387**, 243–249 (2006).
19. Balk, S. P., Ko, Y. J. & Bubley, G. J. Biology of prostate-specific antigen. *J. Clin. Oncol.* **21**, 383–391 (2003).
20. Gilgunn, S., Conroy, P. J., Saldova, R., Rudd, P. M. & O'Kennedy, R. J. Aberrant PSA glycosylation - A sweet predictor of prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **10**, 99–107 (2013).
21. Sävblom, C. *et al.* Blood levels of free-PSA but not complex-PSA significantly correlates to prostate release of PSA in semen in young men, while blood levels of complex-PSA, but not free-PSA increase with age. *Prostate* **65**, 66–72 (2005).
22. Lilja, H., Ulmert, D. & Vickers, A. J. Prostate-specific antigen and prostate cancer: Prediction, detection and monitoring. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 268–278 (2008).
23. Christensson, A., Laurell, C. -B & Lilja, H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur. J. Biochem.* **194**, 755–763 (1990).
24. Stephan, C., Ralla, B. & Jung, K. Prostate-specific antigen and other serum and urine markers in prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1846**, 99–112 (2014).



25. Catalona, W. J. Prostate cancer screening. *Med. Clin. North Am.* **102**, 199–214 (2018).
26. Saini, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell. Oncol.* **39**, 97–106 (2016).
27. Stephan, C. *et al.* 20–25% Lower concentrations of total and free prostate-specific antigen (PSA) after calibration of PSA assays to the WHO reference materials – Analysis of 1098 Patients in Four Centers. *Int. J. Biol. Markers* **24**, 65–69 (2009).
28. Macefield, R. *et al.* Impact of prostate cancer testing: an evaluation of the emotional consequences of a negative biopsy result. *Br. J. Cancer* **102**, 1335–1340 (2010).
29. Catalona, W. J. *et al.* Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *J. Am. Med. Assoc.* **274**, 1214–1220 (1995).
30. Benson, M. C. *et al.* Prostate specific antigen density: A means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J. Urol.* **147**, 815–816 (1992).
31. Mydlo, J. H. *et al.* *Prostate Cancer Science and clinical practice. Second Edition.* (Elsevier, 2016).
32. Smith, D. S. & Catalona, W. J. Rate of change in serum prostate specific antigen levels as a method for prostate cancer detection. *J. Urol.* **152**, 1163–1167 (1994).
33. American Cancer Society. Tests to diagnose and stage prostate Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html> (2019).
34. Efesoy, O., Bozlu, M., Çayan, S. & Akbay, E. Complications of transrectal ultrasound-guided 12-core prostate biopsy: A single center experience with 2049 patients. *Turk Urol. Derg.* **39**, 6–11 (2013).
35. Gordetsky, J. & Epstein, J. Grading of prostatic adenocarcinoma: Current state and prognostic implications. *Diagn. Pathol.* **11**, (2016).
36. Gleason, D. F. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother. Rep.* **50**, 125–128 (1966).
37. Humphrey, P. A. Gleason grading and prognostic factors in

- carcinoma of the prostate. *Mod. Pathol.* **17**, 292–306 (2004).
38. Marrugo-Ramírez, J., Mir, M. & Samitier, J. Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: A promising non-invasive alternative to tissue biopsy. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2877 (2018).
  39. Catalona, W. J. *et al.* A multicenter study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *J. Urol.* **185**, 1650–1655 (2011).
  40. Becerra, M. F., Atluri, V. S., Bhattu, A. S. & Punnen, S. Serum and urine biomarkers for detecting clinically significant prostate cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 1–5 (2020) doi:10.1016/j.urolonc.2020.02.018.
  41. Filella, X., Fernández-Galan, E., Bonifacio, R. F. & Foj, L. Emerging biomarkers in the diagnosis of prostate cancer. *Pharmgenomics. Pers. Med.* **11**, 83–94 (2018).
  42. Punnen, S., Pavan, N. & Parekh, D. J. Finding the wolf in sheep's clothing: The 4Kscore is a novel blood test that can accurately identify the risk of aggressive prostate cancer. *Rev. Urol.* **17**, (2015).
  43. Peracaula, R. *et al.* Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. *Glycobiology* **13**, 457–470 (2003).
  44. Meany, D. L., Zhang, Z., Sokoll, L. J., Zhang, H. & Chan, D. W. Glycoproteomics for prostate cancer detection: Changes in serum PSA glycosylation patterns. *J. Proteome Res.* **8**, 613–619 (2009).
  45. Filella, X. & Foj, L. Prostate cancer detection and prognosis: From prostate specific antigen (PSA) to exosomal biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
  46. Groskopf, J. *et al.* APTIMA PCA3 molecular urine test: Development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin. Chem.* **52**, 1089–1095 (2006).
  47. ExoDx Prostate cancer test patient information: ExosomeDx. <https://www.exosomedx.com/patients/exodx-prostate-test>.
  48. Lomas, D. J. & Ahmed, H. U. All change in the prostate cancer

- diagnostic pathway. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **17**, 372–318 (2020).
49. Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H. & Tang, W. H. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* **9**, (2019).
  50. SelectMDx for prostate cancer | MDxHealth. <https://mdxhealth.com/selectmdx-physician/>.
  51. Glavey, S. V. *et al.* The cancer glycome: carbohydrates as mediators of metastasis. *Blood Rev.* **29**, 269–279 (2015).
  52. Pinho, S. S. & Reis, C. A. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 540–555 (2015).
  53. Marth, J. D. & Grewal, P. K. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 874–887 (2008).
  54. Varki, Ajit; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Freeze, H. H.; Stanley, P.; Bertozzi, C. R.; Hart, G. W.; Etzler, M. & E. *Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor (NY)* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015).
  55. Engelking, L. R. Glycoproteins and glycolipids. in *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry* 130–135 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/b978-0-12-391909-0.50020-7.
  56. Stowell, S. R., Ju, T. & Cummings, R. D. Protein glycosylation in cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **10**, 473–510 (2015).
  57. Meezan, E., W U, H. C., Black, P. H. & Robbins, P. W. Comparative Studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. 11. Separation of Glycoproteins and Glycopeptides by Sephadex Chromatography. *Biochemistry* **8**, 2518–2524 (1969).
  58. Kim, Y. J. & Varki, A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj. J.* **14**, 569–576 (1997).
  59. Tanaka, F. *et al.* Prognostic significance of polysialic acid expression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **61**, 1666–70 (2001).
  60. Schneider, M., Al-Shareffi, E. & Haltiwanger, R. S. Biological functions of fucose in mammals. *Glycobiology* **27**, 601–618 (2017).
  61. Dennis, J. W., Laferté, S., Waghorne, C., Breitman, M. L. & Kerbel,

- R. S.  $\beta$ 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* (80- ). **236**, 582–585 (1987).
62. Kudelka, M. R., Ju, T., Heimbürg-Molinario, J. & Cummings, R. D. Simple sugars to complex disease-mucin-type O-glycans in cancer. *Adv. Cancer Res.* **126**, 53–135 (2015).
63. Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K. & Kimura, N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.* **95**, 377–384 (2004).
64. Drake, P. M. *et al.* Sweetening the pot: Adding glycosylation to the biomarker discovery equation. *Clin. Chem.* **56**, 223–236 (2010).
65. Munkley, J. & Elliott, D. J. Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget* **7**, 35478–35489 (2016).
66. Tkac, J. *et al.* Prostate-specific antigen glycoprofiling as diagnostic and prognostic biomarker of prostate cancer. *Interface Focus* **9**, 20180077 (2019).
67. White, K. Y. *et al.* Glycomic characterization of prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase in prostate cancer and benign disease seminal plasma fluids. *J. Proteome Res.* **8**, 620–630 (2009).
68. Leymarie, N. *et al.* Interlaboratory study on differential analysis of protein glycosylation by mass spectrometry: The ABRF glycoprotein research multi-institutional study 2012. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 2935–2951 (2013).
69. Song, E. *et al.* Characterization of the glycosylation site of human PSA Prompted by missense mutation using LC-MS/MS. *J. Proteome Res.* **14**, 2872–2883 (2015).
70. Prakash, S. & Robbins, P. W. Glycotyping of prostate specific antigen. *Glycobiology* **10**, 173–176 (2000).
71. Tabarés, G. *et al.* Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cancer sera in relation to seminal plasma PSA. *Glycobiology* **16**, 132–145 (2006).
72. Drake, R. R., Jones, E. E., Powers, T. W. & Nyalwidhe, J. O. Altered glycosylation in prostate cancer. *Adv. Cancer Res.* **126**, 345–382 (2015).
73. Chen, Z., Gulzar, Z. G., St. Hill, C. A., Walcheck, B. & Brooks, J. D.

- Increased expression of GCNT1 is associated with altered O-glycosylation of PSA, PAP, and MUC1 in human prostate cancers. *Prostate* **74**, 1059–1067 (2014).
74. Kim, H. *et al.* Measurement of glycosylated alpha-fetoprotein improves diagnostic power over the native form in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* **9**, (2014).
75. Banazadeh, A., Veillon, L., Wooding, K. M., Zabet-moghaddam, M. & Mechref, Y. Recent advances in mass spectrometric analysis of glycoproteins. *Electrophoresis* **38**, 162–189 (2017).
76. Svarovsky, S. A. & Joshi, L. Cancer glycan biomarkers and their detection-past, present and future. *Anal. Methods* **6**, 3918–3936 (2014).
77. Mulloy, B., Dell, A., Stanley, P. & Prestegard, J. H. Structural Analysis of Glycans. in *Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017). doi:10.1101/GLYCOBIOLOGY.3E.050.
78. Bănică, F. G. *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*. (John Wiley and Sons, 2012). doi:10.1002/9781118354162.
79. Pihíková, D., Kasák, P. & Tkac, J. Glycoprofiling of cancer biomarkers: Label-free electrochemical lectin-based biosensors. *Open Chem.* **13**, 636–655 (2015).
80. Springsteen, G. & Wang, B. A detailed examination of boronic acid-diol complexation. *Tetrahedron* **58**, 5291–5300 (2002).
81. Wu, X. *et al.* Selective sensing of saccharides using simple boronic acids and their aggregates. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 8032–8048 (2013).
82. Tommasone, S. *et al.* The challenges of glycan recognition with natural and artificial receptors. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 5488–5505 (2019).
83. Sterner, E., Flanagan, N. & Gildersleeve, J. C. Perspectives on anti-glycan antibodies gleaned from fevelopment of a community Resource Database. *ACS Chem. Biol.* **11**, 1773–1783 (2016).
84. Hong, X. *et al.* Sugar-binding proteins from fish: Selection of high affinity ‘lambodies’ that recognize biomedically relevant glycans. *ACS Chem. Biol.* **8**, 152–160 (2013).

85. MacKenzie, C. R. *et al.* Analysis by surface plasmon resonance of the influence of valence on the ligand binding affinity and kinetics of an anti-carbohydrate antibody. *J. Biol. Chem.* **271**, 1527–1533 (1996).
86. Berg, M. J., Tymoczko, L. J. & Stryer, L. Lectins are specific carbohydrate-binding proteins. in *Biochemistry* 477–480 (W H Freeman, 2002).
87. Santos, A. F. S. *et al.* Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. *Curr. Top. Pept. Protein Res.* **15**, 41–62 (2014).
88. Mody, R., Joshi, S. H. antara. & Chaney, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **33**, 1–10 (1995).
89. Hirabayashi, J. & Arai, R. Lectin engineering: The possible and the actual. *Interface Focus* **9**, (2019).
90. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (80- )*. **249**, 505–510 (1990).
91. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822 (1990).
92. Mascini, M., Palchetti, I. & Tombelli, S. Nucleic acid and peptide aptamers: Fundamentals and bioanalytical aspects. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 1316–1332 (2012).
93. Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.* **24**, 381–403 (2007).
94. Sun, W., Du, L. & Li, M. Aptamer-Based Carbohydrate Recognition. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 2269–2278 (2010).
95. Dunn, M. R., Jimenez, R. M. & Chaput, J. 2017 NATURE Reviews Chem analysis of aptamer discovery and technology. *Nat. Rev. Chem.* **1**, (2017).
96. Jeong, S., Eom, T. Y., Kim, S. J., Lee, S. W. & Yu, J. In vitro selection of the RNA Aptamer against the Sialyl Lewis X and its inhibition of the cell adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 237–243 (2001).

97. Li, M. *et al.* Selecting aptamers for a glycoprotein through the incorporation of the boronic acid moiety. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12636–12638 (2008).
98. Lao, Y. H., Chiang, H. Y., Yang, D. K., Peck, K. & Chen, L. C. Selection of aptamers targeting the sialic acid receptor of hemagglutinin by epitope-specific SELEX. *Chem. Commun.* **50**, 8719–8722 (2014).
99. Ferreira, C. S. M., Cheung, M. C., Missailidis, S., Bisland, S. & Gariépy, J. Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **37**, 866–876 (2009).
100. Rose, C. M. *et al.* Capillary electrophoretic development of aptamers for a glycosylated VEGF peptide fragment. *Analyst* **135**, 2945–2951 (2010).
101. Manabe, Y. *et al.* The core fucose on an IgG antibody is an endogenous ligand of Dectin-1. *Angew. Chemie* **58**, 18697–18702 (2019).
102. Jeong, S., Han, S. R., Lee, Y. J. & Lee, S. W. Selection of RNA aptamers specific to active prostate-specific antigen. *Biotechnol. Lett.* **32**, 379–385 (2010).
103. Svobodova, M., Bunka, D. H. J., Nadal, P., Stockley, P. G. & O’Sullivan, C. K. Selection of 2’F-modified RNA aptamers against prostate-specific antigen and their evaluation for diagnostic and therapeutic applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 9149–9157 (2013).
104. Savory, N., Abe, K., Sode, K. & Ikebukuro, K. Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 1386–1391 (2010).
105. Park, J. W. *et al.* Acousto-microfluidics for screening of ssDNA aptamer. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
106. Li, M. *et al.* Epitope binning assay using an electron transfer-modulated aptamer sensor. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 341–349 (2018).
107. Damborska, D. *et al.* Nanomaterial-based biosensors for detection of prostate specific antigen. *Microchim. Acta* **184**, 3049–3067 (2017).

108. Ghorbani, F., Abbaszadeh, H., Dolatabadi, J. E. N., Aghebati-Maleki, L. & Yousefi, M. Application of various optical and electrochemical aptasensors for detection of human prostate specific antigen: A review. *Biosens. Bioelectron.* **142**, (2019).
109. Negahdary, M., Sattarahmady, N. & Heli, H. Advances in prostate specific antigen biosensors-impact of nanotechnology. *Clin. Chim. Acta* **504**, 43–55 (2020).
110. Chang, Y., Wang, M., Wang, L. & Xia, N. Recent progress in electrochemical biosensors for detection of prostate-specific antigen. *Int. J. Electrochem. Sci.* **13**, 4071–4084 (2018).
111. Jolly, P., Formisano, N. & Estrela, P. DNA aptamer-based detection of prostate cancer. *Chem. Pap.* **69**, 77–89 (2015).
112. Jolly, P. *et al.* DNA aptamer-based sandwich microfluidic assays for dual quantification and multi-glycan profiling of cancer biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* **79**, 313–319 (2016).
113. Xia, N. *et al.* Sandwich-type electrochemical biosensor for glycoproteins detection based on dual-amplification of boronic acid-gold nanoparticles and dopamine-gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **43**, 155–159 (2013).
114. Glycanostics Ltd. <https://www.glycanostics.com/>.
115. Johnsson, B., Lofas, S. & Lindquist, G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem* **198**, 268–277 (1991).
116. Dong, Y. *et al.* Introduction of SELEX and important SELEX variants. in *Aptamers for Analytical Applications* 1–25 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2018). doi:10.1002/9783527806799.ch1.
117. Vanbrabant, J., Leirs, K., Vanschoenbeek, K., Lammertyn, J. & Michiels, L. ReMelting curve analysis as a tool for enrichment monitoring in the SELEX process. *Analyst* **139**, 589–595 (2014).
118. Afgan, E. *et al.* The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* **46**, W537–W544 (2018).
119. Thiel, W. H. & Giangrande, P. H. Analyzing HT-SELEX data with the Galaxy Project tools - A web based bioinformatics platform for



- biomedical research. *Methods* **97**, 3–10 (2016).
120. Hoinka, J., Backofen, R. & Przytycka, T. M. AptaSUITE: A full-featured bioinformatics framework for the comprehensive analysis of aptamers from HT-SELEX experiments. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **11**, 515–517 (2018).
  121. Carothers, J. M., Oestreich, S. C. & Szostak, J. W. Aptamers selected for higher-affinity binding are not more specific for the target ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7929–7937 (2006).
  122. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406–3415 (2003).
  123. Kobayashi, Y. *et al.* A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. *J. Biol. Chem.* **287**, 33973–33982 (2012).
  124. Damborský, P., Zámorová, M. & Katrlík, J. Determining the binding affinities of prostate-specific antigen to lectins: SPR and microarray approaches. *Proteomics* **16**, 3096–3104 (2016).
  125. Reynolds, M. & Pérez, S. Thermodynamics and chemical characterization of protein-carbohydrate interactions: The multivalency issue. *Comptes Rendus Chim.* **14**, 74–95 (2011).
  126. Robinson, P. V., Tsai, C. T., De Groot, A. E., McKechnie, J. L. & Bertozzi, C. R. Glyco-seek: Ultrasensitive detection of protein-specific glycosylation by proximity ligation polymerase chain reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 10722–10725 (2016).
  127. Li, J. *et al.* Amplified visualization of protein-specific glycosylation in Zebrafish via proximity-induced hybridization chain reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 16589–16595 (2018).
  128. Varki, A. C. R. D. . E. J. D. . F. H. H. . S. P. . B. C. R. . H. G. W. . E. M. & E. *Essentials of Glycobiology, 3rd edition.* Cold Spring Harbor (NY) (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015).
  129. Do Nascimento, A. S. F. *et al.* Algal lectin binding to core ( $\alpha$ 1-6) fucosylated N-glycans: Structural basis for specificity and production of recombinant protein. *Glycobiology* **25**, 607–616 (2015).
  130. Bochman, M. L., Paeschke, K. & Zakian, V. A. DNA secondary

- structures: Stability and function of G-quadruplex structures. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 770–780 (2012).
131. Kikin, O., D'Antonio, L. & Bagga, P. S. QGRS Mapper: A web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**, W676–W682 (2006).
  132. Vorlíčková, M., Kejnovská, I., Bednářová, K., Renčiuk, D. & Kypr, J. Circular dichroism spectroscopy of DNA: From duplexes to quadruplexes. *Chirality* **24**, 691–698 (2012).
  133. del Villar-Guerra, R., Trent, J. O. & Chaires, J. B. G-Quadruplex secondary structure obtained from circular dichroism spectroscopy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **57**, 7171–7175 (2018).
  134. Mergny, J. L. & Lacroix, L. UV melting of G-quadruplexes. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* (2009) doi:10.1002/0471142700.nc1701s37.
  135. Mergny, J.-L., Phan, A.-T. & Lacroix, L. Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.* **435**, 74–78 (1998).
  136. Wang, W., Soriano, B. & Chen, Q. Glycan profiling of proteins using lectin binding by Surface Plasmon Resonance. *Anal. Biochem.* **538**, 53–63 (2017).
  137. Krüger, A., Zimbres, F., Kronenberger, T. & Wrenger, C. Molecular modeling applied to nucleic acid-based molecule development. *Biomolecules* **8**, 83 (2018).
  138. Popena, M. *et al.* Automated 3D structure composition for large RNAs. *Nucleic Acids Res.* **40**, e112–e112 (2012).
  139. Stura, E. A. *et al.* Crystal structure of human prostate-specific antigen in a sandwich antibody complex. *J. Mol. Biol.* **414**, 530–544 (2011).
  140. Morris, G. M. *et al.* Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
  141. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
  142. Cabanettes, A., Perkams, L., Spies, C., Unverzagt, C. & Varrot, A. Recognition of complex core-fucosylated N-glycans by a mini

- lectin. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **57**, 10178–10181 (2018).
143. McJimpsey, E. L. Molecular form differences between Prostate-Specific Antigen (PSA) standards create quantitative discordances in PSA ELISA measurements. *Sci. Rep.* **6**, 1–8 (2016).
144. Leerapun, A. *et al.* The utility of Lens Culinaris Agglutinin-reactive  $\alpha$ -Fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: evaluation in a United States referral population. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 394–402 (2007).
145. Füzéry, A. K., Levin, J., Chan, M. M. & Chan, D. W. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: Issues and challenges. *Clin. Proteomics* **10:13**, (2013).
146. Gish, R. G. Early detection of hepatocellular carcinoma through surveillance using biomarkers. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)* **10**, 121–3 (2014).
147. Lasia, A. & Lasia, A. Definition of Impedance and Impedance of Electrical Circuits. in *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications* 7–66 (Springer New York, 2014). doi:10.1007/978-1-4614-8933-7\_2.
148. Lisdat, F. & Schäfer, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 1555–1567 (2008).
149. Ibañeta, C. *et al.* Gold interdigitated triple-microelectrodes for label-free prognostic aptasensing of prostate cancer biomarker in serum. *Biosens. Bioelectron.* **136**, 118–127 (2019).
150. Jolly, P. *et al.* Label-free impedimetric aptasensor with antifouling surface chemistry: A prostate specific antigen case study. *Sensors Actuators B Chem.* **209**, 306–312 (2015).
151. Zeng, S. *et al.* A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. *Plasmonics* **6**, 491–506 (2011).
152. Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X. & Rotello, V. M. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chem. Rev.* **112**, 2739–2779 (2012).
153. Jolly, P. *et al.* Self-assembled gold nanoparticles for impedimetric and amperometric detection of a prostate cancer biomarker. *Sensors Actuators, B Chem.* **251**, 637–643 (2017).

154. Amaya-González, S. *et al.* Affinity of aptamers binding 33-mer gliadin peptide and gluten proteins: Influence of immobilization and labeling tags. *Anal. Chim. Acta* **873**, 63–70 (2015).
155. Daniel, C., Roupioz, Y., Gasparutto, D., Livache, T. & Buhot, A. Solution-Phase vs Surface-Phase aptamer-protein affinity from a label-free kinetic biosensor. *PLoS One* **8**, e75419 (2013).
156. Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N. & Lobo-Castañón, M. J. Characterization of aptamer-ligand complexes. in *Aptamers for Analytical Applications* 127–172 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2018). doi:10.1002/9783527806799.ch4.
157. Li, Q. K. *et al.* Serum fucosylated prostate-specific antigen (PSA) improves the differentiation of aggressive from non-aggressive prostate cancers. *Theranostics* **5**, 267–276 (2015).
158. Munkley, J., Mills, I. G. & Elliott, D. J. The role of glycans in the development and progression of prostate cancer. *Nature Reviews Urology* (2016) doi:10.1038/nrurol.2016.65.

# ANEXOS

# A1. Reactivos e instrumentación

## A1.1 Reactivos

Las secuencias de ADN fueron sintetizadas por Metabion (Alemania) en formato liofilizado y purificadas por HPLC, excepto la colección inicial de secuencias que fue sintetizada por Sigma-Life Science (Spain), purificada por PAGE y suministrada en formato desalado. Todas las secuencias de ADN empleadas en la presente Tesis Doctoral se recogen en la Tabla A1.1.

Tabla A1.1 Secuencias de ADN empleadas en la Tesis Doctoral.

Nombre	Secuencia
Colección inicial	AGGGTTGATAGGTTAAGAGC(N) <sub>40</sub> CGATGTCAACTAGCTGTTGG
Cebador directo	AGGGTTGATAGGTTAAGAGC
Cebador inverso	CCAACAGCTAGTTGACATCG
PSA-1	GGACGGTTGCGCTATATTTAACCAAAAGTCTGGATTAACA
PSA-2	TGACGGTGATGGATGCCATCGCTGTACGATATTTGTGACA
PSA-3	GCTATCTGGTGGTTGGTGTAGTTGCGTGGGTTTGTTAATG
PSA-4	AAACAGCGGTCCCCATGGGGTCATGCACCACCGGGGTCT
PSA-5	GGTCAAGTCTCGTTAAGTCGACTGTATTCTTCAGGCGCCT
PSAG-1	GAGCGGGGTTGCTGGGATGATAAGGCCCTTTGATGTCTG
PSAG-2	GGACGGCTCTGTTATAAGTGACAGATCTGGACGTAACATT
PSAG-3	CAGCTATCACGATGAGCCTTGCACTAGGGTTGATAGGTTAAGAG
T-PSAG-1	GAGCGGGGTTGCTGGGATGATAAGGCCCTTT
Anti-PSA	TTTTTAATTAAGCTCGCCATCAAATAGCTTT
Secuencia irrelevante	GGTCCTGGGAGACGAACAACCCCGTCACAAGCCTCGTAG

El Antígeno Específico de la Próstata (PSA) de fluido seminal se compró a BBI Solutions (Reino Unido). La proteína humana PSA recombinante obtenida en *Escherichia coli* (ab126692) y la Lipocalina-2 humana (NGAL) obtenida de células HEK 293 (ab167728) se obtuvieron de Abcam (Reino Unido). La alfa-fetoproteína humana (AFP) purificada de suero de cordón umbilical humano (PRO-406) se compró a Prospec (Israel).

La lectina PhoSL fue una donación del Prof. Rafael de Llorens. Esta proteína se puede obtener de forma recombinante mediante síntesis química, manteniendo las propiedades de reconocimiento, con la siguiente secuencia:

NH<sub>2</sub>- APVPVTKLVCDGDTYKCTAYLDFGDGRWVAQWDTNVFHTG-OH

Las enzimas glicosidasas: neuraminidasa-A (P0722S), β-galactosidasa (P0746S), N-acetilhexosaminidasa (P0744), manosidasa (P0768S), fucosidasa (P0748S) y PNGaseF (P0704S) se compraron en New England Biolabs (EEUU).

Los nucleótidos (dNTPs), la ADN polimerasa immolasa, la disolución tamponada y la sal de magnesio para la PCR se obtuvieron de Bionline (Reino Unido). El tampón TBE 5× (0.45 M Tris-Borato, 0.01 M EDTA pH 8.3) se adquirió en 5 Prime (Maryland, EEUU) y el tampón de carga de ADN en geles 6× se adquirió de Novagen (San Diego, EEUU).

El reactivo de Bradford 5× se compró en SERVA Electrophoresis (Alemania).

El etanol absoluto (100%) y el fluoróforo EVAgreen se obtuvieron de VWR (España y Reino Unido).

Los reactivos de Merck (Alemania) se recogen en la Tabla A1.2.

Tabla A1.2: Lista de reactivos de Merck.

Reactivos de Merck (Alemania)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Acetato de sodio	Ácido acético

Los reactivos comprados en Sigma-Aldrich se recogen en la *Tabla A1.3*.

Tabla A1.3: Lista de reactivos de la casa comercial Sigma-Aldrich.

Reactivos de Sigma-Aldrich (España y Reino Unido)	
Patrón certificado de PSA (BCR®-613)* [PSA] = 71 ± 7 µg/mL	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *
Buffer de fosfato PBS 10× pH 7.4*	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *
Tris-HCl 10× pH 7.4*	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *
Hidróxido de sodio 1 M*	NaCl*
Albúmina de suero bovino (BSA)*	KCl*
ARN de transferencia (tRNA)*	MgCl <sub>2</sub> 1 M*
3,3,5,5-tetrametilbencidina (TMB)	Etanolamina
Hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC)	N-hidroxisuccinimida (NHS)
fragmento Fab-antifluoresceína-peroxidasa (Roche)	Suero humano de plasma de hombre AB
Ácido 11-mercapto-1-undecanoico	Estreptavidina
L-(-)-fucosa 99% grado puro	Tween-20
Hidrocloreuro de 11-amino-1-undecanotiol *	Nanopartículas de oro (20 nm de diámetro, estabilizadas)
Pastillas de PBS*	6-mercapto-1-hexanol
Hexacianoferrato de potasio (III)	Peróxido de hidrógeno 30 %
Hexacianoferrato de potasio (II)	Hidróxido de amonio 30 %
Acetona	Transferrina
Albúmina de suero humano (HSA)	Ovoalbumina

\* Reactivos con grado de biología molecular



Los reactivos que se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific se recogen en la *Tabla A1.4*.

Tabla A1.4: Lista de reactivos de Thermo-Fisher Scientific.

Reactivos de Thermo-Fisher Scientific (España)	
Partículas magnéticas Dynabeads™ MyOne™ estreptavidina C1 (1 µm diámetro) (Invitrogen)	Partículas magnéticas tosilactivadas M-280 (2.8 µm diámetro) (Invitrogen)
Caseína al 1 % en PBS	Caseína al 1 % en TBS
Fluoróforo ROX	Fluoróforo SYBRGreen
Ácido sulfúrico (95-98 %) (J.T.Baker)	

Los controles multianálito en suero Lyphochek® Immunoassay Plus Control 4 para inmunoensayos (niveles 2 y 3) fueron donados por el Dr. Eloy Fernández-Rodríguez del laboratorio de análisis clínico del Hospital de Cabueñes (Gijón, España). Los 92 analitos que componen los controles se recogen en la *Tabla A1.5*.

Tabla A1.5: Composición de los controles BIO-RAD.

Analitos del control BIO-RAD		
25-Hidroxi Vitamina D	Estrógeno (Total)	Fenitoína (Libre)
11-Desoxicortisol	Etosuximida	Primidona
17-α-Hidroxiprogesterona	Ferritina	Procainamida
Paracetamol	Flecainida	Progesterona
ACTH	Folato	Prolactina
Aldosterona	Fructosamina	Propranolol
α-fetoproteína (AFP)	FSH	PSA

Amikacina	Gastrina	PSA (Libre)
Amiodarona	Gentamicina	PTH (Intacto)
Amitriptilina	Glucagón	Quinidina
Androstenediona	hCG	Salicilato
Angiotensina I	Subunidad hCG- $\beta$	Globulina fijadora de hormonas sexuales
Anti-Tiroglobulina (Anti-Tg)	hGH	Somatomedina-C
Anti-Tiroperoxidasa (Anti-TPO)	Imipramina	T3 (Libre)
Péptido-C	Inmunoglobulina A (IgA)	T3 (Total)
Cafeína	Inmunoglobulina E (IgE)	T3 captado/T-captado
Calcitonina	Inmunoglobulina G (IgG)	T4 (Libre)
Carbamazepina	Inmunoglobulina M (IgM)	T4 (Total)
Carbamazepina (Libre)	Tripsinógeno inmunoreactivo	TBG
CEA	Insulina	Testosterona
Cloranfenicol	Hierro	Testosterona (Libre)
Cortisol	Hierro (TIBC)	Teofilina
Ciclosporina	LH	Tiroglobulina (Tg)
Desipramina	Lidocaína	Tobramicina
DHEA	Litio	Antidepresivos tricíclicos
Sulfato DHEA	N-Acetilprocainamida (NAPA)	TSH
Digoxina	Netilmicina	Ácido valproico
Disopiramida	Nortriptilina	Ácido valproico (Libre)
Estradiol	PAP	Vancomicina

Estriol (Libre)	Fenobarbital	Vitamina B12
Estriol (Total)	Fenitoína	

## A1.2 Disoluciones

Todas las disoluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura obtenida con un sistema MilliQ (Millipore, España). En la *Tabla A1.6* se recogen todas las disoluciones reguladoras empleadas, su composición y la abreviatura que se usa en el texto.

Tabla A1.6 :Composición y nombre de las disoluciones reguladoras empleadas a lo largo de la presente Tesis Doctoral.

Nombre	Composición
BLmod	PBS 1× + 0.5 % BSA
BLmod2	PBS 1× + 0.1 % BSA
BLstrep	10 mM Tris-HCl, 2 M NaCl + 0.01 % Tween-20
BM	19 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 81 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.4
BM2	3 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 7.4
BS / PBS / PBS-Na <sup>+</sup>	PBS 1× + 0.154 M NaCl, pH 7.4
BSL	BS+ 0.01 % Tween-20
NaAc	10 mM acetato sódico, pH 5.5
TBS	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7.4
PBS-K <sup>+</sup>	0.01 M fosfato + 0.154 M KCl, pH 7.4
PBS-EIS	PBS 1× + 2.7 mM KCl, pH 7.4

### A1.3 Instrumentos y equipos

Las medidas electroquímicas se realizaron en un  $\mu$ Autolab tipo III/FRA2, un  $\mu$ Autolab tipo II y un Autolab Pgstat-12 con un módulo FRA2 para las medidas de impedancias, conectados a un ordenador con el software NOVA 2.1 (Methrom, Países Bajos). Los electrodos serigrafados de oro (DRP-220BT) y carbono (DRP-110) se compraron en Metrohm-Dropsens (España).

Las medidas de resonancia de plasmón superficial (SPR) se llevaron a cabo utilizando un equipo de SPR Autolab ESPRIT (Methrom, Países Bajos) equipado con una cubeta con dos canales y un automuestreador, controlado con el Software Data Acquisition (versión 4.4) La temperatura de la celda se controló con un termostato HaakeD1 (Alemania). Los discos de oro del SPR se obtuvieron de XanTec bioanalytics (Alemania).

Para la separación magnética de las partículas se empleó un imán DynaMag-2 de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) y para las etapas de incubación se utilizó un Thermomixer (Eppendorf Ibérica, España).

Las medidas de absorbancia se realizaron en un equipo Carry 60 UV-VIS (Agilent Technologies) y Genesys 10 S UV-VIS (Thermo Fisher) equipado con una cubeta ultra-micro de cuarzo (Sigma-Aldrich).

La PCR se realizó en un sistema GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems, Life Technologies). Las curvas de *remelting* se realizaron en un sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). Las medidas fluorescentes se realizaron en un fluorímetro Qubit® 2.0 de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) y en un fluorímetro con lector de microplacas (Biotek Instrument FLx800, Biotek, VT).

La secuenciación masiva se realizó en un secuenciador IonTorrent™ Personal Genome Machine® (PGM) (Thermo Fisher Scientific).

Para purificar el producto de PCR se utilizó un kit de purificación MinElute (Qiagen). Para la clonación se empleó el kit Cloning® Dual

Promoter y las células competentes One Shot<sup>®</sup> de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). La secuenciación se realizó el analizador genético Applied Biosystem-Hitachi 3130xl.

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco, Alemania) en una cubeta de cuarzo de 2 mm y a temperatura controlada con un sistema Peltier.

La limpieza con plasma de oxígeno se llevó a cabo en una cámara Diener Plasma (Zepto, Alemania). Para la fabricación de los electrodos evaporados de oro se empleó el evaporador térmico BOC Edwards (EEUU).



## A2. Producción científica

Los resultados obtenidos a lo largo de la presente Tesis Doctoral se han publicado en revistas internacionales revisadas por pares y se han presentado en congresos científicos tanto internacionales como nacionales.

### A2.1 Artículos científicos

- A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón & P. Estrela. Impedimetric Aptamer-based Glycan PSA Score for Discrimination of Prostate Cancer from other Prostate Diseases. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, submitted.
- A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. Díaz, D. Suárez, N. de-los-Santos-Álvarez & M. J. Lobo-Castañón. Aptamers targeting protein-specific glycosylation in tumor biomarkers: general selection, characterization and structural modelling. *Chemical Science*, 2020, 11, 9402-9413.  
<https://doi.org/10.1039/D0SC00209G> **Featured as back cover**
- A. Díaz-Fernández, R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez & M. J. Lobo-Castañón. Electrochemical aptasensors for cancer diagnosis in biological fluids - A review. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1124, 1-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.022>
- A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, E. Fernández-Rodríguez & M. J. Lobo-Castañón. Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: Toward more specific detection of prostate cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 128, 83-90.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.040>
- A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez & M.J. Lobo-Castañón. Post-translational modifications in tumor

biomarkers: the next challenge for aptamers? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410, 2059-2065.

<https://doi.org/10.1007/s00216-018-0861-9>

## A2.2 Participación en congresos

### A2.2.1 Congresos internacionales

- **71<sup>st</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry** (31 de agosto- 4 de septiembre de 2020, Online). “Detection of cancer-related glycosylation changes in prostate specific antigen using electrochemical label-free aptasensors” (A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, P. Estrela, N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón). **Presentación oral.**
- **C3Bio Bath Conference on Biosensors, Bioelectronics and Biodevices 2019 & C3Bio/IBST Joint Event.** (9-10 de septiembre de 2019, Bath). “*Electrochemical aptasensor for the detection of cancer-related glycosylation changes in prostate specific antigen*”. (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón). **Presentación oral.**
- **XXII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica** (17-19 de julio de 2019, Valladolid). “*Aptámeros para el reconocimiento del patrón de glicosilación en proteínas: aplicación a la detección del cáncer de próstata*”. (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez; M.J. Lobo-Castañón). **Presentación oral.**
- **6<sup>th</sup> ECBS/LS EuChem S.** (3-5 de abril de 2019, Madrid) “*Selection of aptamers recognizing the glycosylation site of PSA: aptasensors for detection of cancer-related glycosylation changes*”. (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez; M.J. Lobo-Castañón) **Presentación flash.**



- **2<sup>nd</sup> European Biosensor Symposium.** (18-21 de febrero de 2019, Florencia). *“Aptamer based electrochemical sensors for the analysis of tumor biomarkers”*. (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez; M.J. Lobo-Castañón). **Presentación oral.**
- **VII seminarios de doctorado internacionales** (4-5 de julio de 2018, Mieres). *“Selection of molecules that adapt to proteins for the early diagnosis of prostate cancer”*. (A. Díaz-Fernández). **Presentación oral y póster.**
- **17<sup>th</sup> ESEAC 2018 International Conference on Electroanalysis** (3-7 de junio de 2018, Rodas). *“Detection of cancer-related glycosylation changes in Prostate Specific Antigen using aptasensors”*. (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez; M.J. Lobo-Castañón). **Presentación oral.**
- **I Workshop on Electrochemistry devices. II Workshop electrobionet- University of Oviedo** (9-10 de noviembre de 2017, Mieres). *“Selection of aptamers recognizing aberrant PSA glycosylation”*. (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez; M.J. Lobo-Castañón). **Póster.**
- **Mátrafüred 2017- International Conference on Electrochemical Sensors** (12 de junio de 2016, Visegrado). *“Aptasensors for glycoprotein tumor markers: new tools for cancer diagnostics”*. (A-Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez; M.J. Lobo-Castañón). **Presentación oral.**

#### A2.2.1 Congresos nacionales

- **VI seminarios de doctorado del G-9** (11-13 de abril de 2018, Santander). *“Selection of molecules that adapt to proteins for the early diagnosis of prostate cancer”*. (A. Díaz-Fernández). **Póster.**
- **VI seminarios de doctorado** (7 de julio de 2018, Mieres). *“Selection of molecules that adapt to proteins for the early diagnosis of prostate cancer”*. (A. Díaz-Fernández). **Póster.**



# Post-translational modifications in tumor biomarkers: the next challenge for aptamers?

Ana Díaz-Fernández<sup>1</sup> · Rebeca Miranda-Castro<sup>1</sup> · Noemí de-los-Santos-Álvarez<sup>1</sup> · María Jesús Lobo-Castañón<sup>1</sup> 

Received: 13 November 2017 / Revised: 5 December 2017 / Accepted: 4 January 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

## Abstract

Advances in proteomics have fueled the search for novel cancer biomarkers with higher selectivity. Differential expression of low abundant proteins has been the usual way of finding those biomarkers. The existence of a selective receptor for each biomarker is compulsory for their use in diagnostic/prognostic assays. Antibodies are the receptors of choice in most cases although aptamers are becoming familiar because of their facile and reproducible synthesis, chemical stability as well as comparable affinity and selectivity. In recent years, it has been reported that the pattern of post-translational modifications, altered under neoplastic disease, is a better predictive biomarker than the total protein level. Among others, abnormal glycosylation is attracting great attention. Lectins and antibodies are being used for identification and detection of the carbohydrate moiety with low level of discrimination among various glycoproteins. Such level of selectivity is critical to bring next-generation biomarkers to the clinic. Aptamers that can be rationally tailored for a certain molecule domain can become the golden receptor to specifically detect aberrant glycosylation at each protein or even at each glycosylation site, providing new diagnostic tools for early detection of cancer.

**Keywords** Aptamers · Cancer diagnostics · Glycans · Tumor biomarkers

## Glycosylation: a distinctive feature of cancer

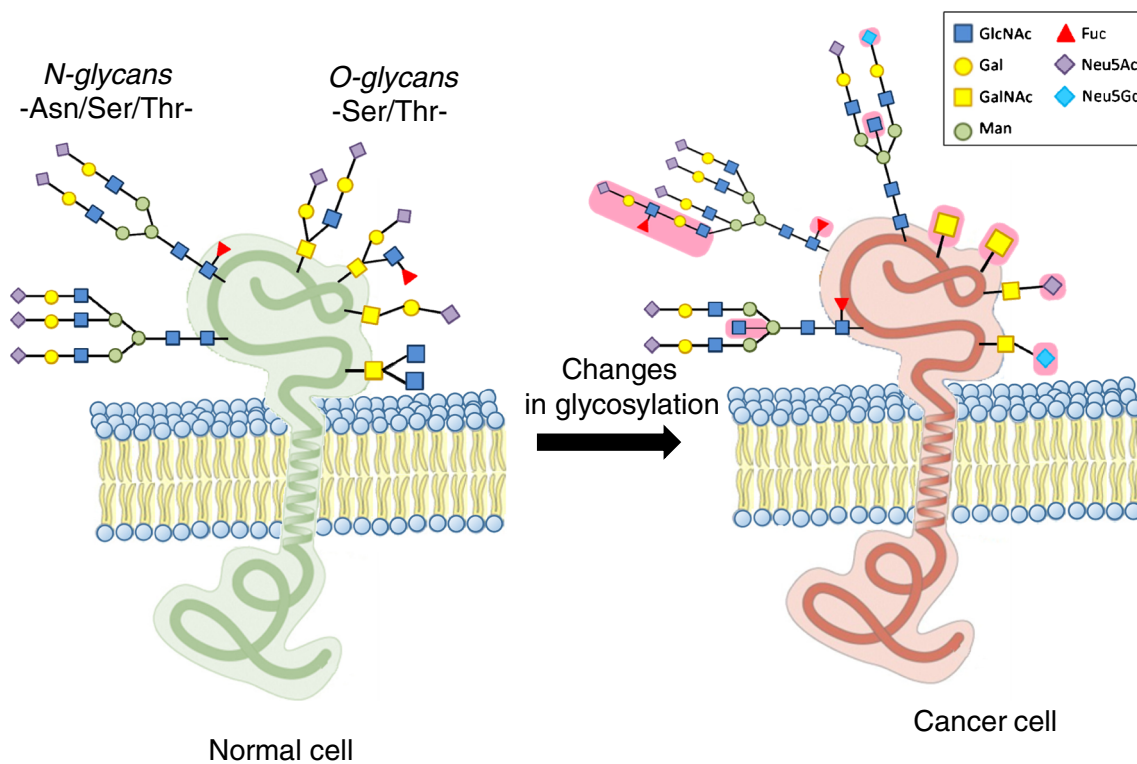
The addition of carbohydrate moieties (glycans) to proteins in the endoplasmic reticulum (N-linked glycans) or in the Golgi (O-linked glycans) is one of the most frequent post-translational events along with phosphorylation [1]. In fact, between 70 and 80% of human proteins are glycosylated [2]. Protein synthesis is led by the genomic code but the functional properties are modulated by the glycan structure. A single protein can naturally carry different glycan chains, so they exist in several glycoforms, which confers a diversity of properties with important physiological implications. The presence of side sugar chains is particularly common in proteins located in the cell surface and in the extracellular matrix and has a decisive role in the cell communication including cell adhesion, signal trafficking, extravasation, metastasis or escaping from the immune system as well as in their stability

(protection from proteases) [1]. The extension of protein glycosylation is dependent on the number of glycosylation sites in the protein sequence and the expression/activity of the enzymes involved, mainly glycosyltransferases and glycosidases, in the cell. The diverse and complex glycan structures, the glycome, make challenging their identification and quantitation, which is becoming essential to elucidate the significance in pathological conditions.

The natural variety of glycans is extended during malignant transformation of cells when the normal glycosylation machinery is altered, for example up or downregulation of the enzymes involved, leading to changes in the chemical structure of the glycan (Fig. 1). Main modifications are related to changes in linkage, hiperbranching of N-glycans or truncation of O-glycans generating sialylated tumor antigens but not restricted to them. The level of glycosylation is also of paramount importance. The degree of occupancy at each site or the extension of the presence of defined structures such sialyl derivatives or core fucoses can vary. In fact, sialylation and fucosylation are the major glycosylation changes and their level is closely related with cancer biology through modulation of several biological processes [3, 4]. Though aberrant glycosylation is not included in the eight hallmarks of cancer,

✉ María Jesús Lobo-Castañón  
mjlc@uniovi.es

<sup>1</sup> Dpto. Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain



**Fig. 1** Most common *O*- and *N*-linked protein glycosylation and changes (highlighted in pink) typically associated to malignant transformations of cells. GlcNAc, N-acetylglucosamine. Fuc, fucose. Gal, galactose.

Neu5Ac, 5-N-acetylneuraminic acid (sialic acid). GalNAc, N-acetylgalactosamine. Neu5Gc, 5-N-glycolylneuraminic acid. Man, mannose

there is a large body of evidence showing that glycans are involved in the acquisition of all these distinct tumors capabilities [5]. Some of the glycosylation changes are only specific of tumors so these unique alterations in the glycosylation pattern may serve as a distinct feature of cancer cell, providing novel diagnostic tools. Therefore, the research attention is starting to move to clinically applicable glycan features to diagnose, predict recurrence/survival (prognostic) or predict the response to therapy to aid in the implementation of a personalized medicine.

To date, the majority of FDA-approved cancer biomarkers are glycoproteins or tumor-associated carbohydrate antigens (TACAs). In general, they lack sufficient specificity (absence of false positives). Even the most successful serum biomarker, the prostatic specific antigen (PSA) that was a milestone in the diagnostic of prostatic cancer, is not specific because it is elevated in benign diseases with a gray zone of diagnostic for values between the cutoff (4 ng/mL) and 10 ng/mL. To improve sensitivity and specificity, the study of glycoforms of current biomarkers or of new ones is a promising approach. A successful case is the fucosylated  $\alpha$ -fetoprotein whose concentration in serum is more informative to discriminate hepatocellular cancer from other benign liver diseases than total  $\alpha$ -fetoprotein itself [3]. Evidences of correlation between altered glycosylation and tumor initiation, progression, and metastasis pose a persistent analytical challenge, the development of

specific analytical assays capable of recognizing the altered glycosylated target molecule as new means for early cancer diagnosis. Receptor-based assays, with emphasis in aptamer-assays that have especial potential to meet this challenge, are the focus of this feature.

## Receptors for glycan structures

The discovery of novel serum biomarkers is of paramount importance to deliver personalized cancer therapies. However, once a potential biomarker is identified, the corresponding analytical method has to be developed for its use in routine clinical practice. While glycoprofiling studies rely on enzymatic restriction, chromatographic separation and mass spectrometry analysis [6], the point-of-care detection of a defined biomarker requires other approaches. Ideally, detection methods should fulfill the ASSURED criteria (affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid and robust, equipment free and delivered to those who need it). To comply with it, receptor-based assays are the methods of choice for current biomarkers, mainly immunoassays. Usually, tumor biomarkers are in minute amounts surrounded by other proteins in concentrations several orders of magnitude higher. Therefore, high affinity biorecognition elements are needed to achieve the high sensitivity demanded. But the challenge

to recognize a small portion of the glycan that is under/overexpressed in malignant cells is even more demanding, and the recognition of changes in glycosylation patterns requires novel and more specific receptors, specifically directed towards the glycan epitopes.

Boronic acid derivatives recognize diols in the glycan structure (Fig. 2) and have been used since mid-twentieth century but they have their own intrinsic preferences unless additional functionalities are added to confer extra selectivity [7].

Nature also provides carbohydrate-reactive testing reagents, schematically represented in Fig. 2. It is possible to obtain highly specific anti-carbohydrates monoclonal antibodies [8], although many interesting glycan peptides are conserved among species and, therefore may be non-immunogenic for the mammals that often serve as vehicles for the production of monoclonal antibodies. In consequence, other vertebrates more evolutionarily distant from humans have been explored to obtain carbohydrate-binding antibodies [9]. Furthermore, antibody-carbohydrate interaction is weaker than antibody-protein one limiting the sensitivity of the assays.

Lectins, a large family of proteins of non-immune origin, are by far the most widely used receptor for glycan identification. They are isolated from natural sources in a great variety (hundreds) and show high selectivity towards defined glycosidic linkages between saccharides, thus providing structural information. They are the natural binders of carbohydrates in vivo due to their multivalency though the overall affinity is modest ( $10^{-4}$ – $10^{-7}$  M) in comparison with antibodies. The source and purity of lectins could be an issue to obtain high-

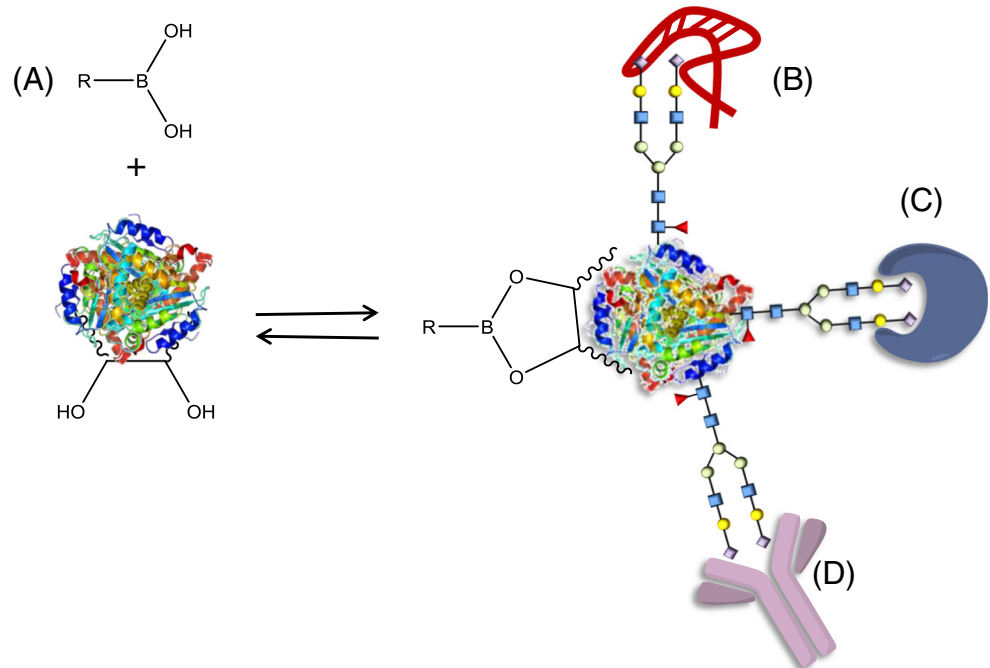
quality data. These features along with moderate cross-reactivity make the development of glycan-peptide antibodies preferable for analytical developments.

It is well recognized that neoplastic transformations nearly always imply alterations in glycan epitopes. However, many proteins secreted from tumor cells share similar changes in glycan expression. As an example above 650 core fucosylated (CF) sites were found in less than 330 CF proteins in human sera or tumor cell lines but a small proportion (less than 50 peptides) showed altered level of fucosylation to discriminate pancreatic cancer [10, 11]. This means that receptors must recognize the specific aberrant glycan at each specific site, that is, information from both carbohydrate and peptide chains is needed. Currently, those types of receptors are not available and directing antibodies to a certain region comprising both protein and glycan moieties is not an easy task. Meanwhile, mixed antibody (for protein recognition) and lectin (for glycan alteration recognition) ELISA-like assays have been developed [12].

## Aptamers for cancer glycosylated biomarkers

The ideal receptor for aberrant glycosylation such as core fucosylation should be capable of tightly bind both the amino acids near the glycosylation site and the glycan structure. Aptamers, single-stranded oligonucleotides obtained by an in vitro selection process to bind a specific target, have unique advantages to fulfill these requirements. Their small size, ~ 13 kDa for a 40 nucleotides aptamer, may favor the access to glycan epitopes. They are selected in a versatile and purely

**Fig. 2** Synthetic (A, B) and natural (C, D) receptors for glycan structures. (A) Boronic acid derivative. (B) Aptamer. (C) Lectin. (D) Antibody



(bio)chemical way, which can be designed to enhance the affinity to the subnM range as well as to drive it towards a defined region of interest through convenient and smartly designed counter selections steps. Once selected, they are obtained on larger scales than antibodies, by a chemical process that reduces the batch-to-batch variability that may lead to dramatically different results. In consequence, a variety of aptamers targeting different kinds of carbohydrates such as monosaccharides, oligo- and poly-saccharides, aminoglycoside antibiotics and glycoproteins have been described during the past quarter century [13, 14]. Despite sugars are not considered to be highly aptagenic because their structure has few charged groups and aromatic ring moieties, discrimination of a single functional group has been described for carbohydrate compounds. The aptamer for the aminoglycoside antibiotic neomycin B binds 100 times more weakly the analogue paramomycin (substitution of  $\text{NH}_2$  with OH) and its discrimination power remains when it is O-methylated to increase nuclease resistance in biological fluids [15].

Right after discovery, the non-immunogenic nature of aptamers boosts the interest as therapeutic molecules but also as novel analytical reagents for diagnostics. Clinical targets were rapidly screened and aptamers for them are currently available [14]. Aptamers for potential tumor biomarkers including some of those approved for clinical usage have been also described. Two different approaches have been devised for the selection of aptamers recognizing these targets: (i) using an individual purified form of the target or cell overexpressing the target; (ii) raising aptamers against unknown abnormal targets on the surface of tumor cells. The latter strategy called Cell-SELEX is now preferred though it requires an extra effort if knowledge of the target is finally needed. For cancer diagnostics, serum proteins are the preferential targets to keep in mind non-invasive monitoring, so the first strategy is the only option.

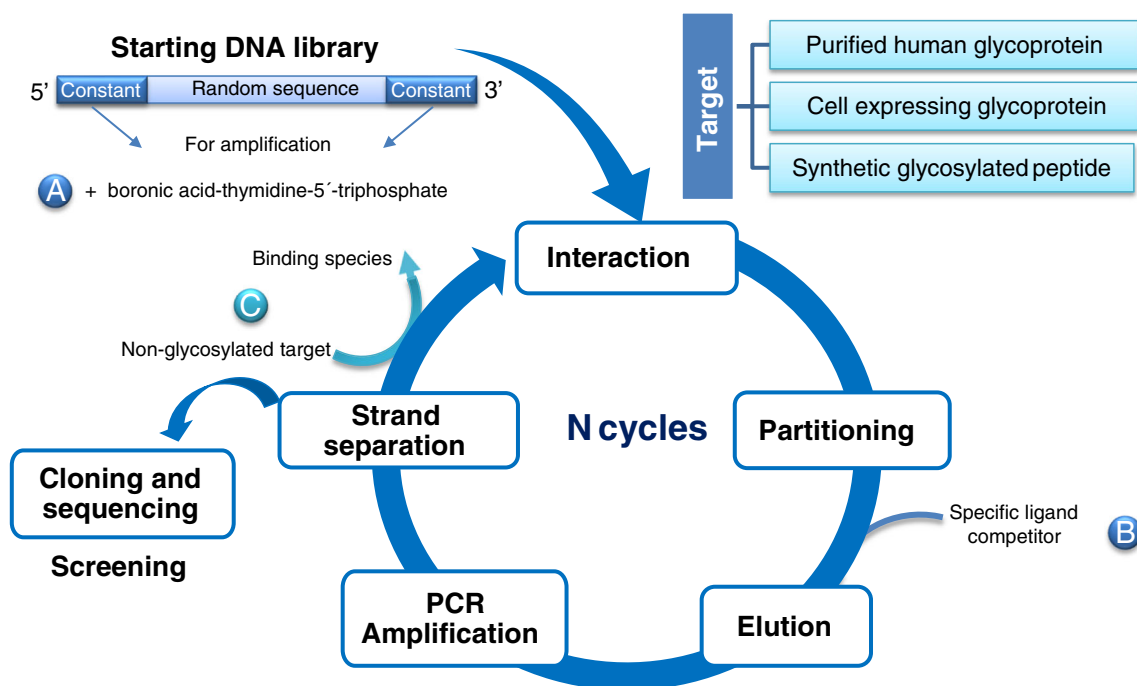
Until now, most aptamers against glycoprotein biomarkers have been obtained without directing the selection towards any specific region of the target. Consequently, in most cases it is not known whether the glycan, the peptide or both are involved in the binding. The difficulty in fully characterizing the aptamer-ligand complex is delaying this piece of relevant information. Thrombin aptamers are one of the few well characterized ones, though it is not a biomarker, and the glycosylated site is far from the aptamer recognition site [16]. Aptamers evolved against short synthetic peptides or recombinant proteins expressed in non-human cells cannot recognize the sugar chain because bacteria cannot incorporate them. Only those evolved using purified human proteins or recombinant peptides expressed in human cell lines might present such ability. However, until now, only a few aptamers were tested for sugar discrimination. An aptamer for epidermal growth factor receptor variant III EGFRvIII (uniquely expressed in glioblastoma) purified from *E. coli* did not show

any binding affinity for its highly glycosylated human counterpart but resulted of therapeutic interest because it can be internalized into the cell inducing apoptosis. The transfected aptamer blocks the unglycosylated form of EGFRvIII recently synthesized inside the cell, which cannot undergo proper glycosylation reducing the amount of the cell membrane glycosylated protein, demonstrating that aptamers can disrupt post-translational modifications of proteins [17].

Aptamers have also shown the ability to distinguish between forms of the same protein with slightly different post-translational modifications. This is the case of the aptamer recognizing cyclophilin B (CypB), selected using as a target the secretome of pancreatic cancer instead of an individual target. The aptaassay developed using this aptamer as recognition element discriminated sera from pancreatic cancer patients and healthy volunteers but failed to correlate with the CypB levels detected by an immunoassay. This fact is attributed to the recognition by the aptamer of the human form of the protein but not the one expressed in bacteria while antibody interacts with both [18].

Ultimately, the success of obtaining very strong binders that differentiate subtle differences in glycans would depend on the availability of adequate glycopeptides. Initially, it was thought that conventional SELEX protocols cannot achieve such level of directed selection and carbohydrates alone were the target. In 2001 a RNA aptamer towards sialyl Lewis X antigen overexpressed in many tumors was evolved with a surprisingly low dissociation constant ( $K_d = 3.3$  nM) but the original DNA pool already had a relatively high affinity ( $K_d = 170$  nM) [19]. Selectivity against other Lewis antigens was only 5 to 10 fold higher. After this early success, aptamers derived against mono-, di- and oligosaccharides showed high dissociation constants because they lack charged groups or aromatic rings that are the source of hydrophobic, ionic and hydrogen-bonding main interactions of aptamers with their ligands. Besides, the intrinsic flexibility of carbohydrate is less amenable to strong binding. More recently, unmodified RNA and DNA aptamers for negatively charged sialic acid N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and a tumor-related derivative N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) exhibited 1.35 [20] and 0.15 nM [21] affinity, respectively. They probably benefited from covalent immobilization instead of random binding of the target during selection to facilitate the convergence of sequences. The anti-Neu5Ac aptamer is about 60-fold a stronger binder than the corresponding lectin; it also binds the derivative but about 70 -fold more weakly and it inhibits sialidase activity.

Different variants of SELEX, summarized in Fig. 3, have been recently explored to specifically drive the in vitro selection on the glycosylation site of the biomarkers. One possibility is the incorporation of a boronic acid-modified nucleotide (boronic acid-thymidine-5'-triphosphate, B-TTP) into the DNA library to boost the affinity of the aptamers [22]. This



**Fig. 3** Different variant of SELEX procedure to drive the selection towards the glycosylation site of glycoproteins. (A) Use of boronic acid-modified thymidine in the starting DNA library. (B) Elution with a

specific ligand competitor in the last rounds of selection. (C) Counter-selection with a non-glycosylated target

led the selection towards the glycan part of fibrinogen ( $K_d$  in the low nM range) in contrast to the peptide-binding aptamer resulting from conventional SELEX ( $K_d = 5 \mu\text{M}$ ). Interestingly, random introduction of B-TTP into the aptamer selected without the boronic acid moiety does not improve the binding affinity. Although no consensus in the identified sequences was found, this is a general approach to target the selection to the glycan substructure of glycoproteins.

Epitope-specific SELEX is another possibility to effectively select an aptamer against a region of a molecule. It is a special type of hybrid-SELEX, where first rounds are conventional performed and final rounds require a specific ligand competitor for elution. As an example, aptamers for the sialic acid receptor of hemagglutinin were evolved using a sialic acid-containing protein (fetuin), so in the last rounds of selection only ssDNA bound to the sialic acid epitope in the receptor were eluted [23].

Synthesis of a short peptide containing the glycan can also serve as a target. One aptamer derived from such an approach targeted a recombinant five tandem repeats of 20 amino acid long peptide from mucin-1 that was synthetically O-glycosylated by 15 N-acetylgalactosamine (Tn antigen), showing affinity for both regions, peptide and sugar regions, being the affinity for Tn more than one order of magnitude higher [24]. The reason for the preference for the Tn antigen is not explained but one can speculate that their abundance (15 sugars) is the driving force. The contrary is held for aptamers derived from unglycosylated tandem peptide. This means that

both types of aptamers bind a region near the glycosylated site, which is affected by the presence of the sugar. The use of synthetic peptides as targets allows the incorporation of counter-selection steps using a non-glycosylated synthetic variant, which is another possibility to direct aptamers towards the glycosylation site. This approach has been employed for the selection of a DNA aptamer that selectively bind an N-glycosylated peptide fragment of vascular endothelial growth factor (VEGF) [25]. Despite only one unit of N-acetylglucosamine is incorporated at the natural glycosylation site of VEGF, the resulting aptamers show 52-fold selectivity towards the glycan-peptide over the non-glycosylated variant. In addition, the best aptamer is able to distinguish between peptide variants differing only by a single glycosylation site. However, this study does not show the feasibility of the aptamer to recognize native VEGF, which may adopt a three-dimensional conformation different from the peptide fragment.

## Future perspectives

Deciphering the glycan signature of cancer is essential to early detection and to establish personalized therapies that increase the survival rate. The challenge is extremely demanding even in the post-genomic post-proteomic era. It implies characterization of hundreds of glycans and their abundance as well as identification of glycosylation sites. Today, many of the exact

structures attached to proteins found in serum are still unknown. With this purpose, receptors recognizing the glycosylation site and capable of differentiating minimal structural features are compulsory. As it was commented above, none of the existing receptors can provide the selectivity required. Rapid advancement in glycomics reveals new aberrant alterations, which needs novel receptors. An example of this is the case of haptoglobin fucosylation associated to pathological conditions since several years. Recently, two fucosylation sites, in the core and in the sialyl determinant have been found [26]. In order to elucidate the significance of each one in any disease, specific detection is crucial. Many lectins recognize all types of linkages  $\alpha$ 1–3, 1–4 and  $\alpha$ 1–6 fucosylation (core), and the most widely used specific for core fucosylation also binds mannose residues. Though a natural lectin truly specific for core fucose was found only 5 years ago [27] there is no suitable receptors for the rest of fucose types.

The development of synthetic receptors seems the most promising route to achieve the strict selectivity demanded. Since the biological importance of glycoproteins becomes clear, determined efforts are being performed to develop specific binders but there is substantial room for improvement. In this sense, aptamers could be a solution. Until now, aptamers selected against glycoproteins preferentially bind the peptide sequence unless a lot of identical sugars are present, so novel strategies directing it towards the glycan and its surrounded region are compulsory. Epitope-specific SELEX or availability of synthetic peptidoglycans can help in this task. Likewise, the synthesis of multiantennary glycans has progressed extraordinarily and now some of them are commercially available but unfortunately at not affordable fares. Moreover, the conjugation to the specific point in the peptide chain is a bottleneck for analytical chemists that need the highly purified peptidoglycan to develop better receptors. In achieving this, the availability of stronger and more specific binders will be increased.

To improve the probability of identifying aptamers with high affinity towards the glycosylation site of glycoproteins, it is also possible to use chemically modified nucleobases [28]. This is the case of the so-called SOMAmers (Slow Off-rate Modified Aptamers), which contain chemically modified deoxyuridine residues with modified side chains that increase the diversity of nucleic acids thus facilitating the selection of ligands with high affinity towards proteins [29]. The use of high-throughput platforms such as SOMAscan [29], which has extraordinarily accelerated the discovery of protein biomarkers, may also be useful in the field of glycoproteins. It is conceivable that using different cross-linking chemistry aptamers recognizing proteins but also the carbohydrate moiety, so binding near the glycosylation site, could be developed with features as good as those found in SOMAmers for detecting proteins.

Last but not least, fluent communication between analytical chemists and glycobiologists would speed up the development

of improved receptors through helping chemists to early identify recognition sites of clinical/biological interest and promote less known synthetic receptors such as aptamers among clinicians or even pharmaceutical industry. The huge investment in antibodies since their discovery and the recent effort to humanize them to avoid the side effects have screened the potential of aptamers, which are ignored by the pharmaceutical and diagnostic-based industries. In the latest years, a blatant interest in aptamers is detected out of academia as a possibly solution to scientific challenges such as high degree of discrimination of minor changes not affordable with current antibodies or lectins. The detection of post-translational modifications, especially glycosylation as the most important one, is the next niche where aptamer must excel if they want to be widely recognized as a real alternative to antibodies and boost their commercialization.

**Acknowledgments** The authors acknowledge the support provided by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (Project No. CTQ2015-63567-R), and the Principado de Asturias government (Project FC15-GRUPIN14-025, co-financed by FEDER funds).

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have not conflict of interest.

## References

1. Glavey SV, Huynh D, Reagan MR, Manier S, Moschetta M, Kawano Y, et al. The cancer glycome: carbohydrates as mediators of metastasis. *Blood Rev.* 2015;29(4):269–79.
2. Palecek E, Tkac J, Bartosik M, Bertok T, Ostatna V, Palecek J. Electrochemistry of nonconjugated proteins and glycoproteins. Toward sensors for biomedicine and glycomics. *Chem Rev.* 2015;115(5):2045–108.
3. Miyoshi E, Moriwaki K, Terao N, Tan CC, Terao M, Nakagawa T, et al. Fucosylation is a promising target for cancer diagnosis and therapy. *Biomol Ther.* 2012;2(1):34–45.
4. Vajaria BN, Patel PS. Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconj J.* 2017;34(2):147–56.
5. Munkley J, Elliott DJ. Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget.* 2016;7(23):35478–89.
6. Shajahan A, Heiss C, Ishihara M, Azadi P. Glycomic and glycoproteomic analysis of glycoproteins—a tutorial. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409(19):4483–505.
7. Jin S, Cheng YF, Reid S, Li MY, Wang BH. Carbohydrate recognition by boronolactins, small molecules, and lectins. *Med Res Rev.* 2010;30(2):171–257.
8. Stowell SR, Ju T, Cummings RD. Protein glycosylation in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2015;10:473–510.
9. Hong X, Ma MZ, Gildersleeve JC, Chowdhury S, Barchi JJ Jr, Mariuzza RA, et al. Sugar-binding proteins from fish: selection of high affinity “Lambodies” that recognize biomedically relevant glycans. *ACS Chem Biol.* 2013;8(1):152–60.
10. Tan ZJ, Yin HD, Nie S, Lin ZX, Zhu JH, Ruffin MT, et al. Large-scale identification of core-fucosylated glycopeptide sites in pancreatic cancer serum using mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2015;14(4):1968–78.

11. Zhou J, Yang W, Hu Y, Hoti N, Liu Y, Shah P, et al. Site-specific fucosylation analysis identifying glycoproteins associated with aggressive prostate cancer cell lines using tandem affinity enrichments of intact glycopeptides followed by mass spectrometry. *Anal Chem*. 2017;89(14):7623–30.
12. Belicky S, Katrlík J, Tkáč J. Glycan and lectin biosensors. *Essays Biochem*. 2016;60(1):37–47.
13. Sun W, Du L, Li M. Aptamer-based carbohydrate recognition. *Curr Pharm Des*. 2010;16(20):2269–78.
14. Dunn MR, Jimenez RM, Chaput JC. Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat Rev Chem*. 2017;1:0076. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0076>.
15. de-los-Santos-Álvarez N, Lobo-Castañón MJ, Miranda-Ordieres AJ, Tuñón-Blanco P. Modified-RNA aptamer-based sensor for competitive impedimetric assay of neomycin B. *J Am Chem Soc*. 2007;129(13):3808–9.
16. Zhang J, Loo RRO, Loo JA. Structural characterization of a thrombin-aptamer complex by high resolution native top-down mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2017;28(9):1815–22.
17. Liu Y, Kuan CT, Mi J, Zhang X, Clary BM, Bigner DD, et al. Aptamers selected against the unglycosylated EGFRvIII ectodomain and delivered intracellularly reduce membrane-bound EGFRvIII and induce apoptosis. *Biol Chem*. 2009;390(2):137–44.
18. Ray P, Sullenger BA, White RR. Further characterization of the target of a potential aptamer biomarker for pancreatic cancer: cyclophilin B and its posttranslational modifications. *Nucleic Acid Ther*. 2013;23(6):435–42.
19. Jeong S, Eom T, Kim S, Lee S, Yu J. In vitro selection of the RNA aptamer against the Sialyl Lewis X and its inhibition of the cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(1):237–43.
20. Cho S, Lee BR, Cho BK, Kim JH, Kim BG. In vitro selection of sialic acid specific RNA aptamer and its application to the rapid sensing of sialic acid modified sugars. *Biotechnol Bioeng*. 2013;110(3):905–13.
21. Gong S, Ren HL, Tian RY, Lin C, Hu P, Li YS, et al. A novel analytical probe binding to a potential carcinogenic factor of N-glycolylneuraminic acid by SELEX. *Biosens Bioelectron*. 2013;49:547–54.
22. Li MY, Lin N, Huang Z, Du LP, Altier C, Fang H, et al. Selecting aptamers for a glycoprotein through the incorporation of the boronic acid moiety. *J Am Chem Soc*. 2008;130(38):12636–8.
23. Lao YH, Chiang HY, Yang DK, Peck K, Chen LC. Selection of aptamers targeting the sialic acid receptor of hemagglutinin by epitope-specific SELEX. *Chem Commun*. 2014;50(63):8719–22.
24. Ferreira CS, Cheung MC, Missailidis S, Bisland S, Garipey J. Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(3):866–76.
25. Rose CM, Hayes MJ, Stettler GR, Hickey SF, Axelrod TM, Giustini NP, et al. Capillary electrophoretic development of aptamers for a glycosylated VEGF peptide fragment. *Analyst*. 2010;135(11):2945–51.
26. Miyoshi E, Kamada Y. Application of glycoscience to the early detection of pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2016;107(10):1357–62.
27. Kobayashi Y, Tateno H, Dohra H, Moriwaki K, Miyoshi E, Hirabayashi J, et al. A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. *J Biol Chem*. 2012;287(41):33973–82.
28. Pfeiffer F, Rosenthal M, Siegl J, Ewers J, Mater G. Customised nucleic acid libraries for enhanced aptamer selection and performance. *Curr Opin Biotechnol*. 2017;48:11–8.
29. Gold L, Ayers D, Bertino J, Bock C, Bock A, Brody EN, et al. Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One*. 2010;5:e15004.



**Ana Díaz-Fernández** received her BS in chemistry in 2015 and her MS in analytical and bioanalytical sciences in 2016 from Oviedo University. She is now a PhD student in the Chemical, Biochemical and Structural Analysis and Computational Modeling doctoral program of the University of Oviedo. Her PhD is focused on the selection of aptamers for the development of new aptamer-based biosensors for tumor biomarkers.



**Rebeca Miranda-Castro** is a postdoctoral researcher in the Electroanalysis Research Group headed by Prof. M.J. Lobo-Castañón. Her research interests focus on the development of electrochemical sensors for clinical diagnosis and food analysis using molecular recognition elements based on nucleic acids (genosensors and aptasensors).



**Noemí de-los-Santos-Álvarez** is an Associate Professor at Universidad de Oviedo (Spain). Her field of expertise is Electroanalysis. Her first studies were conducted on electrocatalytic processes and characterization of intermetallic materials for fuel cells (during her postdoc stage at Cornell University). Her current interests are focused on genosensing and aptamer selection (allergens, viruses and cancer biomarkers) to be used in biosensors for diagnostics.



**María Jesús Lobo-Castañón** is a Professor at University of Oviedo, Department of Physical and Analytical Chemistry, Spain, where she leads the Electroanalysis research group. Her research interests focus on the development of electrochemical sensors for clinical diagnosis and food analysis, using different molecular recognition elements, such as enzymes, DNA, aptamers, and molecularly imprinted polymers. She is the author or co-author of over 100 scientific articles and several book chapters in the field.

cles and several book chapters in the field.





## Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: Toward more specific detection of prostate cancer<sup>☆</sup>

Ana Díaz-Fernández<sup>a,b</sup>, Rebeca Miranda-Castro<sup>a,b</sup>, Noemí de-los-Santos-Álvarez<sup>a,b</sup>,  
Eloy Fernández Rodríguez<sup>c</sup>, María Jesús Lobo-Castañón<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Dpto. Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Av. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Avenida de Roma, 33011 Oviedo, Spain

<sup>c</sup> Hospital Universitario de Cabueñes, C/ Los Prados, 395, 33394 Gijón, Asturias, Spain



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Aptamer  
Cancer detection  
Electrochemical biosensor  
Glycosylation  
Prostate-specific antigen  
SELEX

### ABSTRACT

The development of chemical sensors capable of detecting the specific glycosylation patterns of proteins offers a powerful mean for the early detection of cancer. Unfortunately, this strategy is scarcely explored because receptors recognizing the glycans linked to proteins are challenging to discover. In this work, we describe a simple method for directing the selection of aptamers toward the glycan structure of the glycoproteins, with prostate-specific antigen (PSA) as a model target. Using this strategy, we identified one aptamer (PSA-1) that binds the glycan moiety of PSA with reasonable affinity (a dissociation constant of  $177 \pm 65$  nM). Interestingly, an electrochemical sensor with a sandwich format employing the identified aptamer as a signaling receptor, provides a tool of discriminating human PSA from the unglycosylated protein, with a limit of detection of 0.66 ng/mL. The sensor responds to different levels of PSA in serum, correlating well with chemiluminescence ELISA used in hospitals even with higher potential to discriminate clinically meaningful prostate cancer. Although validation on a larger cohort is needed, this is the first demonstration of an aptamer-based sensor to detect PSA by focusing in its glycan moiety

### 1. Introduction

Changes in the glycosylation pattern of cell surface and secreted glycoproteins are common in malignant transformations and cancer progression (Munkley and Elliot, 2016), and there is growing evidence that these alterations are associated with the acquisition of all the cancer hallmarks presently accepted (Hanahan and Weinberg, 2011). In fact, the majority of tumor markers currently used in clinic are glycoproteins. This is the case of prostate-specific antigen (PSA), the gold standard option for diagnosing and predicting progression of prostate cancer, which is the most prevalent cancer in men in Europe and USA (Siegel et al., 2018). Since the adoption of PSA test for prostate cancer screening in the early 1990s, the number of patients diagnosed at an early stage has dramatically increased. However, the reduced specificity of the total PSA test leads to over-detection of indolent cancers, resulting in a large number of unnecessary biopsies and overtreatment (Hayes and Barry, 2014).

A major goal of research in prostate cancer detection has been the development of screening methodologies with improved specificity,

which enables to distinguish between clinically significant and insignificant prostatic adenocarcinoma. Toward this goal, total PSA test is complemented with other parameters such as free PSA, PSA isoform specific detection and PSA kinetics (Lilja et al., 2008), but the search continues for more accurate prostate cancer biomarkers.

A promising approach for improving the specificity of PSA for cancer detection is to analyze the aberrant PSA glycosylation pattern (Gilgunn et al., 2013). Recent advances in the field of glycobiology have demonstrated that during tumorigenesis subtle changes in the glycan structure of PSA occur (Saldova et al., 2011; Tabarés et al., 2006), which may allow to distinguish PSA from normal and tumor cells. The detection of these specific glycosylation changes may confer a new perspective for clinical applications, although the lack of glyco-specific antibodies constitutes a major obstacle. Nature offers a group of glycan-binding proteins i.e. lectins, which have been used in enzyme-linked lectin assays and microarrays for detecting the glycan moiety of PSA (Jolly et al., 2016; Li et al., 2011; Meany et al., 2009; Pihíková et al., 2016). However, these receptors capable of recognizing a specific glycan structure, are not directed against the glycosylation site (the

<sup>☆</sup> Dedicated in memory of Prof. Emil Palecek.

\* Corresponding author.

E-mail address: [mjlc@uniovi.es](mailto:mjlc@uniovi.es) (M.J. Lobo-Castañón).

glycan and its surrounding in the protein), with the subsequent low level of discrimination among different glycoproteins with similar glycan structures. In addition, the usefulness of lectins is limited by their low affinity, usually in the  $\mu\text{M}$  range. Therefore, there is an urgent need for the development of new receptors with high affinity and selectivity for the glycosylation site of glycoprotein biomarkers such as PSA. The synthetic receptors termed aptamers (also referred to as chemical antibodies) have surfaced as a promising alternative to natural ones. There are different strategies and techniques to adapt the selection of aptamers to the requirements of the target, with the possibility of directing the recognition toward the domain or region of interest in a much simpler and efficient way than in the case of antibodies production. The rational tailoring of aptamers for the glycosylation site of the glycoprotein may provide new diagnostic tools for early detection of cancer (Díaz-Fernández et al., 2018).

There are different aptamers developed against PSA, both DNA (Hsieh et al., 2017; Li et al., 2018; Park et al., 2016; Savory et al., 2010) and RNA oligonucleotides (Jeong et al., 2010; Svobodova et al., 2013), but the approaches used for their selection do not have the ability to direct them toward the recognition of the carbohydrate structure of PSA. Consequently, aptamer-based sensors described so far provide information on total PSA, but are insensitive to changes in the glycosylation pattern (Cha et al., 2014; Heydari-Brafrooei and Shamszadeh, 2017; Souada et al., 2015; Tamboli et al., 2016; Tzouvadaki et al., 2016; Yang et al., 2017; Zhao and Ma, 2018).

To focus the aptamer selection to the carbohydrate substructure of glycoproteins, only one approach has been described, which was applied to fibrinogen (Li et al., 2008). It relies on the ability of boronic acids to interact with diols and requires the incorporation of boronic acid-modified nucleotides during the selection. However, boronic acid-glycan interactions play a key role in the recognition of the glycoprotein by the resulting aptamers, rendering them less selective for discriminating subtle changes in the glycan structure.

Motivated by the above arguments, we describe here the first aptamer selection directed toward a native glycan structure of proteins, without the need for modified nucleotides. Our approach relies on the use of rationally designed counter-selections targeting the non-glycosylated protein, thus removing from the selection pool the oligonucleotides that recognize the protein by positions different from the glycosylation site. Counter-SELEX is an approach used to evolve aptamers with exquisite selectivity against the desired target. This procedure involves challenging the DNA library against a structurally related compound, for example a protein isoform, using the unbound sequences for the posterior round of selection (Miranda-Castro et al., 2016). Rose et al. (2010) synthesized a short peptide surrounding the VEGF glycosite and attached a single sugar (N-acetylglucosamine) as a target for SELEX, using the unglycosylated peptide to direct the selection. Though this work demonstrated the feasibility of this approach with 50-fold discrimination power, the aptamer was not challenged to the native protein containing a vast more complex sugar chain (polysaccharide). Similarly, aptamers against glucose-bound hemoglobin have been identified very recently (Eissa and Zourob, 2017).

The new aptamers we identify are employed as signaling receptors in a sandwich electrochemical aptasensor for the detection of PSA. The evaluation of the clinical performance of the aptasensor in serum at different PSA levels suggests it may be a promising approach to improve the cancer specificity of PSA analysis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Immobilization of proteins for SELEX

Proteins were immobilized on the surface of Dynabeads M-280 tosylactivated magnetic particles (Invitrogen). 165  $\mu\text{L}$  (5 mg) of the beads were washed with 1 mL of BM (19 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 81 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7.4), and incubated with 100  $\mu\text{g}$  of the protein in 100  $\mu\text{L}$  of BM2 (3 M

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 7.4) in a Thermomixer for 12–18 h at 37 °C at 1300 rpm. After magnetic separation, the particles were conditioned in 1 mL of BLmod (PBS 1  $\times$  + 0.5% BSA) for 1 h at 37 °C at 1300 rpm. Finally, the particles were washed twice with 1 mL of BLmod2 (PBS 1  $\times$  + 0.1% BSA) and resuspended in 250  $\mu\text{L}$  of BLmod2 for long-term storing at 4 °C. To estimate the amount of immobilized protein the unbound protein was quantified by Bradford assay (Supporting information). Using this protocol, the magnetic particles were modified with BSA, human PSA (hPSA) and recombinant PSA (rPSA) for negative (no target, BSA-MPs), positive (with target, hPSA-MPs) and counter-selection steps (non-glycosylated target, rPSA-MPs), respectively.

### 2.2. SELEX procedure

The ssDNA library consisted of a 40 nucleotides randomized central region flanked at both ends by two constant sequences of 20 nucleotides each, for hybridization with PCR primers during amplification (Table S1). 1 nmol of the starting DNA library in 1 mL of the selection buffer (BS: PBS 1  $\times$  pH 7.4) was heated at 95 °C for 4 min and then quickly cooled in ice for 4 min. BSA-MPs were added to this solution, maintaining the amount of immobilized protein 10-fold lower than the amount of DNA. A concentration of 1.23  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of BSA and 1.23  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of tRNA was also added to minimize unspecific binding and as a competitor, respectively. The [tRNA]/[DNA] ratio was kept at 0.1. After interaction and magnetic separation, the supernatant was collected (negative selection), and hPSA-MPs were added to the supernatant in such a way that the ratio of protein/DNA was 1:10. After interaction and magnetic separation, the supernatant was discarded (positive selection) and the particles were washed with BSL buffer (BS + 0.01% tween-20). The bound DNA was eluted by incubation with 30  $\mu\text{L}$  of water at 95 °C for 15 min and magnetic separation. All the incubations were performed at 25 °C and 1300 rpm. 2  $\mu\text{L}$  of eluted DNA were PCR amplified with 1  $\mu\text{M}$  biotinylated reverse primer, 1  $\mu\text{M}$  6-FAM- forward primer (Table S1), 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM dNTPs and 1 U hot-start *Taq* DNA polymerase. The protocol was as follows: 95 °C for 10 min to activate the enzyme, then 15 cycles of 94 °C for 45 s, 57 °C for 45 s and 72 °C for 45 s; and a final step at 72 °C for 10 min. The DNA amplified was run in a 2% agarose gel to check that the amplified DNA had the expected size. The concentration of amplified dsDNA was quantified by fluorescence. When less than 250 pmol of DNA was obtained, a new aliquot of DNA was amplified by PCR.

The strand separation from 250 pmol of the amplified DNA was performed using Dynabeads MyOne Streptavidin C1 magnetic particles (Invitrogen). They were washed 3 times with BLstrep buffer (10 mM Tris-HCl 2 M NaCl + 0.01% tween-20) and then resuspended in the same buffer without tween-20 in a volume equal to the volume of DNA to separate. After 15 min of interaction, the beads were washed 3 times with BLstrep and then incubated with 50  $\mu\text{L}$  of 100 mM NaOH for 10 min to release the unbound strand. After magnetic separation, the supernatant was collected, neutralized with 1 M HCl and diluted with BS to start a new round.

To direct the selection toward the glycosylation site of the protein two counter-selections were performed in round 3 and 6. They consisted on the incubation of the DNA with rPSA-MPs. After the interaction and magnetic separation, the supernatant was collected and incubated with hPSA-MPs as indicated above.

The incubation time was decreased and the washing steps were increased in each round as indicated in Table S2. Concentrations of competitor and BSA were modified accordingly to the DNA concentration. After six rounds of selection, the remaining DNA was identified by next-generation sequencing. Enrichment assays through the selection, sequencing analysis and protocols for aptamer binding characterization are included in the Supporting information.

### 2.3. Sandwich assay

To fabricate the sensors, the capture biotinylated aptamer (biotin-anti-PSA) was immobilized through the biotin-streptavidin interaction on screen-printed gold electrodes (SPAuE) (DRP-220BT, Metrohm-Dropsens, Spain) modified with a mixed self-assembled monolayer (SAM), obtained after overnight incubation at 4 °C in a 1:3 mixture of 11-mercaptopundecanoic acid (1 mM in ethanol) and mercaptohexanol (1 mM in ethanol). First, the carboxylic groups of the SAM were activated with a mixture of 100 mM EDC and 25 mM NHS in water for 30 min, and then we added streptavidin (50 µg/mL) in NaAc buffer for 30 min. The remaining activated groups were blocked with 1 M ethanolamine in PBS 1 × for 15 min, and finally the surface was incubated with 1 µM biotin-anti-PSA in TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7.4) for 30 min.

For PSA analysis, serial dilutions of standard PSA in TBS or serum were incubated on the working electrode for 30 min and then the detection aptamer, 1 µM 6FAM-PSA1 in TBS was added for 30 min. The labeling and detection steps were performed as described for the binding assays (Supporting Information). After each step, the electrode was washed with the buffer used in the following step and dried with nitrogen. Volumes of 10 µL were used, and incubations were performed at room temperature. When handling numerous modified electrodes, the initial step was wisely delayed to keep a strict control on timing.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Selection of aptamers

Our approach to isolate novel DNA aptamers targeting hPSA with intrinsic preference for the glycosylation site relies on the introduction of counter-selection steps using rPSA that does not carry the glycan moiety. The counter-selection is performed once the DNA library begins to enrich in sequences recognizing the glycosylated protein previous subtraction of sequences with affinity for the BSA-blocked MPs without target, that is, BSA-MPs (negative or subtractive selection) (Fig. 1). Introducing negative steps in all rounds is not very common but has already been reported (Kimoto et al., 2013). We advise against this practice when the target is not highly “aptagenic” to avoid removing most initial sequences (Svigelj et al., 2018) but in this case we reasoned it would be wise to increase the stringency because there are two proteins on the hPSA-MPs during the positive selection. Thus, after 2 rounds of selection against the whole protein we started the next

selection cycle by incubating the amplified sequences with rPSA-MPs. In this way, we selectively removed those sequences that recognize the protein at regions different from the glycosylation site, subjecting the remaining ones to a new interaction with hPSA (third round). Next, we performed two classical selection cycles and before the sixth round we repeated the counter-selection.

Pool enrichment was monitored by using fluorescein as a tracer, incorporated during PCR steps, for measuring the percentage of oligonucleotides retained by the immobilized hPSA after each round of selection (Fig. 2A). We observed a progressive enrichment of the DNA library in sequences with affinity toward hPSA, and after 6 rounds of selection, 60% of the oligonucleotides were bound to the immobilized glycoprotein, indicating a high percentage of specific binders for PSA in this pool. In contrast, a dramatic decrease in affinity for the rPSA is apparent in rounds 3 and 6 showing the effectiveness of counter-selection steps performed in those cycles.

We next evaluated the average binding affinity of the oligonucleotide pools selected after each round. hPSA was chemically bound to gold SPR disks and incubated with serial dilutions of PCR amplified pools. Fig. 2B shows virtually no binding with the initial library and an increased binding affinity to hPSA as selection progresses. In the 5th round a small signal appears at 100 nM while a much higher signal is observed at the lowest concentration tested (10 nM) in the 6th round. To study whether binding actually involves the glycosylation site, we repeated the experiment with the pool 6 and rPSA on the SPR sensor. The displacement of the binding curve toward higher aptamer concentrations indicates that oligonucleotides in this pool recognize the unglycosylated form but with significantly lower affinity. These results suggest that a high percentage of the sequences in the last round indeed bind to PSA through preferential recognition of the glycan in good agreement with fluorescent assays.

Next-generation sequencing allowed us to identify sequences from several rounds and analyze them. The in vitro selection changes the observed nucleotides abundance, with a slight bias toward dG and dT enrichment (Fig. S1). The starting DNA library did not contain an even distribution of the nucleotides as expected, with a composition of 27.41% dA, 27.65% dT, 23.76% dC and 21.19% dG for all the sequences analyzed (326,411 reads). On the contrary, in the sixth round we obtained 304,722 reads with an enrichment in dG (27.08%) and dT (28.26%). The distribution of the nucleotides at each position of the random region in the last round pool indicates an increase in dT at 3' end while G dominates the 5' end (Fig. S2). The sequence complexity, estimated as the relative amount of unique sequences to total reads

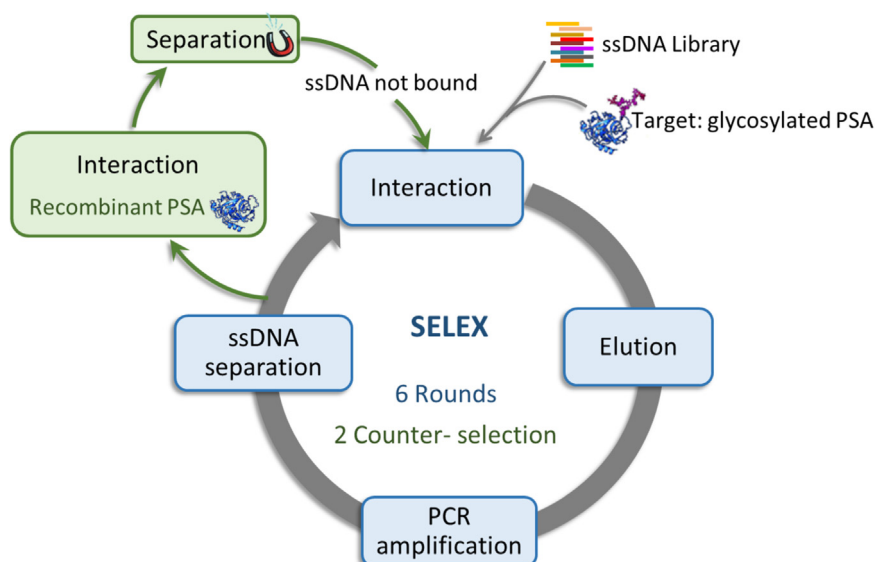
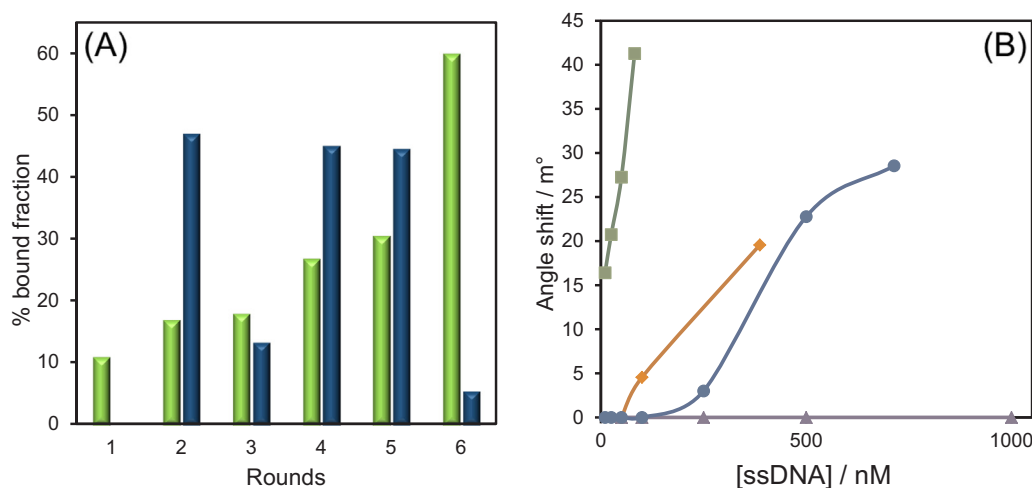


Fig. 1. Scheme of the SELEX procedure followed in this work to direct the selection toward the glycan chain.



**Fig. 2.** Enrichment assays. A) Evolution of the percentage of DNA that binds to hPSA (light green) and rPSA (dark blue) through the SELEX rounds obtained by fluorescence measurements. B) SPR measurements obtained with increasing concentrations of DNA from round zero (purple triangles), five (orange diamonds) and six (green squares) for the hPSA and comparison with the results from round six for the rPSA (blue circles). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

within each round (% complexity = unique/total), decreased from 0.19% in round 2 pool to 0.09% in the last pool. Diversity changes were monitored by melting curve analysis after a short reannealing of 30 s at 50 °C (Vanbrabant et al., 2014). A shift in the re-melting temperature from 81.7 °C in the starting library to 82.7 °C in the round 6 was found, which is in agreement with a decrease in the diversity of the oligonucleotide pool. (Fig. S3).

In order to study the evolution of sequences during the rounds, the identified oligonucleotides from round 0, 2, 4 and 6 were compiled into a non-redundant aptamer database and the sequences that were kept throughout the SELEX were classified into families, obtaining a family tree (Fig. S4). Next, each family was further analyzed to identify repetitive motifs. Since a ten-fold increase in affinity has been associated to 5 conserved positions (Carothers et al., 2006) we selected the four out of seven families with motifs containing at least 5 unambiguous nucleotides (low variable or high consensus sequences). (Table S3). These motifs are highly recurrent in the pool according to the total number of repetitions found. The structure of potential aptamers from each family was predicted using Mfold (Zucker, 2003), selecting as candidates those with the lowest free energy (more stable secondary structures) (Fig. S5). Note that though nature tends to provide the simplest solution, intricate nucleic acid structures are more informational complex and are positively correlated with lower  $K_D$  (higher affinity) (Carothers et al., 2006). Additionally, the most repeated sequence (highest copy number) was also selected for further characterization (see the five sequences in Table S4). The candidate aptamers were synthesized including 5 thymines as a spacer in the 5'-end of the selected sequences (40 nt central sequences).

### 3.2. Characterization of the candidate aptamers

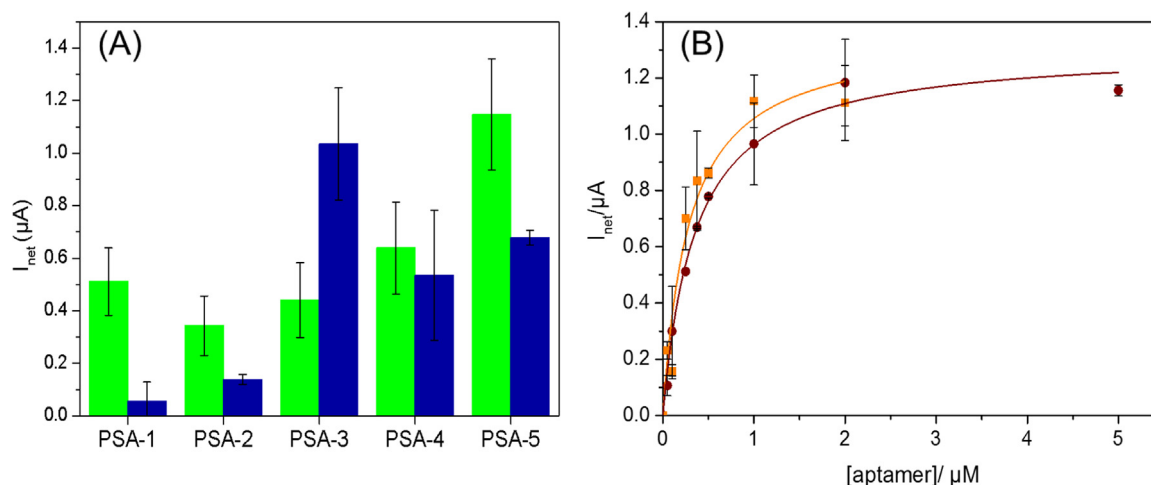
Individual ability to bind both hPSA and rPSA was first tested using an electrochemical binding assay with chronoamperometric detection. These proteins were immobilized onto screen-printed gold electrodes (SPAuE) and incubated with a 500 nM solution of each aptamer labeled with fluorescein. After the affinity interaction, fluorescein was tagged with the enzyme conjugate Fab-anti fluorescein-POD, and the amount of immobilized enzyme was measured by chronoamperometry at 0.2 V. All aptamers recognized hPSA but with different affinity (Fig. 3A). PSA-5, the most abundant one, showed the highest analytical signal toward hPSA but it also recognized rPSA (60% of the hPSA signal). PSA-1 is the aptamer showing the lowest signal towards rPSA, and the highest discrimination ability between glycosylated and unglycosylated forms of the protein, which points to the recognition through the glycosylation site. PSA-2 also preferentially binds to hPSA but the signal is 33% lower than PSA-1 aptamer. Conversely, PSA-3 binds the recombinant protein

much stronger than the human one. PSA-4 shows similar recognition ability for both proteins within the experimental error.

The affinity of PSA-1 toward hPSA was evaluated in more detailed by building the binding curve with increasing concentrations of aptamer. The curve fitted well to the Langmuir model, which assumes a 1:1 stoichiometry, that is, a single binding site per protein, providing a dissociation constant of  $357 \pm 42$  nM. (Fig. 3B). This value is lower than the average obtained with pool 6 under identical conditions ( $K_D = 480 \pm 44$  nM) suggesting that PSA-1 is among the strongest binders in the pool. Of note, the affinity constant is at least one order of magnitude better than that described for lectins; for example the affinity for a core-fucose specific lectin ranged from 3.2 to 22  $\mu$ M obtained by frontal affinity chromatography, a technique specifically designed for analysis of weak interactions (Kobayashi et al., 2012). Recently, a strong binding,  $K_D$  in the low nM range, was reported for some lectins interacting with PSA glycans by SPR (Damborský et al., 2016) but these values cannot be directly compared with our results. Unlike aptamers, all these lectins are oligomers so they can bind to several proteins on a surface (multivalency).  $K_D$  values dependent on protein density are expected and demonstrated on microarray experiments with lowest  $K_D$  at high densities. SPR  $K_D$  values are reported for protein densities as high as 6.13 ng/mm<sup>2</sup> while our results come from 1.6 ng/mm<sup>2</sup> as the upper limit.

For the sake of comparison with the aptamer already described in the literature for hPSA (Savory et al., 2010), denoted here as anti-PSA aptamer, a  $K_D$  value of  $229 \pm 25$  nM was estimated with our electrochemical binding assay. Previously, a value of 37 nM was obtained by quartz-crystal microbalance (Formisano et al., 2015).

It is now accepted that robust aptamer characterization requires the use of several techniques because the variable response depending on the sensitivity of the technique and the effect of the immobilization strategy when needed (McKeague et al., 2015; Miranda-Castro et al., 2018). It has been also openly recognized that aptamers work dissimilarly in different analytical assays (Li et al., 2009). Consequently, we also investigated the affinity of the different aptamers by SPR. Au-SPR chips were modified with hPSA and incubated with increasing concentrations of aptamer. Dissociation constants for PSA-1, and anti-PSA were  $177 \pm 65$  nM and  $177 \pm 5$  nM, respectively. The discrepancy with the electrochemical estimation could be ascribed to the deleterious effect of labeling. In principle, the fluorescein tag is not expected to impact on affinity because the selection was performed with tagged-aptamers to minimize it. However, the labeling with a bulky enzyme conjugate could cause that only a fraction of aptamers bound to PSA would be accessible (the parking problem) limiting the sensitivity. It has been argued that the flexibility of sugar structure limits the affinity of the receptors as in the case of lectins. We have shown that aptamer



**Fig. 3.** A) Current intensities obtained by chronoamperometry at + 0.2 V on SPuE modified with hPSA (light green) and rPSA (dark blue) using 500 nM of 6-FAM-aptamers. B) Binding curves obtained by chronoamperometry on hPSA-modified SPuE for PSA-1 aptamer (circles) and anti-PSA (squares). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

directed selection could overcome this limitation. Glycan-binding aptamers with as low affinities as protein-binding aptamers are feasible to obtain.

As a second test for the ability of PSA-1 to recognize the protein by the glycan structure, a distinctive characteristic that may be not achieved by anti-PSA that was selected by a non-directed SELEX process, we repeated the binding experiment but challenging both aptamers to rPSA. The anti-PSA showed preferential binding to rPSA ( $K_D = 70 \pm 5$  nM) suggesting that it recognizes the protein but in a region that is perturbed by the glycan or folded into a different conformation after post-translation modification. On the contrary, PSA-1 gave no significant signal in SPR studies, even at the highest concentration tested (1  $\mu\text{M}$ ), which is consistent with the recognition of the carbohydrate moiety in the protein we have already observed in the electrochemical experiment.

In contrast to PSA-1, the experimental results obtained by challenging immobilized hPSA, either on SPR disks or on AuSPE, with increasing concentrations of the aptamer PSA-5 are well fitted to the Hill equation, with  $K_D$  values of  $144 \pm 65$  nM and  $209 \pm 16$  nM obtained by electrochemical and SPR measurements, respectively. This presumably reflects the cooperative binding of PSA-5, which is in agreement with the increased responses observed with this aptamer. Nevertheless, PSA-5 exhibited reduced ability to discriminate between hPSA and rPSA when compared to PSA-1.

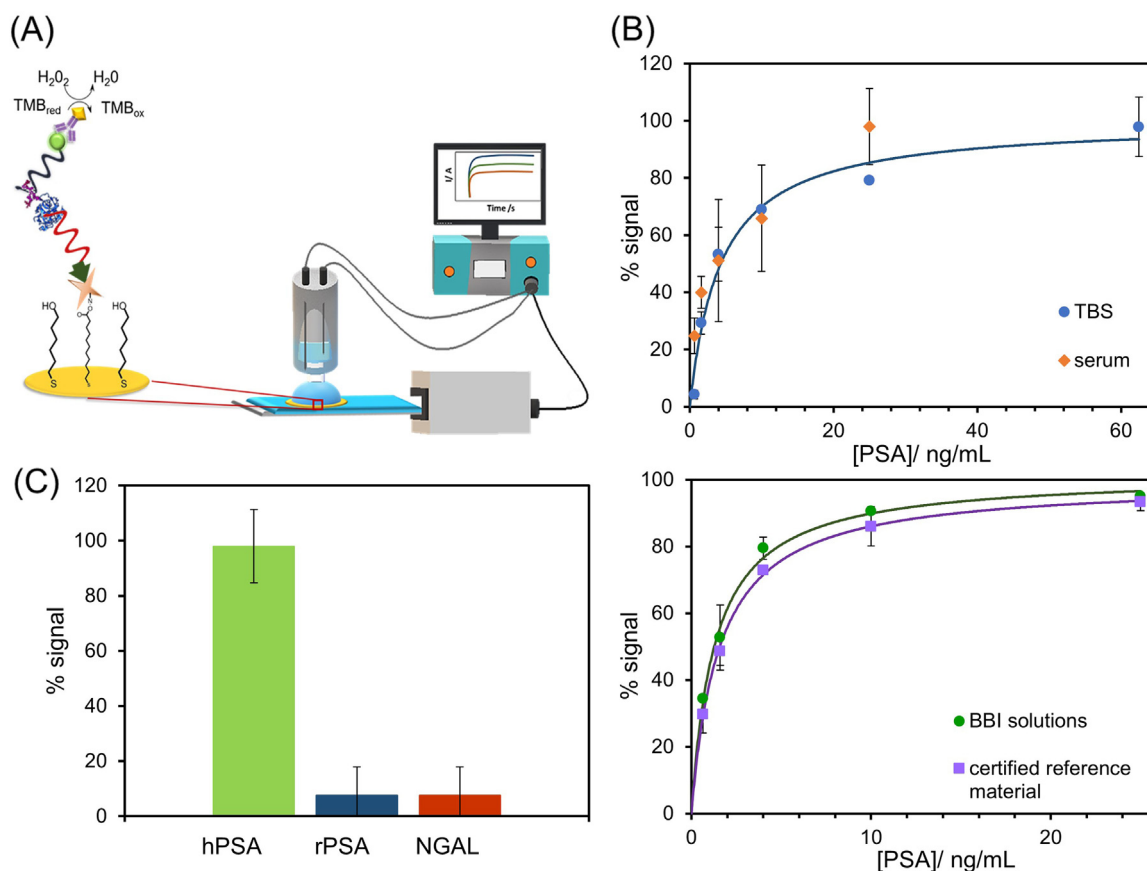
The selectivity of PSA-1 aptamer was challenged on SPuE modified with lipocalin-2 (NGAL), a single-glycosylated small protein. A concentration of 500 nM of fluorescein-labeled aptamer showed a current identical within the experimental error to the one for PSA. The signals obtained were  $743 \pm 63$  nA for NGAL and  $779 \pm 133$  nA for hPSA, meaning that this aptamer binds to the glycan moiety so it might be a general reagent for human carbohydrate chains on proteins.

### 3.3. PSA detection in a sandwich assay format

It is quite intriguing that sandwich assays with two aptamers are rare and limited to a few targets, though the selection process always yields several high-affinity winning sequences. This is probably because the requirements are more restrictive for aptamers than antibodies. Not only the protein must have two different aptatopes (or two identical but distant ones) but also the DNA sequence complementarity must be as low as possible to avoid undesired hybridization and the related high background signals. Preliminary electrochemical experiments using the previously described anti-PSA as both capture and detection aptamers revealed a S/B ratio close to 1 suggesting there is no two binding sites,

in good agreement with recently reported attempts to develop an aptasandwich assay (Li et al., 2018). Additionally both currents are higher than the signal obtained when no detection aptamer was added indicating that hybridization takes place to some extent. Using Mfold web server we estimated the hybridization free energy and the melting temperature ( $T_m$ ) of all possible homo and hetero-combinations with PSA-1, PSA-5 and antiPSA (Table S6), which confirms this and other hybridizations. The less stable duplex is achieved with PSA-1 and antiPSA due to the low absolute value of free energy and  $T_m$ . For this reason, a sandwich assay with the anti-PSA and PSA-1 aptamers was designed to the quantification of PSA. Anti-PSA aptamer was immobilized onto SPuE through the streptavidin-biotin interaction to act as a capture aptamer (Fig. 4A). The SAM on which the sensing surface is built precludes most unspecific interactions with the electrode material, a common problem in these devices. After the interaction with increasing concentrations of hPSA, 6-FAM-PSA-1 aptamer was used as a detection aptamer and the chronoamperometric current was recorded as indicated in previous experiments. It is of paramount importance that analytical assays using aptamers are performed under conditions as similar as possible to the selection. In this case, the optimum buffer for PSA binding to anti-PSA is different from the selection buffer used in our SELEX, which could be inconvenient if one of the aptamers is susceptible to buffer variability. Preliminary experiments showed that our aptamers maintain their affinity for hPSA in TBS. As an example, using 500 nM of PSA-1 the net current obtained in PBS and in TBS buffer were  $779 \pm 133$  nA and  $1570 \pm 415$ , respectively. So we decided to use the anti-PSA buffer to maximize the performance of the capture aptamer that will have to entrap the protein in an ocean of other compounds.

As expected, an increasing response was observed in the range from 0.66 ng/mL to 62.5 ng/mL in TBS buffer (Fig. 4B upper panel). The signal was normalized by expressing the percentage of the maximum net current to account for inter-day variations. Mostly overlapped calibration curves are obtained in successive days indicating the robustness of the normalization so the Fig. 4B shows the averaged calibration curve of all of them. The calibration range was narrower in serum diluted 1:1 with TBS buffer (0.66 ng/mL to 25 ng/mL), but in both conditions it covers the grey zone, 4–10 ng/mL of PSA in serum. The calibration curve fitted well to the Langmuir equation  $y = (y_o \cdot x) / (y_{max} + x)$ , with a  $y_o$  value of  $1.06 \pm 0.09\%$  and  $y_{max}$  of  $100 \pm 2\%$  with a correlation of 0.998. The limit of detection, 0.66 ng/mL, was estimated as the concentration corresponding to a signal that is three times the standard deviation of the blank. This value compares well and even surpassed the only report attempting the PSA glycoprofiling using an aptamer as a capture reagent (anti-PSA as herein) showing that our



**Fig. 4.** A) Scheme of the sandwich assay, B) calibration plots of PSA in TBS, diluted serum 1:1 with TBS (upper panel) and two different PSA standards (bottom panel), and C) sensor response to 25 ng/mL of hPSA, rPSA and the glycoprotein NGAL.

novel aptamer is superior than lectins to detect the glycan portion (Jolly et al., 2016). Very recently a novel anti-PSA aptamer was selected and used in a sandwich configuration because there were two separated binding sites on the protein. Unfortunately, the assay was not sensitive enough to detect PSA at clinically relevant levels (Li et al., 2018). Nonetheless, our efforts were not focused to sensitivity but to the real applicability in patients' samples as demonstrated below. There are a myriad of novel PSA sensors reported in the last years. As an example in a quick search 79 matches were retrieved from Scopus database with input words being PSA and aptamer since 2010; 38 if "electrochemical" is added. Similar results were obtained from SciFinder with 104 answers matching PSA aptamer, 86 journal articles and 18 patents. All this effort has been summarized recently (Damborska et al., 2017) showing that extremely difficult to defeat limits of detection has been achieved, 0.96–20 ag/mL (32–660 zM) (Hao et al., 2017; Tang et al., 2015; Zhu et al., 2016) though the need for such sensitivity is unclear.

Contrarily, discordant results obtained in clinical laboratories when different PSA standards or ELISA methods are used are frequently set aside in most of these publications but they are well described in the literature (McJimpsey, 2016; Stephan et al., 2009). In fact, follow-up measurements to monitor recurrence could be challenging if they are obtained from different laboratories. To check the robustness of our sandwich assay we constructed a calibration curve with a certified reference material. The standard was reconstituted in water and then diluted in 1:1 TBS-serum and analyzed with the sandwich assay above described. The calibration curve, also expressed as the percentage of the maximum signal obtained, was not significantly different from the calibration with the non-certified commercial PSA source (Fig. 4B bottom panel), which renders this sensing architecture a promising tool for clinical applications.

### 3.4. Selectivity of the sandwich assay in serum

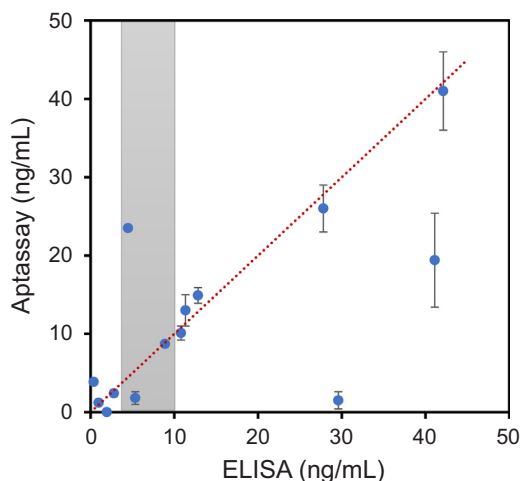
Initial selectivity studies were limited to rPSA and NGAL that is also a glycoprotein at 25 ng/mL in serum. In both cases, the net current obtained is significantly lower than the one obtained for the same concentration of PSA (Fig. 4C). Note that the detection aptamer recognizes the glycan on NGAL but the sandwich format secures the selectivity of the assay against other glycoproteins than PSA.

A broad-spectrum selectivity study was designed by analyzing two control standards containing an array of 92 analytes including total and free PSA (Table S6) at two levels. The lyophilized control was reconstituted with water, then diluted 1:1 with TBS buffer and analyzed with the sensor as previous described.

The results summed up in Table 1 show that the electrochemical sensor provides a concentration of PSA that agreed with the value for the total PSA concentration of the control indicating that not only fPSA but also combined PSA can be captured by anti-PSA and PSA-1 aptamers. The sensor does not present significant interferences even in the presence of a great variety of molecules at physiological level.

**Table 1**  
Selectivity of the sandwich assay.

Control	Concentration found	Concentration BIO-RAD control	
		fPSA	tPSA
Level 2	1.9 ± 0.4 ng/mL	1.06 ± 0.05 ng/mL	1.88 ± 0.1 ng/mL
Level 3	14 ± 3 ng/mL	9.7 ± 0.5 ng/mL	15.5 ± 0.9 ng/mL



**Fig. 5.** Concordance of the ELISA and aptasensor methods in the determination of total PSA in serum samples. 14 out of 15 analyzed samples are plotted. The 15th sample gave similar results by ELISA (93.9 ng/mL) and aptasensor ( $91 \pm 8$  ng/mL). Grey PSA-concentration zone is emphasized in grey.

### 3.5. Analysis of PSA in clinical samples

To investigate the diagnostic value of the aptamer-based assay, the sensor was challenged in serum samples from 15 patients with different levels of total PSA. The samples were diluted with TBS buffer and analyzed using the sandwich assay protocol described without any other pretreatment. The sera were also assayed in the central labs of Hospital de Cabueñes using the automated ADVIA Centaur® (Siemens) ELISA assay for the quantification of total PSA. The values obtained are summarized in Fig. 5.

The sensor results are concordant with those obtained by ELISA in 60% of samples, presumably due to the differences in the glycan profiles of the analyzed samples. Out of six discordant samples, four gave a low aptasensor value compared with the ELISA assay. Total PSA is elevated in serum in not only men with prostate cancer but also in cases of benign prostatic hyperplasia (BPH) or prostatitis.

Two of the discordant results having a higher PSA value by ELISA were finally diagnosed of BPH (ELISA value 29.6 ng/mL) and diabetes mellitus type II (ELISA value 5.3 ng/mL). Our sensor correctly classified them below the grey zone, showing superior selectivity. The third discordant value corresponded to a prostate neoplasia and our sensor also correctly identified it above 10 ng/mL cutoff but not as high as ELISA (41.1 vs. 19.4 ng/mL). The fourth one had a value close to the limit of detection by ELISA, which was undetectable by the aptasensor.

The remaining two discordant samples presented elevated values by aptasensor. While one of them showed PSA values below the 4 ng/mL threshold by both methods, which is not problematic, the second one was slightly over this threshold by ELISA but much higher by our method. The final diagnosis of this patient was prostatitis. Very high PSA values have been reported for this disease before implementing an antibiotic treatment but the values are recovered after treatment (Hara et al., 2004), so this high value is not unexpected. Taken together, the discrepant results are reasonable explained assuming different glycosylation patterns for several diseases. Although the number of samples analyzed is small, these preliminary results point to the usefulness of the aptamer-based assay to improve PSA test specificity. Ongoing research in our labs is devoted to elucidate this open and exciting question beyond the scope of this work.

## 4. Conclusions

We demonstrate the ability to direct the aptamer selection toward the glycan structure of a glycoprotein via counter-selection steps

against a recombinant unglycosylated form of the target. Using this approach and aided with deep sequencing, after only six rounds of selection with two counter-selection steps we identified an aptamer recognizing the glycan moiety in PSA, discriminating hPSA from rPSA. This approach should offer a powerful general tool for the selection of aptamers for glycoproteins with the glycan structure as aptatope.

The selected aptamer was employed to design an aptamer-based sensor with a sandwich format to detect hPSA. The sensor supports the measurement in serum samples with a minimal dilution and a limit of detection of 0.66 ng/mL, which allows the evaluation of PSA levels with clinical significance in the diagnosis of prostate cancer.

The results obtained with the sensor for serum of patients with benign prostate hyperplasia are lower than those obtained with the standard ELISA, which suggests that the sensor detects a fraction of PSA with a distinct glycan structure. The proposed aptasensor could provide an alternative approach for the detection of PSA, with potential to improve clinical outcomes of PSA tests and to reduce the number of unnecessary biopsies for the diagnosis of prostate cancer.

### CRedit authorship contribution statement

**Ana Díaz-Fernández:** Conceptualization. **Rebeca Miranda-Castro:** Conceptualization. **Noemí de-los-Santos-Álvarez:** Conceptualization. **Eloy Fernández Rodríguez:** Validation. **María Jesús Lobo-Castañón:** Conceptualization, Supervision.

### Acknowledgments

This work was funded by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad through Project No. CTQ2015-63567-R and co-financed by FEDER funds. A.D.F. was supported by Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) with a Ph.D. fellowship.

### Declaration of competing interests

None.

### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.bios.2018.12.040.

### References

- Carothers, J.M., Oestreich, S.C., Szostak, J.W., 2006. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 7929–7937.
- Cha, T., Cho, S., Kim, Y.T., Lee, J.H., 2014. *Biosens. Bioelectron.* 62, 31–37.
- Damborska, D., Bertok, T., Dosekova, E., Holazova, A., Lorencova, L., Kasak, P., Tkac, J., 2017. *Microchim. Acta* 184, 3049–3067.
- Damborský, P., Zámorová, M., Katrlík, J., 2016. *Proteomics* 16, 3096–3104.
- Díaz-Fernández, A., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M.J., 2018. *Anal. Bioanal. Chem.* 410, 2059–2065.
- Eissa, S., Zourob, M., 2017. *Sci. Rep.* 7, 1016.
- Formisano, N., Jolly, P., Bhalla, N., Cromhout, M., Flanagan, S.P., Fogel, R., Limson, J.L., Estrela, P., 2015. *Sens. Actuators B* 220, 369–375.
- Gilgunn, S., Conroy, P.J., Saldova, R., Rudd, P.M., O’Kennedy, R.J., 2013. *Nat. Rev. Urol.* 10, 99–107.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. *Cell* 144, 646–674.
- Hao, T., Wu, X., Xu, L., Liu, L., Ma, W., Kuang, H., Xu, C., 2017. *Small* 3, 1603944.
- Hara, N., Koike, H., Ogino, S., Okuizumi, M., Kawaguchi, M., 2004. *Prostate* 60, 282–288.
- Hayes, J.H., Barry, M.J., 2014. *JAMA* 311, 1143–1149.
- Heydari-Brafrooei, E., Shamszadeh, N.S., 2017. *Biosens. Bioelectron.* 91, 284–292.
- Hsieh, P.-C., Lin, H.-T., Chen, W.-Y., sai, J.J.P., Hu, W.-P., 2017. *BioMed. Res. Int.* 5041683.
- Jeong, S., Han, S.R., Lee, Y.J., Lee, S.-W., 2010. *Biotechnol. Lett.* 32, 379–385.
- Jolly, P., Damborsky, P., Madaboosi, N., Soares, R.R.G., Chu, V., Conde, J.P., Katrlík, J., Estrela, P., 2016. *Biosens. Bioelectron.* 79, 313–319.
- Kimoto, M., Yamashige, R., Matsunaga, K., Yokoyama, S., Hirao, I., 2013. *Nat. Biotechnol.* 31, 453–457.
- Kobayashi, Y., Tateno, H., Dohra, H., Moriwaki, K., Miyoshi, E., Hirabayashi, J., Kawagishi, H., 2012. *J. Biol. Chem.* 287, 33973–33982.
- Li, M., Guo, X., Li, H., Zuo, X., Hao, R., Song, H., Aldalbah, A., Ge, Z., Li, J., Li, Q., Song, S., Li, S., Shao, N., Fan, C., Wang, L., 2018. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10, 341–349.

- Li, M., Lin, N., Huang, Z., Du, L., Altier, C., Fang, H., Wang, B., 2008. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 12636–12638.
- Li, Na, Ebright, J.N., Stovall, G.W., Chen, X., Nguyen, H.H., Singh, A., Syrett, A., Ellington, A.D., 2009. *J. Prot. Res.* 8, 2438–2448.
- Li, Y., Tao, S.-C., Bova, G.S., Liu, A.Y., Chan, D.W., Zhu, H., Zhang, H., 2011. *Anal. Chem.* 83, 8509–8516.
- Lilja, H., Ulmert, D., Vickers, A.J., 2008. *Nat. Rev. Cancer* 8, 267–278.
- McJimpsey, E.L., 2016. *Sci. Rep.* 6, 1–8.
- McKeague, M., De Girolamo, A., Valenzano, S., Pascale, M., Ruscito, A., Velu, R., Frost, N.R., Hill, K., Smith, M., McConnell, E.M., DeRosa, M.C., 2015. *Anal. Chem.* 87, 8608–8612.
- Meany, D.L., Zhang, Z., Sokoll, L.J., Zhang, H., Chan, D.W., 2009. *J. Proteome Res.* 8, 613–619.
- Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M.J., 2016. Aptamers as synthetic receptors for food quality and safety control. In: Scognamiglio, V., Arduini, F., Palleschi, G. (Eds.), *Biosensors for Sustainable Food- New Opportunities and Technical Challenges*. Comprehensive Analytical Chemistry 74. Elsevier, Amsterdam, pp. 155–191.
- Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M.J., 2018. Characterization of aptamer-ligand complexes. In: Dong, Y. (Ed.), *Aptamers for Analytical Applications: Affinity Acquisition and Method Design*. Wiley, Weinheim, pp. 127–172. <https://doi.org/10.1002/9783527806799>.
- Munkley, J., Elliot, D.J., 2016. *Oncotarget* 7, 35478–35489.
- Park, J.-W., Lee, S.J., Ren, S., Lee, S., Kim, S., Laurell, T., 2016. *Sci. Rep.* 6, 27121.
- Pihkiová, D., Belický, S., Kasák, P., Bertok, T., Tkac, J., 2016. *Analyst* 141, 1044–1051.
- Rose, C.M., Hayes, M.J., Stettler, G.R., Hickey, S.F., Axelrod, T.M., Giustin, N.P., Suljak, S.W., 2010. *Analyst* 135, 2945–2951.
- Saldo, R., Fan, Y., Fitzpatrick, J.M., Watson, R.W.G., Rudd, P.M., 2011. *Glycobiology* 21, 195–205.
- Savory, N., Abe, K., Sode, K., Ikebukuro, K., 2010. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1386–1391.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2018. *CA Cancer J. Clin.* 68, 7–30.
- Stephan, C., Bangma, C., Vignati, G., Bartsch, G., Lein, M., Jung, K., Philippe, M., Semjonow, A., Catalon, W.J., 2009. *Int. J. Biol. Markers* 24, 65–69.
- Souada, M., Piro, B., Reisberg, S., Anquetin, G., Noël, V., Pham, M.C., 2015. *Biosens. Bioelectron.* 68, 49–54.
- Svigelj, R., Dossi, N., Toniolo, R., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M.J., 2018. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57, 12850–12854.
- Svobodova, M., Bunka, D.H.J., Nadal, P., Stockley, P.G., O'Sullivan, C.K., 2013. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 9149–9157.
- Tabarés, G., Radcliffe, C.M., Barrabés, S., Ramírez, M., Alexandre, R.N., Hoesel, W., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Peracaula, R., de Llorens, R., 2006. *Glycobiology* 16, 132–145.
- Tamboli, V.K., Bhalla, N., Jolly, P., Bowen, C.R., Taylor, J.T., Bowen, J.L., Allender, C.J., Estrela, P., 2016. *Anal. Chem.* 88, 11486–11490.
- Tzouavadaki, I., Jolly, P., Lu, X., Ingebrandt, S., de Micheli, G., Estrela, P., Carrara, S., 2016. *Nano Lett.* 16, 4472–4476.
- Vanbrabant, J., Leirs, K., Vanschoenbeek, K., Lammertyn, J., Michiels, L., 2014. *Analyst* 139, 589–595.
- Yang, J., Hu, Y., Dong, N., Zhu, G., Zhu, T., Jiang, N., 2017. *Biosens. Bioelectron.* 94, 286–291.
- Zhao, J., Ma, Z., 2018. *Biosens. Bioelectron.* 102, 316–320.
- Tang, L., Li, S., Xu, L., Ma, W., Kuang, H., Wang, L., Xu, C., 2015. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 12708–12712.
- Zhu, Y., Wang, H., Wang, L., Zhu, J., Jiang, W., 2016. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 2573–2581.
- Zucker, M., 2003. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415.





## Review

# Electrochemical aptasensors for cancer diagnosis in biological fluids – A review



Ana Díaz-Fernández <sup>a, b, 1</sup>, Ramón Lorenzo-Gómez <sup>a, b, 1</sup>, Rebeca Miranda-Castro <sup>a, b</sup>,  
Noemí de-los-Santos-Álvarez <sup>a, b, \*</sup>, María Jesús Lobo-Castañón <sup>a, b</sup>

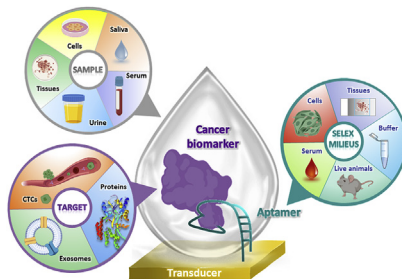
<sup>a</sup> Dpto. Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Av. Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Avenida de Roma, 33011, Oviedo, Spain

## HIGHLIGHTS

- Electrochemical aptasensors tested in clinical samples for cancer biomarkers.
- Critical revision of aptasensors to detect CTCs, exosomes and proteins.
- Relevance of natural environment during SELEX on aptamer performance.
- Prospects of in-vitro diagnostic devices based on electrochemical aptasensors.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 January 2020

Received in revised form

8 April 2020

Accepted 9 April 2020

Available online 10 May 2020

## Keywords:

Aptamer

Cancer

CTCs

Electrochemical biosensors

Exosome

SELEX

## ABSTRACT

The tunability of SELEX procedure is an essential feature to supply bioaffinity receptors (aptamers) almost on demand for analytical and therapeutic purposes. This longstanding ambition is, however, not straightforward. Non-invasive cancer diagnosis, so called liquid biopsy, requires collection of body fluids with minimal or no sample pretreatment. In those raw matrices, aptamers must recognize minute amounts of biomarkers that are not unique entities but large sets of variants evolving with the disease stage. The susceptibility of aptasensors to assay conditions has driven the selection of aptamers to natural environments to ensure their optimum performance in clinical samples. We present herein a compilation of the SELEX procedures in natural milieus. By revising the electrochemical aptasensors applied to clinical samples for cancer diagnosis and tracing back to the original SELEX we analyze whether aptamers raised using these SELEX strategies are being incorporated to the diagnostic devices and how aptasensors are finding their way to a market dominated by antibody-based assays.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction .....	2
2. Aptamer selection in biological media .....	2

\* Corresponding author. Dpto. Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Av. Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain.

E-mail addresses: [anadf@uniovi.es](mailto:anadf@uniovi.es) (A. Díaz-Fernández), [lrenzoram@uniovi.es](mailto:lrenzoram@uniovi.es) (R. Lorenzo-Gómez), [mirandarebeca@uniovi.es](mailto:mirandarebeca@uniovi.es) (R. Miranda-Castro), [santosnoemi@uniovi.es](mailto:santosnoemi@uniovi.es) (N. de-los-Santos-Álvarez), [mjlc@uniovi.es](mailto:mjlc@uniovi.es) (M.J. Lobo-Castañón).

<sup>1</sup> Both authors contribute equally.

3.	Electrochemical aptasensors for protein tumor biomarkers	4
4.	Electrochemical aptasensors for CTCs	7
5.	Electrochemical aptasensors for exosomes	10
6.	The long path from lab bench to the clinical market	15
6.1.	More specific tumor targets for the selection of aptamers	15
6.2.	More aptamers in which we can trust	15
6.3.	Evaluation of the clinical validity and utility	15
6.4.	Development of simple and integrated platforms for POC systems	16
7.	Concluding remarks	16
	Declaration of competing interest	16
	Acknowledgements	16
	References	16

## 1. Introduction

Early cancer diagnosis, before imaging revealing the tumor or even clinical symptoms, is an extremely active multidisciplinary research area. Fundamental pillars are the availability of proper biomarkers that excel in clinical sensitivity and specificity as well as proper analytical methodologies that make affordable large population screenings. Unfortunately, today the only biomarker in clinical usage for this task is the prostate specific antigen (PSA), which is strongly questioned because of the increasing number of unnecessary interventions in indolent or slow-growing tumors that boost the health public budget and the anxiety and discomfort of patients [1].

All FDA-approved cancer biomarkers with prognostic, predictive and monitoring ability are detected by immunoassays, but the advent of novel receptors has triggered the development of methods with enhanced analytical features that enable improving the clinical performance of known biomarkers. That way, the selection of aptamers, since their discovery at the beginning of the 90's [2,3], has increased notably, not only for diagnostic purposes but also as therapeutic agents or, more recently, for theranostic devices [4,5].

In the first two decades of this century, the accumulated knowledge at all biochemical levels has grown extraordinarily fueled by the (analytical) methodologies that made the deciphering of human genome a sooner reality than expected. Early cancer diagnosis and recurrence must benefit from it through the genome wide analysis of mutations, and the epigenetic and post-translational modifications (PTM) of nucleic acids and proteins. Novel biomarkers within these niches are currently under investigation with the expectation of finding the gold standard biomarker for each (sub)type of this diverse disease.

The detection of epigenetic marks or PTM on proteins is an actual analytical challenge because it involves a fraction of low abundant biomolecules. Alterations in these features can change fundamental properties of each molecule that allow direct electrochemical detection [6,7], but receptor-based detection is more attractive because it is target specific. These research avenues require the development of economic, selective, renewable, and reproducible affinity receptors to unravel the function of myriads of proteoforms [8] and its clinical effectiveness to guide cancer management. Antibody reproducibility issues, openly recognized [9], are being battled [10,11]. In fact, there are programs such as the National Cancer Institute's Antibody Characterization aimed at "having three monoclonal antibodies produced for each successfully expressed/purified recombinant antigen and one antibody per peptide (1 to 3 peptides per protein)" [12], which must be extensively characterized under public and rigorous guidelines. Aptamers are the receptors of choice when wishing to direct the recognition to

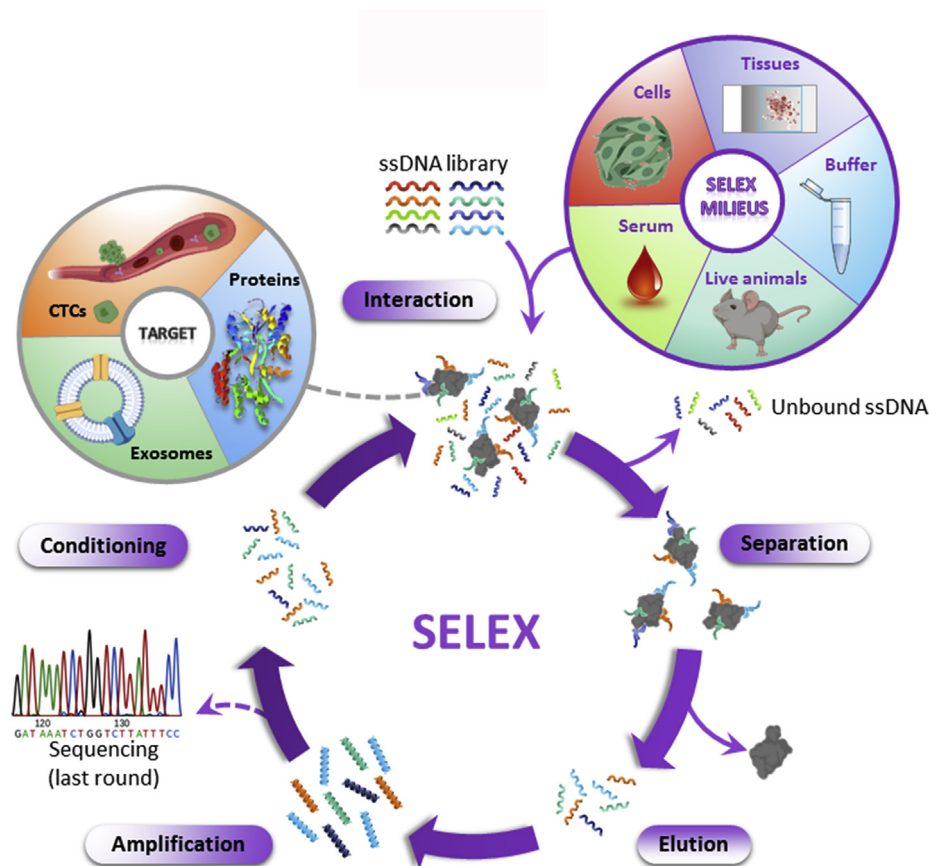
specific sites on a biomarker, typically a protein. The modular concept of *in-vitro* selection of aptamers, schematized in Fig. 1, is very suitable to include steps to eliminate sequences that bind undesired regions of the biomolecule. For details on SELEX procedure and its variants we refer the readers to specific and excellent reviews [13,14]. Batch to batch variation is not a concern with chemically synthesized aptamers, but similar matters regarding the poor characterization are now evident [15–17] and need to be addressed.

Since the first electrochemical aptasensor [18], a variety of aptamer-based electrochemical devices to detect cancer biomarkers have appeared. Those detecting protein tumor biomarkers or, more recently CTCs, have been partially reviewed within a wider scope in terms of transduction [19–21], field of application [22,23] or type of bioreceptors [24,25]. Other reviews are focused on a specific protein tumor biomarker [26–28], type of targets [29] or certain aspects of aptamer-based approaches such as the use of nanomaterials [30,31]. Our approach covers for the first time the three targets enabling liquid biopsy: protein biomarkers, CTCs, and exosomes. The latter has not been reviewed except in a brief paragraph within a very recent compilation of optical approaches [32] and a short perspective on DNA-based biosensors (genosensors and aptasensors) [33].

As long as the reported methods have not been tested in clinical samples their usefulness is not fully demonstrated. This is why, in contrast to previous reviews, our critical discussion is restricted to those. The main goal of the discussion is not the detailed enumeration of every single assay scheme, but to emphasize the suitability for its implementation in clinical settings. We trace back the aptamer sequence to the original selection process to ascertain how the selection environment determines and influences its subsequent application in body fluids. Thus, we first review the viability of using biological media or samples during the SELEX process to secure the native state of the target and ensure the successful functioning of aptamers in the *in-vitro* diagnostic device. This is the most often claimed pitfall with respect to antibodies [34], which are less sensitive to medium variations. The core of the revision is a critical analysis of aptamers used in electrochemical biosensors for the detection of proteins, circulating tumor cells (CTCs) and exosomes as consolidated or potential cancer biomarkers. They represent an accurate picture of the whole aptasensors world in terms of advantages and shortcomings and its potential to reach the market of medical diagnostic devices, aspects commented in the last section of this review.

## 2. Aptamer selection in biological media

An early frontier, soon surpassed, in aptamer selection was the requirement of purified single targets. Cell-SELEX first showed the



**Fig. 1.** Scheme of the SELEX procedure including the common iterative steps: interaction between the library and the target for cancer diagnosis (left wheel) that takes place in one of the milieu indicated in the right wheel; separation of bound from unbound sequences, elution of the bound sequences from the target to obtain a pool of strands with higher affinity, PCR amplification of enriched pool and conditioning to obtain single-stranded DNA to start a new round of selection. Counter and negative steps are not included for clarity. When the enrichment is sufficient, the last step is the massive sequencing or alternatively cloning and sequencing of a limited number of strands.

suitability of complex matrices for the aptamer selection [35], with the benefit of preserving the native state of targets but at the expense of not knowing what the ultimate target is unless costly and time-consuming non-straightforward post-SELEX experiments are carried out (typically in combination with mass spectrometry (MS)). At the same time, it becomes clear that recombinant proteins synthesized through genetic engineering in prokaryotic systems, easy to purify and widely used as targets, may generate aptamers that do not interact with the corresponding native counterpart. This is attributed to PTM in eukaryotes that do not take place in prokaryotic cells. In fact, native proteins are not unique molecules. On the contrary, each one is a set of proteoforms arising from DNA and RNA-levels variations, errors in transcription and translation, PTMs, exposure to toxic compounds and response to pathological states [8].

Therefore, selection of aptamers to unpurified proteins in biological media, such as serum, tissues, and post-operative samples, has attracted great interest [36] (Fig. 1). An important advantage of SELEX procedures in raw materials is that they do not require deep biochemical knowledge to select the target in advance, but careful and more intensive counter-selection steps must be introduced to eliminate non-specific binding events. Besides, as a side-result, these strategies are indirect ways of biomarker screening, after proper identification.

Last year has witnessed the first attempts of using whole serum as an appealing complex target to generate aptamers for diagnostic purposes [37–39]. In all cases pooled serum from cancer diagnosed

patients is used in positive rounds of selection. The extraordinary problem of cancer heterogeneity, low abundance of specific biomarkers and discrimination from benign diseases is addressed by means of counter steps with pooled serum from healthy individuals. That is, the selection is unselectively directed toward any difference between both types of serum. DNA degradation by nucleases after repeated interactions in serum is not reported. Both heterogeneous and in-solution SELEX are proposed. The heterogeneous strategy is based on the immobilization of the serum components on carboxylated magnetic beads (MBs), enabling magnetic separation to discard non-specific bound DNA (negative selection) and unbound DNA (positive selection) [37,38]. Alternatively, the homogeneous approach makes use of neutral polyacrylamide gel electrophoresis to separate bound and unbound fractions, instead of magnetic beads [39]. However, both strategies suffer from several shortcomings. On the one hand, immobilization of serum components seems a limiting strategy not only because the binding capacity of MBs but also because it restricts the targets to those containing functional groups that readily react with them. The lack of auxiliary reagents to activate the negatively-charged  $-\text{COOH}$  groups, low reactive at physiological pH, imposes an additional not well understood restriction [37,38]. Only in one case, depletion of major proteins is performed before indiscriminate immobilization of serum components on MBs [38]. In fact, control experiments with an unrelated aptamer (selected against *E. coli*.) show significant binding to cancer serum components, raising questions about the tumor specificity of the aptamer and the

identity of the target. On the other hand, the proposed homogeneous SELEX complicates the separation of bound fractions [39]. Although pioneering, this SELEX approach has certain weaknesses. Despite tumors from distinct organs share biomarkers, sera from patients with different types of cancer were not used in negative selection steps. Counterintuitively, the obtained aptamers using serum from gastric cancer showed selectivity against other cancers (lung, colorectal or hepatocellular) even though among the MS-assigned candidate targets are molecules present in several cancers [37]. Some of the aptamers derived in serum show promising clinical performance in hepatocellular cancer, but more strict studies in patients with other types of cancer are needed [39].

In the above described SELEX, the abnormal components of the serum are the targets. Beyond this application, human serum can be used to mimic the real environment. In an early attempt, simulated trypsinized human plasma (25%) was used to isolate aptamers to be employed in MB-pull down prior to MS. When the aptamer was tested in human serum samples, the binding buffer required supplementation with EDTA to chelate divalent ions in order to allow the correct folding of the aptamer [40], showing an ion-dependent functioning of the selected aptamer. This is a typical example of the need for exact matching the selection milieu.

Post-operative samples as a source of targets for aptamer selection are also of great interest. The protein expression in tumor cell cultures might be different from that in primary tumor tissues, thus aptamers generated through classic Cell-SELEX might not achieve the analytical requirements to be applied in clinical specimens. With this idea in mind, Zamay et al. developed aptamers to lung adenocarcinoma cells derived from post-operative tissues, using lymphocytes and normal lung cells in the negative selections [41]. The cancer variability is addressed because each round is performed with fresh samples from different patients. The aptamers selected after 11 rounds bind to various candidate proteins identified by HPLC-HR-MS based on probability scoring. In support of this approach, these aptamers recognize the targets on CTCs and extracellular vesicles in peripheral blood of lung cancer patients, while they only weakly bind to cancer culture cells. The weak point is the need for a precise coordination between surgeons and laboratory teams, effort which is not always at hand. One of the aptamers was finally used for magnetic isolation of targets from crude blood plasma samples and for their subsequent electrochemical quantification, allowing to observe significant differences between healthy and cancer patients [42].

Similarly to post-operative samples, tissue slides have been employed to develop aptamers [43–46]. A remarkable advantage of tissue sections is that they are more representative of the cancer morphology than cultured cell lines, thus allowing the evolution of aptamers against different histological sections, including the extracellular matrix, the membrane components, and intracellular targets [43,46]. Image-guided selection of aptamers that bind to tumor vasculature or tumor cells but not to stromal cells has been achieved using a laser beam to cut the region of interest [44]. Recently, an automatic microfluidic system has reduced the selection time to 15 h [45]. A possible drawback of tissue-SELEX is that the process of tissue slicing, immobilization, and staining with chemical reagents might lead to the denaturation of the target proteins on the tissue slide [36].

Other alternative routes to obtain aptamers in unpurified biological media include *in vivo* SELEX, which consists of the selection of aptamers able to specifically bind tumors in living animals [47–51]. Such methods rely on the direct injection of the nucleic acid library into the animal and the extraction of the target tissue after binding, which abolishes one of the most attractive characteristics of these receptors: animal-free selection. These approaches also require modified oligonucleotides to skip the nuclease

degradation and are mostly aimed at the development of aptamers for targeted-drug delivery, and so are beyond the scope of this review.

### 3. Electrochemical aptasensors for protein tumor biomarkers

In general, aptamer selection against tumor biomarkers is performed in “biological” buffers, namely phosphate buffer saline and then tested in body fluids. Most of the electrochemical aptasensors have been tested in blood fractions because it is also the most tested body fluid in hospitals and there is reliable information on the clinical performance. Urine [52,53] and recently saliva [54] are slowly appearing as alternative samples, though they are fully non-invasive and easy to collect from healthy individuals.

There are still many cases where only artificially spiked samples were tested. Though it is a step toward real applications, accessibility to clinical samples should be compulsory to draw accurate conclusions. Currently, there are aptamers selected against FDA-approved biomarkers such as alpha-fetoprotein (AFP) [55,56], PSA [57–61], carcinoembryonic antigen (CEA) [62–69], HER2/neu [70,71] or carbohydrate antigen 125 (CA125) [72–74]; and potential cancer biomarkers such as mucin 1 (MUC1) [62], neuron specific enolase (NSE) [67], osteopontin [75], vascular endothelial growth factor (VEGF<sub>165</sub>) [76,77], platelet-derived growth factor (PDGF) [52,53], epidermal growth factor receptor (EGFR) [78] and interleukin-6 (IL-6) [54].

Even aptamers against unknown targets are starting to be applied. This is the case of a direct aptasensor for the detection of lung cancer-related proteins [42]. In this case, the standards for calibration are proteins purified using streptavidin-MB from blood of lung cancer patients eluted in urea. This means that the aptamer is able to recognize the denatured protein target. The aptamer whose sequence, including the primers, is 5'-CTC CTC TGA CTG TAA CCA CGT GCC CGA ACG CGA GTT GAG TTC CGA GAG CTC CGA CTT CTT GCA TAG GTA GTC CAG AAG CC-3' is stable in contact with crude plasma samples up to 5 h due to the preincubation of the aptamer-modified Au electrode with masking DNA [42].

When the target is predefined, purified native or recombinant proteins are used during the SELEX. In the case of MUC1, highly expressed by the majority of human adenocarcinomas and indicating a poor survival ratio, several types of recombinant proteins were used as targets [79,80], which yielded a set of aptamers. The one with the sequence 5'-GCA GTT GAT CCT TTG GAT ACC CTG G-3' was applied to detect the protein shed to the bloodstream [62] but also to isolate CTCs (see section 4).

It has been argued that RNA aptamers are better suited for binding due to conformational diversity but, for analytical applications, DNA aptamers are superior and preferred because they are less prone to nuclease degradation. Importantly, direct translation of an RNA sequence to obtain the DNA counterpart able to bind the same target does not work [16,34]. The absence of 2'-OH groups strongly affects the recognition ability so the resultant aptamer is not functional. SELEX using DNA or RNA libraries selects sequences completely different, though the enrichment process depends on additional designing factors. As an example, Meirinho et al. used an RNA aptamer previously described to bind human recombinant osteopontin (5'-CGG CCA CAG AAU GAA AAA CCU CAU CGA UGU UGC AUA GUU G-3') [81] with precautions to avoid degradation. Contrarily to the original aptamer, it was not synthesized with 2'-OMe cytosine and uracyl nucleotides and therefore it was only applied in buffer solutions [82]. The analytical application in serum samples required a new selection from a DNA library against the recombinant human protein. The winning sequence (5'-TGT GTG CGG CAC TCC AGT CTG TTA CGC CGC-3') does not match the RNA one [75].

Most aptasensors use the thiol-Au chemistry to anchor an aptamer on the transducer. The stability of these mixed self-assembled monolayers (SAMs) is shorter than a month [57,83] limiting the potential commercialization. Ternary SAMs have been reported to triplicate stability at least in genosensors [84] but they have not been widely adopted. Paper-based aptamer-containing devices showed superior stability than mixed SAMs, though they also rely on AuNPs for immobilization [67]. Of note, 96.7% of signal remains after 4 weeks, higher percentage than using an antibody in an identical sensor layer, showing the improved stability of synthetic receptors.

Magnetic beads-based assays are appealing because of the compatibility with automation/microfluidics widely used in clinical labs. In one aptasensor for CEA using a 18-nt long aptamer (in italics) elongated to form a hairpin (5'-CCA CGA TAC CAG CTT ATT CAA TTC GTG G-3'), the streptavidin-modified MBs were used to entrap the biotinylated aptamer-CEA complex formed on Janus nanoparticles. The biotin tag was only accessible after recognition due to aptamer conformational switching [63]. However, the calibration by single standard additions complicates its clinical applicability. Another strategy is tethering the CEA aptamer to the MB by amide-coupling [66].

Biosensors require the receptor is in intimate contact with the transducer. An extended but not recommended trend includes under this definition homogeneous assays where the electrode is only used to measure the redox activity of a soluble probe. In a typical example of those, the transduction is achieved after a highly complicated recycling scheme (Fig. 2A). It involves the digestion of a methylene blue-tagged DNA, which ultimately adsorbs on the graphene/GCE electrode and provides the analytical signal. The 18-nt CEA aptamer is designed as a hairpin structure that is opened only in the presence of the target [68].

The dominant assay format is the direct detection with a single aptamer. Depending on the interrogating technique the analytical signal can increase or decrease when the target concentration increases. Increasing analytical signals are preferred because they are less prone to false positive results when the sensor platform is degraded. When impedance is measured, protein binding to aptamer tethered to the transducer surface usually yields “signal-on” methods (Fig. 2B). The detection of VEGF<sub>165</sub> with the aptamer 5'-TTT CCC GTC TTC CAG ACA AGA GTG CAG GG-3' chemisorbed on Au-based nanostructures is an example [76,77]. The former sensor was also used in “signal-off” mode by measuring the current of an electroactive molecule that binds to the aptamer being displaced after protein recognition (Fig. 2B). Similarly, other “signal-off” approaches add redox probes in solution to measure their accessibility to the sensor surface that is usually impeded after protein recognition [55,57,75,76]. To further decrease the electroactive surface area, the addition as blockers of hydrophobic beads specific for high molecular weight proteins was reported to enhance the sensitivity of a direct assay for lung cancer-related proteins by two orders of magnitude [42]. Attachment of the redox probe to the sensor layer makes the addition of any external reagents unnecessary [59,67]. For point-of-care (POC) applications, reagentless methods are desirable. To this aim the use of self-reporting strands is the ideal strategy. This requires that the aptamer structural switching, upon binding, brings the distal-appended redox label close to the electrode surface. Plaxco's group pioneers this sensor architecture and applied it to PDGF detection, but in undiluted serum the detectability resulted significantly reduced [85]. This strategy is not of general application because it requires a large conformational change, which is not always experienced by the aptamers selected under affinity pressure rather than proper folding for sensing. Besides, the LOD, defined by the total number of self-reporting aptamers on the surface, does not reach those of

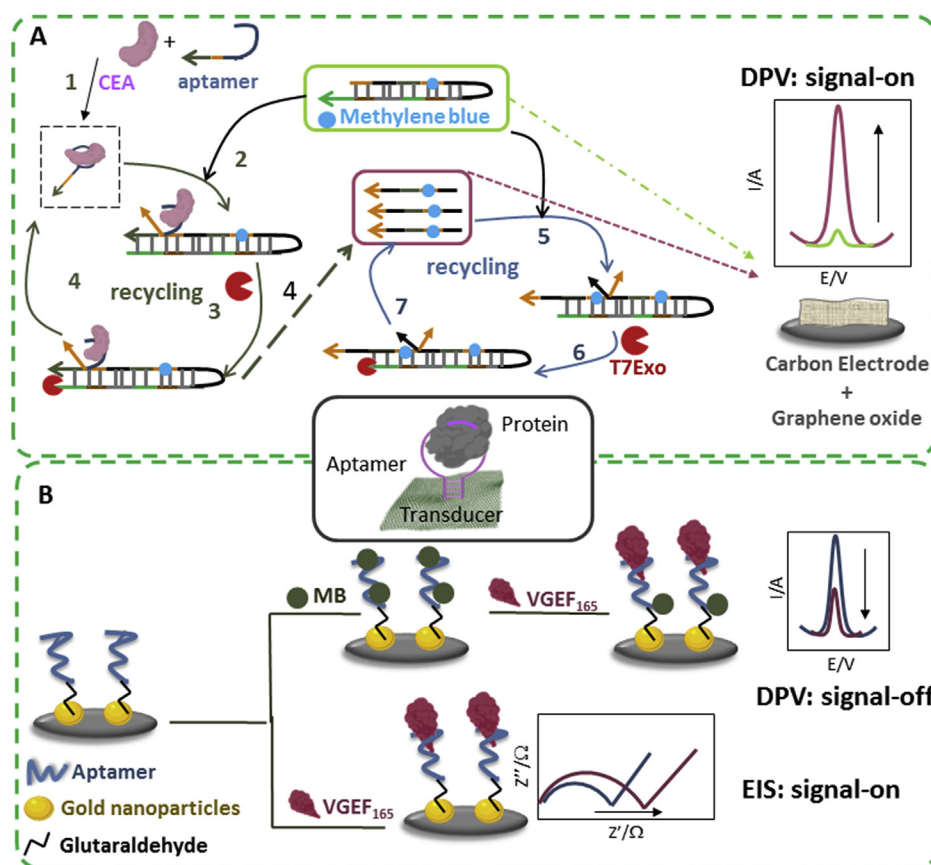
conventional ELISA. Likewise, it is not easily coupled to amplification schemes [86]. Nonetheless, this strategy is valuable for real-time detection of small molecules in body fluids [87], where weak aptamer-ligand binding makes this interaction reversible.

Sandwich approaches are scarce in spite of the outcome of SELEX process being a collection of high-affinity binders. However, the candidates must bind different sites, which require additional screening experiments unless two identical binding sites exist. Aptamer truncation to the minimal length with the highest affinity is a post-SELEX time-consuming, and costly work carried out through trial and error experiments or more recently guided by molecular dynamics [88,89]. Nonetheless, it is vividly recommended to minimize undesired hybridization events between a pair of receptors in sandwich formats and for economic reasons of the final device. CEA aptamers, for example, contain after truncation of the original library just 18-nt (the above cited) and 19 nt (5'-AGG GGG TGA AGG GAT ACC C-3'), half the commonest length [65]. Recently, PSA aptamer candidates for a sandwich approach were scrutinized for hybridization ability to minimize unspecific signals [61] (Fig. 3A). The case of PDGF-BB, one of the isoforms of the PDGF implicated in the cell transformation process and in tumor growth and progression, is special because it is a homodimer. Curiously, the original SELEX was performed against a recombinant PDGF-AB to obtain aptamers that bind to the A chain but all screened aptamers exhibited preferential binding to the B chain in spite of a 60% homology between them [90]. Sandwich approaches with the aptamer that way obtained, 5'-CAG GCT ACG GCA CGT AGA GCA TCA CCA TGA TCC TG-3', are straightforward [52].

The need for high affinity aptamers is demonstrated in a sandwich aptasensor for HER2 protein. Direct replacement of one or two anti-HER-2/neu antibodies with aptamers rendered lower sensitivity due to lower in-solution aptamer affinity or availability of proper binding sites, although the limit of detection (LOD) was not affected [70]. The aptamer used is a trimeric version of the original 14 nt-long aptamer 5'-GCA GCG GTG TGG GG-3', selected against a purified HER-2 protein from gastric cancer cells [91]. The monomeric aptamer was also employed in a peptide-aptamer sandwich assay [71]. It was extended with a toehold sequence that served as initiator of a self-assembled hybridization chain reaction. This aptasensor was tested in HER2<sup>+</sup> and HER2<sup>-</sup> breast cancer patients and also after surgery corroborating with the postoperative decrease in the biomarker level recorded with an ELISA method.

Mixed antibody-aptamer assays bypass the hybridization issue, usually with aptamer acting as the signaling receptor. This format extends the amplification schemes to those based on molecular biology tools. Six-fold increase in signal and 500-fold lower LOD for CEA, a biomarker for several cancers, were achieved using a DNA isothermal amplification scheme, Rolling Circle Amplification (RCA), and the 18-nt aptamer sequence [69]. Hybridization chain reaction (HCR) that consists of a supersandwich extension through two assisting DNA strands, also improved the detection of CA-125, a glycoprotein elevated in ovarian cancer. In this approach, the aptamer 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC AAG AAT AAA CGC TCA A-3' was used and the amplification power of HCR was increased by a branching growth on AuNPs [72] (Fig. 3B). The way of selection of this sequence as well as of other aptamers for this biomarker (e.g. 5'-TTA TCG TAC GAC AGT CAT CCT ACA C-3') used in electrochemical approaches [73,74] is not declared.

More rarely, aptamers act as capture elements while antibodies are the detection receptors. This scheme has been evaluated in a EGFR sensor. In this case a biotinylated aptamer anchored to streptavidin-MB recognized EGFR, and the AuNPs covered with the corresponding antibody served for recognition and as a reporter after dissolution of Au in acid [78]. Interestingly, this is one of the few examples of an RNA aptamer with an untruncated, unusually



**Fig. 2.** Direct aptamer assays for the detection of protein tumor biomarkers. (A) Homogeneous "signal-on" assay based on two coupled nuclease-assisted recycling schemes, which renders a shortened methylene-blue reporter strand that adsorbs on the graphene oxide modified electrode. Adapted with permission from Ref. [68]. (B) Aptasensor using AuNPs to anchor the capture aptamer with two detection modes: "signal-off" voltammetric (upper scheme) and "signal-on" impedimetric measurements (bottom scheme). Adapted with permission from Ref. [76]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

long sequence 5'-GGC GCU CCG ACC UUA GUC UCU GUG CCG CUA UAA UGC ACG GAU UUA AUC GCC GUA GAA AAG CAU GUC AAA GCC GGA ACC GUG UAG CAC AGC AGA-3'. Modification of the nucleobases routinely needed to preclude nuclease degradation was not used. Interestingly, one-week storage stability and capability to discriminate between serum from healthy and cancer patients is reported.

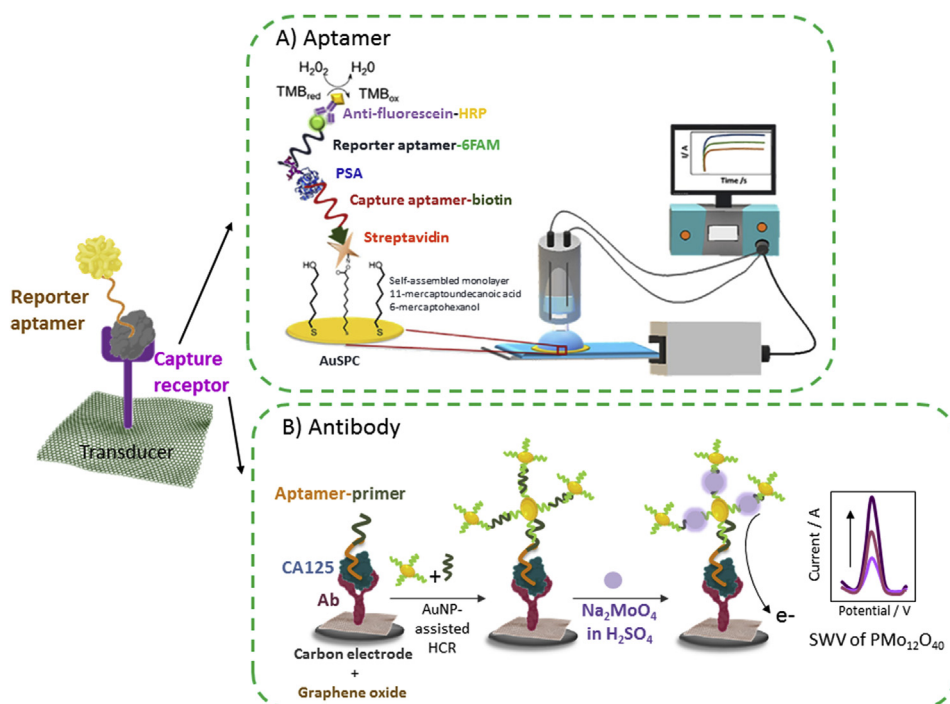
The ingenious amplification schemes affordable only with aptamers have reached noticeable LOD but increase the cost when enzymes (exonuclease strand recycling [68] or isothermal DNA amplification schemes [69]) or auxiliary strands (hybridization-based displacement between aptamer and complementary DNA [62,73], HCR [71,72] or combination of both [66]) are needed. Likewise, the level of complexity increases requiring trained personnel to obtain reproducible results.

Multiplexing is a desirable characteristic of biosensors because there is increasing evidence pointing out that early detection of cancer needs panels of biomarkers to be simultaneously detected [92]. Dual aptasensors are emerging but only a few have been tested in clinical samples [62,67].

Reusability, on the contrary, is not very common in clinical practice. Low-cost disposable biosensors are commonly claimed as advantageous but when thousands of analyses per month are performed the cost could become unaffordable. Reusable biosensors are not easy to obtain without damaging the sensor layer. An aptasensor for PSA claims easy regeneration by immersion in water at 70 °C for 1 h [57]. This temperature is high enough to disassemble the aptamer-target complex while maintaining the

aptamer chemisorption on Au nanoparticles. The LOD of this aptasensor is well below the decision threshold for prostate cancer diagnosis. Taking into account that all healthy men have PSA content around this threshold, it is curious that serum from healthy people gave signals similar to blank samples (in buffer). One possible explanation is the use of serum from women but it was not specified. High temperatures are expected to disrupt the Au-thiol bond. Nonetheless, temperatures as high as 95 °C for 5 min did not show evidence of degradation of the sensor biolayer after 5 cycles of using a very long aptamer (5'-GTG ACG CTC CTA ACG CTG ACT CAG GTG CAG TTC TCG ACT CGG TCT TGA TGT GGG TCC TGT CCG TCC GAA CCA ATC-3') for AFP detection, a tumor biomarker in use at diagnosis of hepatocellular carcinoma for disease staging [55].

An innovative approach for the detection of protein biomarkers through both the peptide and glycan regions has been first explored for PSA. The sandwich format uses the Savory's et al. protein binding aptamer 5'-AAT TAA AGC TCG CCA TCA AAT AGC-3' [93] to capture the protein and a glycan aptamer specifically derived for human PSA (5'-GGA CGG TTG CGC TAT ATT TAA CCA AAA GTC TGG ATT AAC A-3') [61] to recognize the glycosylated region of the protein (Fig. 3A). Both aptamers were selected in artificial buffers after exposure to the purified protein but the second one was deliberately directed towards the sugar moiety. Interestingly, when deployed in serum samples of patients with suspected prostate cancer, the aptasensor shows some discordant results with respect to the reference electrochemiluminescence method used in the hospital. Those punctual samples correspond to people with PSA



**Fig. 3.** Sandwich assays for protein tumor biomarkers using aptamers as a reporting element. (A) Aptasensor for PSA with aptamer for capturing and chronoamperometric detection on disposable electrodes. Reprinted with permission from Ref. [61]. (B) Aptasensor for CA125 using an antibody for capturing and nanoparticles to assist the hybridization chain reaction enabling the amplification of the signal due to the soluble reporter molecule. Adapted with permission from Ref. [72].

content in the “gray zone” (inconclusive range because elevated PSA content could be ascribed to benign prostate conditions) or higher, who were finally diagnosed of something else. The aptasensor was able to correctly classify them pointing to superior discrimination. Nevertheless, the aptasensor should be tested in a larger cohort of serum samples to draw robust conclusions.

The main analytical features of the selected electrochemical approaches are summarized in Table 1. Of note, the analytical figures of merit are mostly obtained in buffer except in a few cases where the dynamic range and LOD is also explored in the body fluid. This information is essential in order not to overestimate the analytical performance in clinical settings and for validation. The effects on the analytical features vary depending on the type of sample, the transduction technique and the sensor architecture offering different antifouling degrees. The graphene-based FET demonstrated good resistance to fouling with similar performance in artificial gargle solutions and human saliva [54]. It is quite interesting to compare the effect of serum on two similar immobilization strategies: tethering the capture biotinylated aptamer to streptavidin covalently linked to a carboxylic SAM. One of the approaches, the sandwich aptasensor for PSA showed identical LOD in both media. The concentration range narrowed in serum due to the hook effect (signal decrease at high concentrations) that is shifted to smaller concentrations than in buffer [61]. In contrast, the osteopontin aptasensor showed worse LOD by CV, but slightly lower by SWV. However, the regression equations lost linearity ( $r < 0.95$  vs  $0.9995$  in buffer) [75]. The difference might be the length of the carboxylated alkanethiol chain; 3 carbons for the osteopontin sensor versus 11 for the PSA one, and the lack of passivating thiol in the former. Finally, an interesting case is detection of CEA using Janus nanoparticles and MBs. It shows a three-fold loss in sensitivity that worsens the LOD, although the sample is not in contact with the transducer, which is considered favorable to minimize unspecific signals, and a high dilution of the

serum is carried out (1:100). The assay still covers the clinical range [63].

In general, the number of samples tested are rather limited (from 1 [63,75,77] to 21 [59]). Validation with other routine methods is not always presented and when it is estimated as trueness (bias), it ranges between 2% [58] and 18 [76]–23% [57].

#### 4. Electrochemical aptasensors for CTCs

Circulating tumor cells (CTCs) are cells detached from primary tumors that enter the bloodstream or the lymphatic system, where they invade distant sites of the body and form metastatic tumors, eventually giving rise to cancer-associated deaths [94]. They are considered as “treasure chests” because harbor proteins and nucleic acids that provide unique information about the tumor. Therefore, the role of CTCs as minimally invasive cancer biomarkers would be twofold. Their concentration is meaningful for cancer prognosis and treatment monitoring; while their cargo carries valuable information to facilitate the implementation of personalized therapy.

Despite their promising applications in cancer management, the rare occurrence of CTCs in blood (1–100 CTCs among billions of healthy blood cells in 1 mL of whole blood is clinically significant) along with the limited blood sample volume available (~5–10 mL) hampers their sensitive and specific detection. In consequence, prior to CTC analysis, they are usually captured and preconcentrated. There is a plethora of methods for CTC isolation [95] that could be roughly divided into two large groups. The first one comprises traditional methods based on physical properties of tumor cells such as size, density, electrical charge and deformability. Although intact CTCs are recovered in a cost-effective way, they suffer from limited purity as a result of their low selective isolation. The second group encompasses those methods based on biological features, namely on the affinity binding of specific antigens present

**Table 1**  
Summary of analytical characteristics of published electrochemical aptamer-based assays for free protein detection.

Receptor	Sensing platform/Assay format	Detection method	Linear Range/LOD	Sample (number)	Ref.
AFP-aptamer	Spindle-shaped Au nanostructures on AuE/ direct (signal off)	DPV of ferri/ferrocyanide	0.005–100 ng mL <sup>-1</sup> / 0.23 pg mL <sup>-1</sup>	S (20)	[55]
AFP apt	AuE/direct	DPV of ferri/ferrocyanide	0.01–100 pg mL <sup>-1</sup> / 3.1 fg mL <sup>-1</sup>	S (3)	[56]
PSA apt	Au nanospers + AuE /direct (signal off)	DPV of ferri/ferrocyanide	0.125–200 ng mL <sup>-1</sup> / 50 pg mL <sup>-1</sup>	S (10)	[57]
PSA apt	rG/AuNPs/MWCNT/GCE/direct	DPV of ferri/ferrocyanide (signal off)	0.005–20 ng mL <sup>-1</sup> /1 pg mL <sup>-1</sup>	S (4)	[58]
PSA apt	AuNPs/rGO/THI/SPCE (signal off)	EIS	0.005–100 ng mL <sup>-1</sup> /1 pg mL <sup>-1</sup>	S (21)	[59]
PSA apt	round hairbrush-like Au nanostructure/direct	DPV of THI	0.05–200 ng mL <sup>-1</sup> /10 pg mL <sup>-1</sup>	S (10)	[60]
Cap: PSA apt Sign: PSA-1 apt	Strep on AuE/sandwich	Chronoamperometry of TMB	0.125–128 ng mL <sup>-1</sup> / 50 pg mL <sup>-1</sup>	S (15)	[61]
CEA apt hybridized to cDNA CEA apt	AuE/strand displacement assay Au–SiO <sub>2</sub> Janus NPs-CE/direct	DPV of metal ion labels + Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> <sup>3+</sup> Amperometry (enzyme amplification)	0.66–62.5 ng mL <sup>-1b</sup> in buffer/ 0.66–25 ng mL <sup>-1b</sup> in serum/ 0.66 ng mL <sup>-1</sup> (both)	S (5)	[62]
CEA apt	rG + Strep-CE/direct	DPV of metal ion labels + Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> <sup>3+</sup>	0.01 pM–100 nM/3.33 fM	S (1)	[63]
CEA apt	rG + Strep-CE/direct	Amperometry (enzyme amplification)	0.2–5000 ng mL <sup>-1</sup> /70 pg mL <sup>-1</sup> in buffer 1–5000 ng mL <sup>-1</sup> /210 pg mL <sup>-1</sup> in reconstituted serum	S (8)	[64]
Cap: CEA apt 18-nt Sign: CEA apt 19-nt	hemin-GO-GCE/sandwich	DPV of 2,3-diaminophenazine	5 pg mL <sup>-1</sup> –50 ng mL <sup>-1</sup> / 1.5 pg mL <sup>-1</sup>	S (9)	[65]
CEA apt	MB-aptamer-cDNA (capture) NTH-cDNA2 on AuSPE (detection) Strand displacement	Electrochemiluminescence	0.8–4 ng mL <sup>-1</sup> /0.28 pg mL <sup>-1</sup>	S (5)	[66]
CEA apt	NG/THI/PB-AuNPs/GCE on paper/direct (signal off)	HCR + DPV (hemin-G-quadruplex)	0.0001–50 ng mL <sup>-1</sup> /18.2 fg mL <sup>-1</sup>	S (15)	[67]
CEA apt	NG/THI/PB-AuNPs/GCE on paper/direct (signal off)	DPV of THI	0.01–500 ng mL <sup>-1</sup> /2 pg mL <sup>-1</sup>	S (15)	[67]
CEA apt	rGO on p-nitrophenyl modified GCE/ homogeneous	DPV of adsorbed MB-ssDNA after exonuclease recycling	80 ag mL <sup>-1</sup> –950 fg mL <sup>-1</sup> / 80 ag mL <sup>-1</sup>	S (5)	[68]
Cap: anti-CEA Ab Sign: CEA apt	GO-chitosan GCE/sandwich	RCA amplification + SWV of phosphomolybdate	0.5 pg mL <sup>-1</sup> –1 ng mL <sup>-1</sup> / 0.1 pg mL <sup>-1</sup>	S (7)	[69]
Cap & sign: trimeric HER2- neu apt or Ab	Strep-MB/sandwich with cellulose labels	Chronocoulometry (nitrocellulose enzymatic degradation)	10 <sup>-15</sup> –10 <sup>-10</sup> /1 fM <sup>c</sup>	S <sup>c</sup>	[70]
Cap: peptide Sign: monomeric HER2 apt	AuE/sandwich	HCR amplification + SWV of phosphomolybdate	1–100 pg mL <sup>-1</sup> /0.047 pg mL <sup>-1</sup>	S (6)	[71]
Cap: CA125 Ab Sign: CA125 apt	GO-chitosan GCE/sandwich	HCR on AuNPs + SWV of phosphomolybdate	100 μU mL <sup>-1</sup> –10 U mL <sup>-1</sup> / 50 μU mL <sup>-1</sup>	S (8)	[72]
CA125 apt	AgNPs amidoxime-modified nanofibers on ITO/strand displacement	DPV of methylene blue	0.01–350 U mL <sup>-1</sup> / 0.0042 U mL <sup>-1</sup>	S (5)	[73]
CA125 apt	rGO and MWCNT/direct (signal off)	Field effect transistor	10 <sup>-9</sup> U mL <sup>-1</sup> –1 U mL <sup>-1</sup> / 5 × 10 <sup>-10</sup> U mL <sup>-1</sup>	S (1)	[74]
MUC1 apt hybridized to cDNA	AuE/displacement assay	DPV of metal ion labels and Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> <sup>3+</sup> wires	0.01 pM–100 nM/3.33 fM	S (5)	[62]
NSE apt	graphene/THI/PB-AuNPs-CE on paper/direct (signal off)	DPV of PB	0.05–500 ng mL <sup>-1</sup> / 10 pg mL <sup>-1</sup>	S (15)	[67]
Osteopontin apt	Strep on AuSPE/direct (signal off)	CV and SWV of ferri/ferrocyanide	CV: 25–100 nM/2.6 nM in buffer SWV: 12–100 nM/1.4 nM in buffer; 1.3 nM in serum	S (1)	[75]
VEGF <sub>165</sub> apt	BSA-Au nanoclusters on IL-GCE/direct (signal off)	EIS (ferri/ferrocyanide) signal on DPV (methylene blue)	2.5–250 pM/0.48 pM 1–120 pM/0.32 pM	S (3)	[76]
VEGF <sub>165</sub> apt	OMC-Au composite-SPE/direct	EIS (ferri/ferrocyanide)	10–300 pg mL <sup>-1</sup> /1 pg mL <sup>-1</sup>	S (1)	[77]
Cap & sign: PDGF-BB apt	AuNPs-rG-apt/sandwich	AuNP carrying apt and GOD + luminol ECL	0.1 pM–0.5 nM/17.4 fM	U (3)	[52]
PDGF-BB apt	VS <sub>2</sub> /AuNP-GCE/direct (signal off)	DPV of ferri/ferrocyanide	1 pM – 1 nM/0.4 pM	U (5)	[53]
Cap: EGFR apt Sign: EGFR pAb	Strep-MB with apt (cap) + AuNPs-Ab (detection)	DPV of Au after acid dissolution	1–40 ng mL <sup>-1a</sup> /50 pg mL <sup>-1</sup>	S (9)	[78]
IL-6 apt	Graphene/direct (signal off)	Field effect transistor	0.05–20 nM <sup>b</sup> / 10.5 pM in PBS 11.8 pM in artificial gargle 12.2 pM in human saliva	SL (3)	[54]
Apt for unknown lung cancer proteins	AuSPE/direct (signal off)	SWV of ferri/ferrocyanide	0.023–230 ng mL <sup>-1</sup> / 0.023 ng mL <sup>-1</sup>	P (13)	[42]

Apt: aptamer; AuE: gold electrode; BSA: bovine serum albumin; Cap: capture; cDNA: complementary DNA; CE: carbon electrode; DPV: differential pulse voltammetry; ECL: electrochemiluminescence; EIS: electrochemical impedance spectroscopy; GCE: glassy carbon electrode; GOD: glucose oxidase; IL: ionic liquid; MWCNT: multi-walled carbon nanotubes; NTH: nanotetrahedron; OMC: ordered mesoporous carbon; P: plasma; PB: prussian blue; rG: reduced graphene; S: serum; Sign: signaling; SL: saliva; SPE: screen printed electrode; SWV: square wave voltammetry; Strep: streptavidin; THI: thionine; U: urine.

<sup>a</sup> Two linear ranges.

<sup>b</sup> Non-linear calibration.

<sup>c</sup> Only tested with antibodies.



on the surface of CTCs. To this group belongs CellSearch®, the only commercial product approved by the US Food and Drug Administration for CTC detection. It relies on immunomagnetic capture of CTCs of epithelial origin by using an *anti*-EpCAM antibody attached to magnetic particles. However, some CTCs might escape isolation due to dynamic changes in tumor cells such as epithelial-mesenchymal transition.

Being functional nucleic acids obtained by chemical synthesis, aptamers possess intrinsic features that make them a better choice for specific separation and release of CTCs. Particularly interesting are their small size, high thermal and chemical stability, and easy modification with functional groups for efficient isolation of CTCs. Likewise, the release of captured CTCs while keeping cells viability could be carried out by reversible thermal disruption of affinity binding or nuclease cleavage, among other strategies [96]. Table 2 describes the distinctive features of the aptamer-based assays for CTCs detection in body fluids. Of note, all analytical characteristics were obtained in buffer.

The aptamer most commonly used for the design of electrochemical aptamer-based cytoassays is an aptamer against EpCAM, a transmembrane glycoprotein exclusively expressed in epithelial cells and epithelial derived neoplasm. This is a 48-nt DNA sequence so-called SYL3C (5'-CAC TAC AGA GGT TGC GTC TGT CCC ACG TTG TCA TGG GGG GTT GGC CTG-3'), obtained by a SELEX process which uses the purified recombinant protein as the target [97], but it has been proven to recognize EpCAM both on cell surfaces and exosomes. Direct recognition of breast cancer cell line MCF-7 is possible [98] as well as in combination with antibody [99] or a glycan-binding protein [100], which indicates different binding sites for aptamer and antibody on the protein moiety and lack of

affinity for the sugar region.

CTCs usually carry more than one of the target proteins, which make sandwich approaches more frequently designed than in the case of free protein detection. The 25 nt-long MUC1 aptamer above mentioned acted as capturing and signaling receptor to detect MCF-7 cell line in spiked serum [101] and blood [102].

Aptamers for CTC detection are not limited to those raised against purified proteins. When searching for discriminating features between normal and tumor cells, Cell-SELEX-derived aptamers are of great utility. Aptamers specific of leukemia cells (CCRF-CEM) were obtained by using a Burkitt's lymphoma cell line (Ramos cells) as negative control [103]. Optimization of the best binders based on their secondary structure led to a 41-nt long aptamer named sgc8c (5'-ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA-3') [104], widely used in aptasensing. Specifically, electrochemical aptassays were applied to CCRF-CEM added to serum samples [105–107] or clinical samples from patients [108]. The target of sgc8c aptamer turned out to be PTK7-5, an isoform of protein tyrosine kinase 7 [109]. Selective recognition of Burkitt's lymphoma cells can be also achieved with a 44-nt aptamer TD05 (5'-ACC GGG AGG ATA GTT CGG TGG CTG TTC AGG GTC TCC TCC CGG TG-3') with immunoglobulin heavy Mu chain (IGMN) as binding site [35]. Despite omitting the counter selection step in Cell-SELEX process, cytoassays based on TD05 aptamer showed specific binding to Ramos cells in the presence of breast (MCF-7 and SK-BR-3), lung (A549) and leukemia (CCRF-CEM) cancer cell lines [108].

A panel of aptamers has been selected to detect CTCs derived from liver cancer, among which TLS1c (5'-ACA GGA GTG ATG GTT GTT ATC TGG CCT CAG AGG TTC TCG GGT GTG GTC ACT CCT G-3')

**Table 2**

Summary of analytical characteristics of published electrochemical aptamer-based assays for CTCs detection.

Receptor	Sensing platform/Assay format	Detection method	Linear Range & LOD (cells mL <sup>-1</sup> )	Sample (number)	Ref.
EpCAM apt	AuE-cDNA partially hybridized with apt/Direct	EIS	30 × 10 <sup>6</sup> /10	MCF-7 Spiked serum	[98]
Cap: EpCAM Ab Sign: EpCAM apt	MB (capt) + AuE electrode (detection)/ Sandwich	RCA + SWV of phosphomolybdate	5-30000/1	MCF-7 (breast cancer) Spiked whole blood	[99]
Cap: EpCAM apt Sign: Concanavalin A	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -NPs (capture) + AuE (detection) Sandwich	Pd@AuNPs catalysis Chronoamperometry	100–1 × 10 <sup>6</sup> /30	MCF-7	[100]
Cap: MUC1 apt Sign: MUC1 apt	GCE-rGO-AuNPs Sandwich	DPV (CuO nanozyme)	50–7 × 10 <sup>3</sup> /27	MCF-7 Spiked artificial human serum	[101]
AS1411 & MUC1 apt (both for Cap and Sign)	Au-NTH-bearing aptamers Sandwich	MOF-PtNPs decorated with apt and DNAzyme- DPV	20–1 × 10 <sup>7</sup> /6	MCF-7 Spiked in blood	[102]
PTK7 apt	GCE-Au nanostars Direct (signal off)	DPEE with AA	5–1 × 10 <sup>5</sup> /5	CCRF-CEM Spiked in 10% human serum	[105]
Cap: PTK7 apt	AuNP-apt (capture) AuE-hairpin probe/strand displacement (signal off)	NEase-TCEP SWV of methylene blue	5-5000/1	CCRF-CEM Spiked in blood samples	[106]
Cap: PTK7 apt	Array nanochannel-ion channel hybrid (silanized PAA membrane-NH <sub>2</sub> -aptamer)/direct	LSV (blockage of ionic flow through channels)	100-1000/100	CCRF-CEM	[107]
Cap & Sign of Ramos: Ig heavy Mu chain apt Cap & Sign of CCRF-CEM: PTK7 apt	Magnetic nanocomposite (capt) + CE (detection) Sandwich	SWV Fc and THI attached to AuNPs	5-500 (both) 4 (Ramos) and 3 (CCRF-CEM)	Ramos & CCRF-CEM Spiked whole blood Blood from leukemia patients (3)	[108]
Hepatocellular carcinoma-specific apt Cap: two types of MEAR apt	Au-NTH + aptamer-PtNPs-primer displacement GCE/Direct (signal off)	DPV of HRP-mimicking DNAzyme generated by RCA DPV of ferri/ferrocyanide	10–1 × 10 <sup>6</sup> /3 1-14/1	HepG2 Spiked in blood MEAR	[110] [111]
AS1411 apt	Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> -APTES-GO-CO <sub>2</sub> H Direct (signal off)	LAPS	5 × 10 <sup>3</sup> –5 × 10 <sup>6</sup> /5 × 10 <sup>3</sup>	HeLa, A549, MB231 Spiked in blood Blood breast cancer patients (8)	[112]

AA: ascorbic acid; DPEE: direct plasmon-enhanced electrochemistry; Fc: Ferrocene; HRP: horseradish peroxidase; LAPS: Light addressable potentiometric sensor; LSV: linear sweep voltammetry; MOF: metal organic framework; NEase: nicking endonuclease; PAA: porous anodic alumina; (r)GO: (reduced) graphene oxide; TCEP: Triggered cascade displacement polymerization.

and TLS11a (5'-ACA GCA TCC CCA TGT GAA CAA TCG CAT TGT GAT TGT TAC GGT TTC CGC CTC ATG GAC GTG CTG-3') stand out for their high affinity. They have been used separately [110] or combined [111].

The G-quadruplex forming DNA aptamer (5'-GGT GGT GGT GGT TGT GGT GGT GGT GG-3') known as AS1411 targeting nucleolin protein has been used in electrochemical sensors directed to different cancer cells: breast (MCF-7 and MB231) lung (A549), and cervical (HeLa) [102,112]. This aptamer has advanced up to clinical trial phase II for acute myeloid leukemia treatment but Antisoma, the proprietary company, terminated it due to inconclusive results.

Chemisorption on Au surfaces is the dominant surface chemistry to attach the aptamer to the transducer. To maximize the accessibility of capture aptamers and thus, the target binding capability, DNA nanotetrahedron (NTH) structures are used as efficient bioscaffolds [102,110]. Alternatively, the binding site of the aptamer can be extended away from the surface with an extra 19-nt long fragment for partial hybridization of the aptamer with a surface-tethered complementary probe [98]; this approach favors the reutilization of the aptasensor while circumventing surface steric hindrance. This is also achieved by elongation of the aptamer sequence at the proximal end to carbon surfaces, e.g. with 15 extra thymines [111]. Carbodiimide-mediated attachment of amine-functionalized aptamers to carbon surfaces with carboxylic acid groups is also a simple strategy [111,112].

To increase the number of receptors anchored to the electrode surface, and thus the device sensitivity, as well as speeding up the electron transfer between the redox molecule and the electrode, conducting nanomaterials such as porous graphene oxide [112] or reduced graphene oxide decorated with gold nanoparticles [101] are extremely useful.

Furthermore, capturing CTCs with aptamer-modified MB [99,100] or magnetic nanocarriers [108] and subsequent detection onto an electronic surface can provide superior analytical performances because both steps are carried out under their own optimal conditions. These approaches cannot be considered as genuine aptasensors because the biorecognition event does not take place on the transducer [113].

Regarding the assay format, direct aptaassays involve the molecular recognition of the target cancer cells using the cognate aptamer immobilized onto the sensing interface (Fig. 4). Using impedance as a non-destructive non-passivating detection technique, the signal-on approach to quantify EpCAM<sup>+</sup> tumor cells enabled the efficient recovery of culturable cancer cells by enzymatic cleavage of several uracil bases in the aptamer sequence [98] (Fig. 4A). That way, the cells can be employed in downstream applications and the electrodes are reusable.

Among "signal-off" approaches, the decrease in the oxidation current of ascorbic acid was employed to detect leukemia cells, boosted about 20 times upon localized surface plasmon resonance excitation [105]. This amplification strategy led to a LOD of 5 cells mL<sup>-1</sup> as well as a wide linear response range, although tedious pretreatment of blood samples is required. Another interesting "signal-off" approach involves a light addressable potentiometric sensor (LAPS) based on a Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-Si n type structure modified with porous graphene oxide for increasing the active sensing area [112]. Despite a modest detection limit, it provides results in good agreement with cancer staging. Direct recognition of CTCs was also carried out with the aptamer receptor immobilized onto an array nanochannel-ion channel hybrid by recording the drop-off in the ionic flow through the nanochannels. Although its clinical application remains to be demonstrated, release of viable CTCs was achieved by endonuclease digestion, thus promoting subsequent genomic and proteomic studies [107] (Fig. 4B).

Compared to the previous single-receptor approaches,

sandwich assays usually provide enhanced selectivity due to the participation of a pair of receptors (capture and reporter ones). Likewise, they favor a great variety of amplification strategies, which can be classified into two large groups: (i) those based on the oligonucleotide nature of synthetic receptors and (ii) those based on the unique advantages of nanoparticles (Fig. 5).

Beyond DNA amplification strategies relying on the extension of the reporter aptamer with a proper primer thus triggering isothermal and linear RCA [99,110], nucleic acid nanomachines such as DNA walkers have finally found analytical interest to improve aptaassay sensitivity [106] (Fig. 5A). However, their sophisticated design involving DNA-modifying enzymes along with strand displacement reactions hampers their general applicability in clinical settings by the moment.

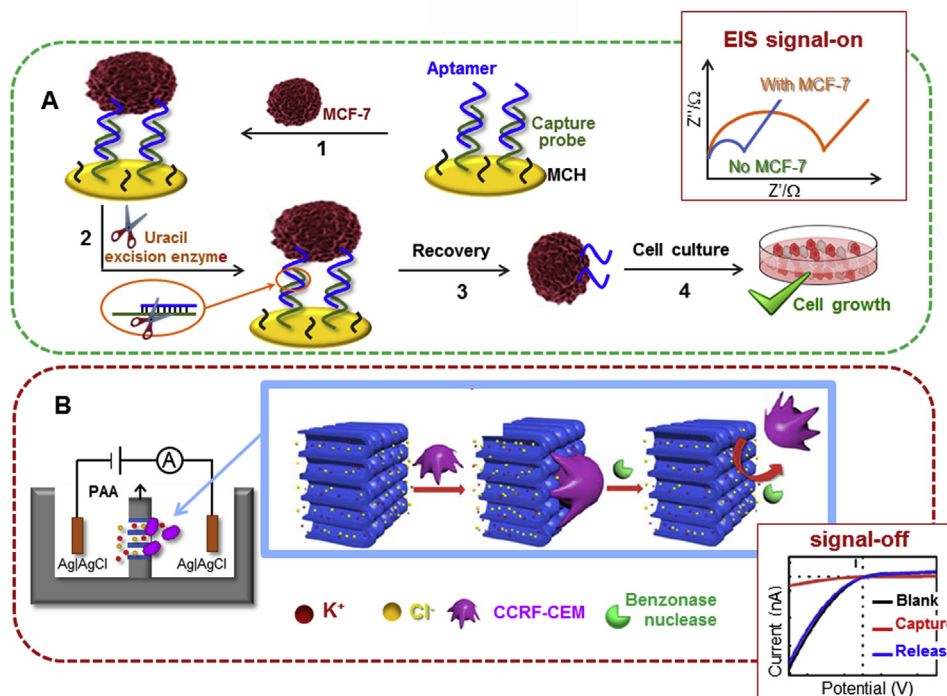
Nanoparticles are versatile tools for signal amplification. As nanocarriers, nanoparticles can load multiple units of electroactive species (ferrocene or thionine) [108] (Fig. 5B), or HRP-mimicking DNAzymes [102] (Fig. 5C) per recognition event that, in combination with sandwich electrochemical aptaassays, gave rise to good analytical performance, although it is true that the presence of natural HRP is still needed. There is also a clear trend to replace natural redox enzymes by catalytic nanomaterials as reporter molecules. In this regard, CuO [101] (Fig. 5D) and Pd@Au nanoparticles [100] exhibit hydrogen peroxide reduction activity. Beyond an improved stability against temperature and pH changes, their peroxidase activity is lower than that of the natural counterpart.

Antifouling strategies such as a previous blocking step with a solution containing healthy blood cells have been reported when interrogating blood samples [111] even though two types of aptamers were used to detect a single type of CTCs.

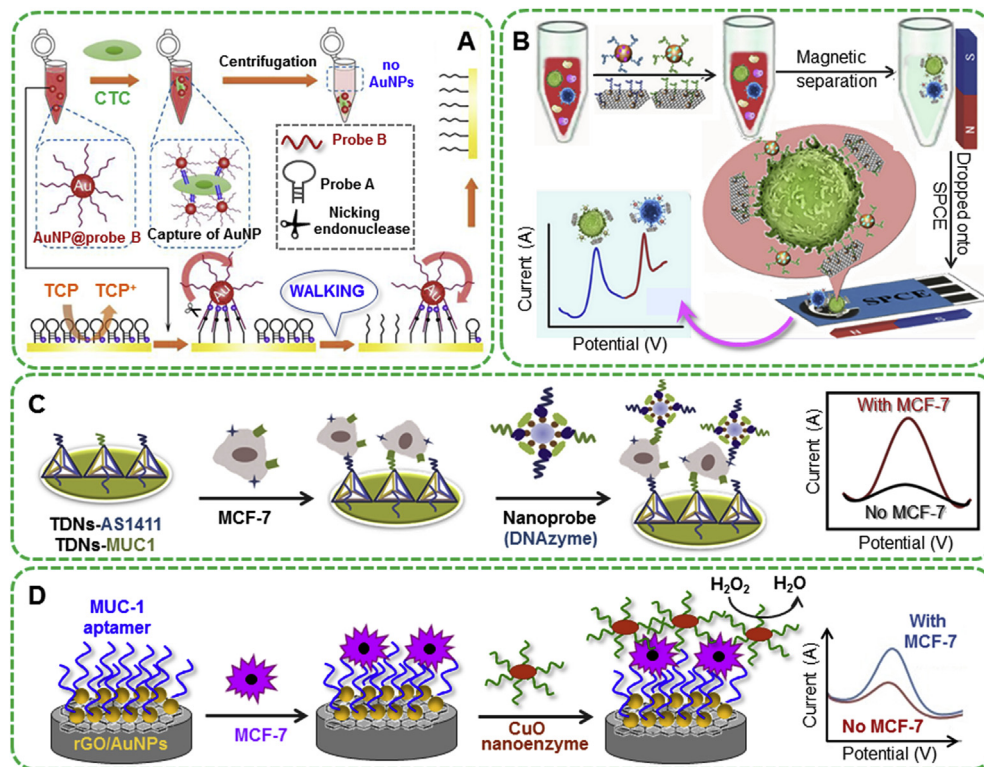
## 5. Electrochemical aptasensors for exosomes

Cancer-derived exosomes constitute another attractive target for potential diagnostics, prognostics and surveillance of the disease. Exosomes are a kind of extracellular vesicles with a size in the range 30–150 nm in diameter, which transmit molecular messengers between cells, thus contributing to the sustained growth, invasion and metastasis of cancer cells [114]. They have their origin in the fusion of internal vesicles with the plasma membrane to be released from parent cells to the extracellular fluid, moving to adjacent areas or tissues. Consequently, they are present in different body fluids including blood, urine, cerebrospinal fluid, saliva or breast milk, where they carry diverse molecules that are characteristic of the parent cell. Although exosomes have been discovered in the 80s, a recent flurry of work has shown that they hold great potential in cancer liquid biopsy [115].

This new class of circulating cancer biomarkers is more abundant than CTCs, and is relatively stable. The exosomal cargos, such as oncoproteins, RNA and DNA fragments, provide information about the primary tumor and its environment in a minimally invasive way. In addition, as cancer cells secrete more exosomes than their non-malignant counterparts, the selective counting of cancer-specific exosomes offers valuable information for diagnosis. Despite the potential advantages of using exosomes as biomarkers listed above, their nanometric size poses important technical challenges for clinical translation. The majority of existing technologies for exosome detection and quantification require a previous isolation and enrichment step, which is typically accomplished by ultracentrifugation, ultrafiltration, polymer precipitation or immunoaffinity purification [116]. Nanoparticle tracking analysis (NTA) is the most popular technique for obtaining information about the size and concentration of exosomes after their isolation [117]. This is a light-scattering technique, only based



**Fig. 4.** Direct aptaassays for CTCs detection. (A) "Signal-on" impedimetric cytosensor with subsequent enzyme-based cell recovery. Adapted with permission from Ref. [98]. (B) "Signal-off" cytoassays based on a nanochannel-ion channel hybrid. Adapted with permission from Ref. [107].



**Fig. 5.** Sandwich aptaassays for CTCs detection. (A) Cytosensor based on a DNA walking strategy using AuNPs. Reprinted with permission from Ref. [106]. (B) Dual cytoassay based on nanostructures for capture and signal amplification. Reprinted with permission from Ref. [108]. (C) Voltammetric cytosensor based on nanoprobe carrying HRP-mimicking DNAzymes. Adapted with permission from Ref. [102]. (D) Voltammetric cytosensor based on CuO nanoparticles serving as nanoenzymes. Reprinted with permission from Ref. [101].

on a physical property of exosomes, and in consequence it cannot support differentiation of phenotypes and subpopulations of the extracellular vesicles.

To improve the selectivity of detection, it is necessary to select exosome-specific surface markers which would direct the selective capture and detection. Among the components of membrane

exosomes there are clusters of tetraspanins, a family of membrane proteins also referred as the transmembrane 4 superfamily proteins, which include CD9, CD63 or CD81, together with adhesion molecules such as integrins or the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) [114]. These surface proteins are typically caught by specific antibodies to selectively capture and detect the exosomes.

Although the use of aptamers for the integration of capture and recognition of the extracellular vesicles is less than 5 year-old, examples of electrochemical aptamer-based-sensors and assays for exosomes are compelling and growing.

The most widely employed aptamer so far for the design of electrochemical aptamer-based assays for exosomes is an aptamer against CD63 [118–125], a member of tetraspanin family and a type III lysosomal membrane protein that is a classic marker for exosomes. This is a 32-nt aptamer developed by Base Pair Biotechnologies [126], with the sequence: 5'-CAC CCC ACC TCG CTC CCG TGA CAC TAA TGC TA-3'. A truncated version of this aptamer, with just 10 nt from the 5'-terminus, has proven effective for CD63 recognition [124]. As CD63 is presented in different types of exosomes, the corresponding aptamer has been employed for the capture or detection of exosomes secreted by different cancer cells such as breast (MCF-7) [118–122] and liver (HepG2) [123–125] cell lines. No information is available about the target used in the selection process or the affinity of it. Another ubiquitously expressed cancer-biomarker is EpCAM, whose 48-bases long aptamer mentioned above is also suitable for binding to exosomes released by, for example, breast [118,119] or prostate [127] cancer cells. The MUC1 aptamer 5'-TAC TGC ATG CAC ACC ACT TCA ACT A-3', selected in buffer against a recombinant form different from the protein employed for selecting the aptamer used in serum and CTCs [80], has served for the selective detection of exosomes from gastric cancer cells in combination with antibodies anti-CD63 for capturing [128].

It is possible to improve the selectivity of the detection by selecting as a target a cancer-specific marker on the surface of exosomes. This is the case of prostate specific membrane antigen (PSMA), which is an exopeptidase overexpressed on the apical plasma membrane of prostate cancer cells. The DNA aptamer with the sequence: 5'-GCG TTT TCG CTT TTG CGT TTT GGG TCA TCT GCT TAC GAT AGC AAT GCT-3' has been explored for the direct detection of exosomes associated to prostate cancer [127] or indirectly by measuring the release of an auxiliary cDNA that hybridized on the electrode [129].

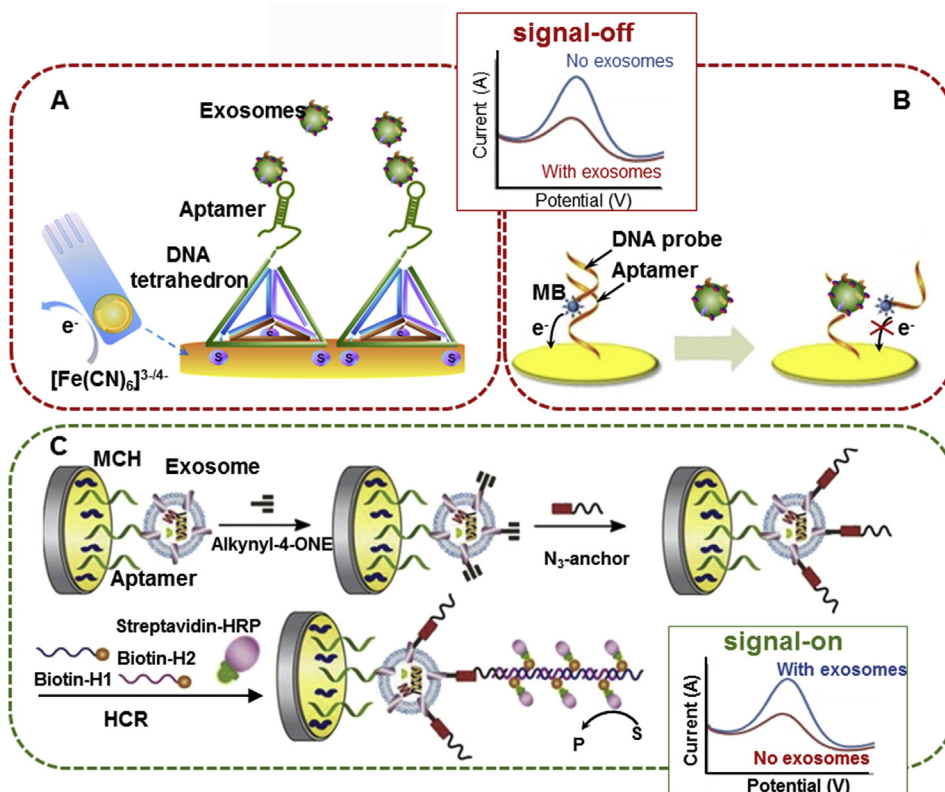
To preclude binding to normal cell features, Cell-SELEX is a useful source of aptamers for exosomes. This was the approach followed to select an aptamer against tumor liver cells, LZH8: 5'-ATC CAG AGT GAC GCA GCA TAT TAG TAC GGC TTA ACC CPC ATG GTG GAC ACG GTG GCT TAG T-3'. In addition, two artificial nucleotides Z and P were introduced in the initial library in order to improve the probability of selecting the best binder. The nucleobases form three hydrogen bonds and do not disturb the Watson-Crick double helix so they are compatible with polymerases [130]. Considering the homology between the membrane proteins of cells and secreted exosomes, this aptamer also exhibits selectivity for exosomes secreted by hepatocarcinoma cells (HepG2), discriminating them from those released by noncancerous liver cells (Hu1545), and in consequence it is an efficient receptor for the quantification of exosomes [131].

The development of aptamer-based electrochemical sensors requires attaching the aptamer to the transducer, and then measure of an electrical property directly or indirectly related to changes occurring when the exosomes are captured. To date, exosome aptasensors have been mainly fabricated by using gold surfaces, where aptamers are chemisorbed through thiol groups [121,125,127,131] or using NH<sub>2</sub>-modified aptamers covalently

linked to surfaces bearing carboxyl groups [118,122]. The complex composition of human fluids and the low abundance of exosomes in these samples, make the direct integration of selective recognition and detection not an easy task. A way to overcome this problem is to apply modified MBs for exosome separation and enrichment, coupled to the downstream detection of the binding event. These have been accomplished by immobilizing onto MBs not only aptamers (CD63-aptamer [119] or PSMA aptamer [129]) but also specific antibodies, for example antibodies recognizing CD63 protein [123] or other proteins specifically binding molecules on the surface of exosomes such as phosphatidylserine binding-protein (Tim4) [124]. While these detection schemes cannot be strictly considered aptasensors, it is possible to integrate both steps in a microfluidic platform to analyze in a rapid and simple way exosomes in clinical specimens for cancer diagnosis [124].

Electrochemical assays for exosome detection also fall into two classes i.e. direct and sandwich assays. The first relies on the capture of exosomes by a single immobilized specific aptamer. The simplest “signal-off” approach uses the electron-transfer suppression of a soluble ferro/ferricyanide probe [131] (Fig. 6A). In this device, an oriented immobilization of the aptamer on Au and smart spacing, through a tetrahedral DNA nanostructure, improves the accessibility of exosomes to the recognition element and in consequence the sensitivity of the assay, reporting a LOD 100-fold lower than the obtained with a classical SAM for the immobilization of the aptamer. Despite the impressive sensitivity without any amplification strategy, the sensor was not challenged in real samples, where probably the complexity of the matrix would lead to unspecific adsorption and signal suppression (false positive). Displacement assays involve the immobilization of the aptamer in the form of a duplex, hybridized with one or more antisense DNA strands (Fig. 6B) [125,129]. The recognition of exosomes causes the release of the complementary strands that are detected. It is very important to design the hybridizing strands to be complementary to the aptamer in the region that is directly involved in the recognition of the target. When the displaced strand is labelled with an electroactive molecule, for example methylene blue, the recognition event produces a decrease in the voltammetric signal of the marker, which is related to the exosome concentration (secreted by liver cancer cells in the example) [125]. Another strand displacement approach for the detection of exosomes from prostate cancer cells needed three cDNA strands, so the design is even more challenging [129]. The recognition event takes place on the surface of MBs whereas the released DNA is detected by an exonuclease III-assisted target recycling scheme on a separate gold electrode. A decrease in the voltammetric signal ascribed to the soluble redox reporter, Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup>, leads to a LOD surprisingly higher than the simplest design above mentioned [131], despite the double-amplification process. The direct recognition of exosomes can also be transformed into a DNA detection assay by derivatizing the exosomes, once entrapped on the sensing layer, with a ssDNA sequence by a click chemistry process, for example, where azide-labelled oligonucleotides are linked to alkylnyl-4-one-modified exosomes [121]. The ssDNA is then detected by HCR, using a biotin-hairpin as a probe (Fig. 6C). The final detection of the elongated DNA products is achieved by electrochemically measuring the peroxidase activity of the streptavidin-peroxidase conjugate used as a reporter. This is a very complicated scheme, which demands a long derivatization process after exosome capturing, and although it has proven useful for discriminating one breast cancer patient from one healthy individual, the design suffers from a relatively poor LOD when compared with simpler assays.

The strategies described above make use of a heterogeneous reaction between immobilized aptamers and exosomes, but the recognition reaction may also take place in solution (homogeneous



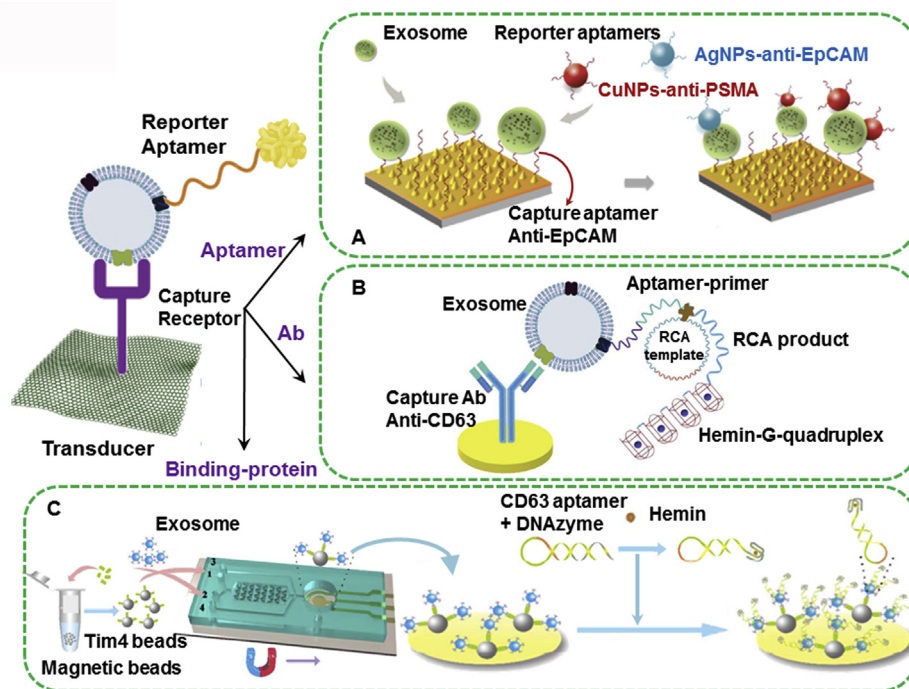
**Fig. 6.** Aptasensor designs to detect exosomes. (A) Direct and "signal-off" aptasensor where the aptamer is immobilized through a DNA-nanotetrahedron. Reprinted with permission from Ref. [131]. (B) Displacement design: the recognition of exosomes by the aptamer displaces the hybridized reporter probe, with the subsequent decrease in the signal of the label, methylene blue (MB). Reprinted with permission from Ref. [125]. (C) Immobilized aptamers directly entrap exosomes, which are linked to a reporter probe by a click chemistry process. This probe is amplified in a hybridization chain reaction (HCR) using two biotin-hairpins (biotin-H1 and biotin-H2). The subsequent binding of streptavidin-HRP reports the recognition, after the addition of the substrate of peroxidase, in a "signal-on" response. Reprinted with permission from Ref. [121]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

assay). The capture aptamer is hybridized with an oligonucleotide, which is released upon exosome binding. These strands are detected on an ITO electrode, using doxorubicin as an electroactive probe, by an exonuclease III-assisted recycling assay [120]. The design has the advantage of improving the binding efficiency of the exosomes, thus leading to improved detectability, although it has been only tested in spiked serum samples.

Selectivity of the above designs is based exclusively on the selectivity of a single aptamer used as a recognition element. To overcome this problem, sandwich-type assays using a pair of aptamers as a capture and reporting receptor [118,119,122,127] or alternatively, an antibody [123,128] or a surface lipid binding-protein [124] as a capture element in combination with a reporting aptamer, have been developed (Fig. 7). Different signal generation and amplification strategies have been employed in these assays, such as electrooxidation of metal nanoparticles linked to the reporting aptamer [127] (Fig. 7A), catalytic effect of  $\text{Ti}_3\text{C}_2$  MXenes nanosheets over electrochemiluminescence of luminol [118], peroxidase activity of the complex between hemin and a DNAzyme that elongates the aptamer [122,124] (Fig. 7C) and different nucleic acid-based amplification strategies such as exonuclease III-assisted recycling [119], cascade toehold-mediated strand displacement [123], and RCA [128] (Fig. 7B). Table 3 summarizes the analytical performance of the published electrochemical aptamer-based assays for exosome detection. All analytical features were obtained in buffer, typically PBS, due to the need for isolation prior to detection. Integrated collection and detection has not been reported using aptamers as a capture element. An antibody-based electrochemical

device has been designed to entrap salivary exosomes and disrupted them by an electrical field to release their cargo [132]. The nucleic acid content is then detected through hybridization with appropriate complementary probes anchored on a different electrode surface present in the chip. It is reasonable to envision similar approaches with aptamers instead of antibodies in the future.

Despite the inherent complexity associated with the use of nucleic acid amplification strategies for signal generation, these designs do not provide much better sensitivity. Up to date, the lowest LOD ( $9.5 \times 10^2$  particles  $\text{mL}^{-1}$ ) is achieved in combination with RCA, using an aptamer against MUC1 elongated with a primer sequence that is complementary to a circular padlock containing a G-quadruplex unit [128]. After recognition, RCA incorporates multiple G-quadruplex units that in the presence of hemin show peroxidase-like activity, leading to a large amplification of the voltammetric signal. However, the achieved LOD is very close to that obtained with copper and silver nanoparticles as labels: 50 particles per sensor, which corresponds to  $2 \times 10^3$  particles  $\text{mL}^{-1}$  for a volume of sample of 25  $\mu\text{L}$  [127]. Both designs supported the detection of exosomes in serum samples, and proved to be efficient in the discrimination of healthy individuals from prostate cancer patients ( $n = 10$ ) [127] or gastric cancer patients ( $n = 16$ ) [128]. Other designs also tested in the analysis of serum samples from cancer patients, although in a fairly limited number, are linked to the use of a DNAzyme sequence as a label, and were evaluated in the diagnosis of breast cancer (8 patients) [122], and hepatic carcinoma (10 patients) [124].



**Fig. 7.** Signal generation and amplifications strategies in sandwich aptasensors to detect exosomes. (A) Dual sensor based on the electrooxidation of metal nanoparticles linked to the reporter aptamers. Reprinted with permission from Ref. [127]. (B) The aptamer is linked with a primer for RCA. After the RCA elongation, a G-quadruplex is formed, which in the presence of hemin is responsible for the voltammetric signal. Reprinted with permission from Ref. [128]. (C) The interaction between exosomes and the capture receptor (the binding protein Tim 4), immobilized onto magnetic beads, takes place in a microchamber of a microfluidic chip. The beads are magnetically driven to an ITO electrode, where the aptamer elongated with a DNAzyme sequence binds, generating the electrochemical signal in the presence of hemin. Reprinted with permission from Ref. [124].

**Table 3**

Summary of analytical characteristics of published electrochemical aptamer-based assays for exosome detection.

Receptor	Sensing platform/Assay format	Detection method	Linear Range/LOD (part. mL <sup>-1</sup> )	Sample (number)	Ref.
Cap: EpCAM apt Sign: CD63 apt	AuNPs/GCE Sandwich	ECL of luminol catalyzed by Ti <sub>3</sub> C <sub>2</sub> MXenes	5 × 10 <sup>5</sup> –5 × 10 <sup>9</sup> 1.25 × 10 <sup>4</sup>	MCF-7 Spiked serum	[118]
Cap: CD63 apt Sign: EpCAM apt	MB (cap) + Au electrode (detection) Sandwich	DNAzyme-exonuclease activity- DNA release DPV of methylene blue and Fc (ratiometric)	5 × 10 <sup>4</sup> –1 × 10 <sup>10</sup> 1.2 × 10 <sup>4</sup>	MCF-7 Serum from breast cancer patients (3)	[119]
CD63 apt	Homogeneous, Direct ITO electrode	DNA release- ExoIII assisted recycling DPV Doxorubicin	3.4 × 10 <sup>4</sup> –3.4 × 10 <sup>8</sup> 1.2 × 10 <sup>4</sup>	MCF-7 Spiked serum	[120]
CD63 apt	Au-rGO-GCE Direct- labelled exosomes	DNA linked to exosomes Hybridization chain reaction Streptavidin-HRP- DPV DNAzyme/hemin ECL	1.2 × 10 <sup>5</sup> –1.2 × 10 <sup>11</sup> 9.6 × 10 <sup>4</sup> 3.4 × 10 <sup>5</sup>	MCF-7 Serum from breast cancer patients (1) MCF-7	[121]
Cap: CD63 apt Sign: CD63 apt- DNAzyme	GCE-Cds:Eu nanocrystals Sandwich (Signal-off)	DNAzyme/hemin ECL	–1.7 × 10 <sup>8</sup> 7.4 × 10 <sup>4</sup>	Serum from breast cancer patients (8)	[122]
Cap: CD63 Ab Sign: CD63 apt	MBs (capture) + AuE (detection) Sandwich	Cascade toehold mediated strand displacement- MB duplex, SWV	1 × 10 <sup>5</sup> –5 × 10 <sup>7</sup> 1.7 × 10 <sup>4</sup>	HepG2 Spiked serum	[123]
Cap: Tim4 Sign: CD63 apt	MBs (capture) + ITO (detection) Sandwich	DNAzyme-aptamer Hemin for peroxidase activity DPV of thionine	7.6 × 10 <sup>4</sup> –7.6 × 10 <sup>8</sup> 4.4 × 10 <sup>3</sup>	HepG2 Serum from liver cancer patients (10)	[124]
CD63 apt	AuE Direct- displacement of methylene blue-DNA (signal-off)	DPV of methylene blue	1 × 10 <sup>6</sup> –1 × 10 <sup>8</sup> 1 × 10 <sup>6</sup>	HepG2 Spiked serum	[125]
Cap: EpCAM apt Sign1: EpCAM apt Sign2: PSMA apt	Nanostructured AuE Sandwich	CuNP and AgNP electrooxidation- LSV	Not provided 2 × 10 <sup>3</sup>	Vcap Serum from prostate cancer patients (10)	[127]
Cap: CD63 Ab Sign: MUC1 apt	AuE/ Sandwich	RCA - hemin/DNAzyme reporter DPV	4.8 × 10 <sup>3</sup> –4.8 × 10 <sup>6</sup> 9.5 × 10 <sup>2</sup>	SGC7901 Serum from gastric cancer patients (16)	[128]
PSMA apt	MBs (capture) Direct, displacement DNA ( × 3)- AuE (signal off)	Exo III-assisted target recycling. DPV Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> <sup>3+</sup> reporter	1 × 10 <sup>3</sup> –1.2 × 10 <sup>5</sup> 7 × 10 <sup>4</sup>	LNCaP Spiked serum	[129]
LZH8 apt	AuE/Direct (signal off)	SWV Ferro/ferricyanide	1 × 10 <sup>5</sup> –1 × 10 <sup>12</sup> 2.1 × 10 <sup>4</sup>	HepG2	[131]

Tim4: Phosphatidylserine binding-protein.

## 6. The long path from lab bench to the clinical market

The previous sections evidence the significant advancements that researchers have made in the development of electrochemical aptasensors for cancer diagnosis. However, these devices have not yet fulfilled their potential to be translated to the clinical market, so that they can directly benefit patients. Challenges to take this great leap forward include: a) to identify more specific tumor targets and b) to rational design the SELEX protocols to obtain robust well-characterized aptamers for clinically significant biomarkers, c) to evaluate the clinical validity and utility of the new aptasensors, rather than simply their analytical performance, and d) to develop simple and integrated platforms useful in POC systems.

### 6.1. More specific tumor targets for the selection of aptamers

Cancer management requires collecting information about the disease stage and evolution. These data cannot be gathered from repeated biopsies. The search for specific biomarkers in the body fluids is emerging as a powerful tool, but their use as clinical markers needs for selective receptors with an extraordinary ability to discriminate minute changes within a defined target. Cancer is associated with a variety of aberrant features whose detection might be more clinically significant. The AFP-L3 test based on the ratio between the core-fucosylated protein and the whole protein is a successful example [133]. Specific lectins are used to detect the aberrant fucosylation ratio. Aptamers can replace them to recognize these or other subtle differences because they can reach superior affinity. A first example to demonstrate the high clinical selectivity that aptasensors might achieve in this direction is the discrepancies in PSA values obtained with the aptasandwich assay recognizing both the protein and the glycan moieties of PSA, and the reference method, just focused in the protein [61]. Nonetheless, this task will require exquisite accuracy because it is based on percentage changes for the aberrant form of the protein with respect to its total amount.

Future research should focus on novel biomarkers with enhanced sensitivity/selectivity rather than on well-known biomarkers. Test currently in use will not be replaced unless a substantial benefit from a clinical or economical point of view is apparent [134]. With this aim, close collaboration between experts in the biomedical and analytical fields is highly important. Interestingly, the use of affinity reagents different from the widely accepted antibodies has not demonstrated superior clinical specificity and sensitivity of the detection of the approved biomarkers. Protein-binding aptamers behave similar to antibodies in terms of affinity and selectivity, though the selection process of the latter can be tuned to boost both features. When the aptamer selection is targeting proteins on cell surface, the SELEX protocol should include several counter selections steps with numerous types of cells. Those essential steps to avoid cross-reactivity in the real application are rarely exploited. As a consequence, promiscuous aptamers binding several types of tumor cells through shared surface features are sometimes obtained [135]. Nonetheless, aptamers show benefits in reagent stability and in lowering the LOD through amplification schemes not amenable to antibodies. Extreme detectability might seem useless once the normal physiological level is reached, but it can lead to redefinition of the disease and clinical management [134].

Combination of several already described and novel biomarkers can unblock the unmet goal of early diagnosis of cancer and avoid confusion with biomarkers whose level also elevates with aging without implying enhanced cancer risk. This goal may be facilitated by the design of multiplexed aptasensors.

### 6.2. More aptamers in which we can trust

Another important question is the wide diversity in composition and properties of biological fluids, which should be considered in the design of the SELEX process. The proper aptamer recognition event is strongly dependent on the whole system: the aptamer sequence, the chemical nature of the target and the composition of the interrogating medium [34]. The best performance would require matching the selection conditions with the application to keep both the aptamer and target in their optimum chemical and structural conformations. The detailed inspection of aptamers used in clinical samples for cancer diagnostics reveals that the milieu in which they were derived is not as decisive as it is commonly accepted. When targeting free proteins, phosphate buffer saline sometimes supplemented with ions reasonably emulates the body fluids so that the aptamers can easily recognize their target in clinical samples. Good agreement with validated methods using different detection techniques further support this finding, though more extensive studies are needed before entering the commercial pipeline. It is worth noting that some of the aptamers mentioned above are among the oldest developed and they have been tested repeatedly in several labs using a variety of transduction techniques beyond electrochemistry. An exhaustive characterization of aptamers is central to secure adequate performance and diminish the risk of failure. Traceability of the aptamer back to the original selection is also important to trust in the good performance.

When the intended final use is to isolate/quantify CTCs or exosomes the selection of aptamers in crude media is more often to preserve the native target state with its inherent (aberrant) variants although the targets remain unidentified. This might facilitate the detection of rare subtypes of tumor cells that skip current identification. There is a clear need of expanding the collection of available aptamers against cancer-specific biomarkers on the surface of CTCs, for reliable discrimination between them and healthy blood cells. Furthermore, the use of multiple aptamers as ligands of several biomarkers would promote the efficient capture of CTC subpopulations. The design of multivalent capture devices is also a convenient option. AuNPs decorated with multiple units of the *sgc8* aptamer [136] or long DNA “tentacles” comprising repeated aptamer sequences generated by RCA [137] have already demonstrated their high cell capture efficiency in comparison with single units.

### 6.3. Evaluation of the clinical validity and utility

When a laboratory assay faces an *in-vitro* medical test in specific clinical contexts, the excellence in analytical performance is taken for granted but clinical validity and utility must be demonstrated. Clinical validity (or performance) is the ability of the method to correctly classify patients with or without the disease or in a particular stage of it, while the clinical utility (or effectiveness) covers the health outcomes improvements. This includes patients' benefits and harms, as well as process outcomes, such as speeding up the time to diagnosis [134].

Within the economic evaluation, the cost per assay has an impact. Paper-based aptasensors claim a cost per assay below \$1 [67], but broader impacts are also considered. For example, for POC devices, implementation of biosensors can dramatically change the health organization system from large facilities to local units, which might be decisive to adopt the technology.

Integrated portable devices with wireless transmission of information to smartphones or cloud servers are useful to monitor the biomarker concentration trends and open the possibility to remote control by medical staff. Though a continuous monitoring of cancer biomarkers is not usually needed, this proposal can find applicability in order to reduce the inconvenience of attending

doctor's office frequently. Recently, this type of device was reported for a cancer biomarker measured in saliva [54]. Companies like ApolloDx are developing electrochemical aptamer-based portable devices promising to detect cancer biomarkers though, up to date, they are only validated against infectious diseases [138].

#### 6.4. Development of simple and integrated platforms for POC systems

In POC simplicity is a must. Highly sensitive multistep protocols with amplification schemes, as those described, must demonstrate their reliability to be handled by untrained staff. One desirable feature of POC is the direct measurement in unpretreated samples: for example, whole blood drops in glucometers. None of the methods reported so far fulfill this need in blood. Most of them are applied to serum, meaning that pretreatment is needed. Even crude plasma samples required centrifugation and incubation steps [42]. Free protein detection in undiluted samples has been accomplished in a few methods [59,62,67,73], while the rest requires from twice to ten-fold dilution, sometimes 100-fold or higher to reach the working range or eliminate matrix effects from unspecific adsorption.

CTCs and exosomes detection require specific isolation making this step crucial for their accurate measurement. Integrated platforms based on microfluidics to isolate and detect these targets are emerging. Aptamer-based devices such as Nano Velcro have the ability to easily release the cells for downstream genetic and molecular profiling with a cost for CTC enumeration about \$50, in contrast to \$1200 estimated with CellSearch® [139]. Heterogeneity of exosomes makes isolation a current challenge that would benefit from microfluidics and the future availability of sets of aptamers to confront the cancer evolution under different physiological stages of the disease.

If patent activity serves to forecast the position of a technology in the marketplace, the potential of aptamer field is strong. A general search on Patentscope [140], using aptamer as input, retrieves thousands of files. Beyond the initial patents on SELEX protocol and its variants, the main interest in filing a patent on aptamers is their therapeutic use. Nonetheless, diagnostic methods are also patented. Patent searching is a daunting task because of the plurality of names under which “aptamer” is hidden. Besides, the claims are extremely broad in order to encompass all variations of the method patented, which might include different kinds of capture elements [141–143] or a wide variety of targets [144] in the same patent file. Occasionally, the aptamer-based methods to detect cancer biomarkers do not include a specific transduction technique but any diagnostic kit that uses the specific sequence claimed [145]. Among the electrochemical techniques, impedance [146] or amperometry [147] stands out. ApolloDx have patented an electrochemical device based on the latter for wide diagnostic testing [147]. Interestingly, at least two patents claim devices to detect cancer biomarkers in saliva [142,148]. The above mentioned patents focused on protein targets. Recent patents claim the use of aptamers to capture extracellular vesicles from tissues [149] or all body fluids, provided that the individual is suspected to have any type of cancer [150]. Similarly, a microfluidic chip is claimed to capture CTCs by means of aptamers for cancer-screening purposes. The same patent proposes the eradication of malignant cells by injecting a photosensitizer-aptamer conjugate into the bloodstream and application of a laser beam that destroys them [151]. Roche Diagnostics GmbH has recently filed a patent for a device to capture and analyze CTCs. Besides antibodies, one of the embodiments comprises the use of aptamers [152].

## 7. Concluding remarks

There is no doubt that the electrochemical aptasensor field has increased enormously and is now tackling the difficulties of shifting to the market. When using rigorously characterized aptamers, their properties along with continuously improved selection strategies indicate that there is no reason to expect delays in commercialization due to technical issues of the receptor. Nonetheless, fighting the successful and long history of antibodies, which are much more numerous than aptamers, is hard. Likewise, the ignorance of the aptamers and their capabilities among investors and clinicians cannot be set aside as an influencing factor that blocks the commercialization. We would like to emphasize that the aim is not to substitute or withdraw antibodies. On the contrary, the ultimate goal is to use aptamers in those applications where they outperform other affinity reagents and take advantages of their unique characteristics, such as animal-free selection. We believe that potential successful niches for aptamers might be targets that are inherently difficult targets for antibodies: low immunogenic compounds such as glycans, buried regions hard to access for large molecules or specific sites on molecules, e.g. aberrant modifications.

Electrochemical transduction should make easy the translation from the lab prototype to the marketable device. Antifouling strategies to protect against unspecific signals are extensively studied on a variety of electrode surfaces, but enhanced stability of the sensing layer is a weak point that needs to be addressed. As other biosensors relying on antibodies or other transduction techniques, the ultimate bottleneck in the commercial pipeline is providing evidences of clinical utility, in terms of both cost-effectiveness and patient and health system outcomes to convince stakeholders to invest in this young technology.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Government (project RTI-2018-095756-B-I00) and Principado de Asturias Government (IDI2018-000217), co-financed by FEDER funds. A.D.F. thanks the Asociación Española Contra el Cáncer for a Ph.D. fellowship and R.L.G. thanks the Spanish Government for a predoctoral FPU grant (FPU16/05670).

### References

- [1] S. Gilgunn, P.J. Conroy, R. Saldova, P.M. Rudd, R.J. O'Kennedy, Aberrant PSA glycosylation—a sweet predictor of prostate cancer, *Nat. Rev. Urol.* 10 (2013) 99–107.
- [2] C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment - RNA ligands to bacteriophage-T4 DNA-polymerase, *Science* 249 (1990) 505–510.
- [3] A.D. Ellington, J.W. Szostak, Invitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature* 346 (1990) 818–822.
- [4] H. Kaur, J.G. Bruno, A. Kumar, T.K. Sharma, Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines, *Theranostics* 8 (2018) 4016–4032.
- [5] D. Xiang, et al., Superior performance of aptamer in tumor penetration over antibody: implication of aptamer-based theranostics in solid tumors, *Theranostics* 5 (2015) 1083–1097.
- [6] E.V. Suprun, Protein post-translational modifications – a challenge for bio-electrochemistry, *Trac. Trends Anal. Chem.* 116 (2019) 44–60.
- [7] A.A. Sina, et al., Epigenetically reprogrammed methylation landscape drives the DNA self-assembly and serves as a universal cancer biomarker, *Nat. Commun.* 9 (2018) 4915.
- [8] R. Aebersold, et al., How many human proteoforms are there? *Nat. Chem. Biol.* 14 (2018) 206–214.
- [9] M. Baker, Reproducibility crisis: blame it on the antibodies, *Nature* 521



- (2015) 274–276.
- [10] R. O'Kennedy, S. Fitzgerald, C. Murphy, Don't blame it all on antibodies – the need for exhaustive characterisation, appropriate handling, and addressing the issues that affect specificity, *Trac. Trends Anal. Chem.* 89 (2017) 53–59.
- [11] M. Uhlen, et al., A proposal for validation of antibodies, *Nat. Methods* 13 (2016) 823–827.
- [12] <https://proteomics.cancer.gov/antibody-portal>. (Accessed 26 December 2019).
- [13] T.K. Sharma, J.G. Bruno, A. Dhiman, ABCs of DNA aptamer and related assay development, *Biotechnol. Adv.* 35 (2017) 275–301.
- [14] T. Wang, C. Chen, L.M. Larcher, R.A. Barrero, R.N. Veedu, Three decades of nucleic acid aptamer technologies: lessons learned, progress and opportunities on aptamer development, *Biotechnol. Adv.* 37 (2019) 28–50.
- [15] C. Zong, J. Liu, The arsenic-binding aptamer cannot bind arsenic: critical evaluation of aptamer selection and binding, *Anal. Chem.* 91 (2019) 10887–10893.
- [16] I. Alvarez-Martos, E.E. Ferapontova, A DNA sequence obtained by replacement of the dopamine RNA aptamer bases is not an aptamer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 489 (2017) 381–385.
- [17] R. Lorenzo-Gómez, N. Fernández-Alonso, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, Unravelling the lipocalin 2 interaction with aptamers: may rolling circle amplification improve their functional affinity? *Talanta* 197 (2019) 406–412.
- [18] K. Ikebukuro, C. Kiyohara, K. Sode, Electrochemical detection of protein using a double aptamer sandwich, *Anal. Lett.* 37 (2004) 2901–2909.
- [19] H. Sun, W. Tan, Y. Zu, Aptamers: versatile molecular recognition probes for cancer detection, *Analyst* 141 (2016) 403–415.
- [20] H. Safarpour, S. Dehghani, R. Nosrati, N. Zebardast, M. Alibolandi, A. Mokhtarzadeh, M. Ramezani, Optical and electrochemical-based nano-aptasensing approaches for the detection of circulating tumor cells (CTCs), *Biosens. Bioelectron.* 148 (2020) 111833.
- [21] W. Zhou, P.-J. Jimmy Huang, J. Ding, J. Liu, Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics, *Analyst* 139 (2014) 2627–2640.
- [22] M. Jarczewska, L. Górski, E. Malinowska, Electrochemical aptamer-based biosensors as potential tools for clinical diagnostics, *Anal. Methods* 8 (2016) 3861–3877.
- [23] M. Hasanzadeh, N. Shadjou, M. de la Guardia, Aptamer-based assay of biomolecules: recent advances in electro-analytical approach, *Trac. Trends Anal. Chem.* 89 (2017) 119–132.
- [24] D. Sadighbayan, K. Sadighbayan, M.R. Tohid-kia, A.Y. Khosroushahi, M. Hasanzadeh, Development of electrochemical biosensors for tumor marker determination towards cancer diagnosis: recent progress, *Trac. Trends Anal. Chem.* 118 (2019) 73–88.
- [25] S.N. Topkaya, M. Azimzadeh, M. Ozsoz, Electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection: recent advances and challenges, *Electroanalysis* 28 (2016) 1402–1419.
- [26] S. Dehghani, et al., Aptamer-based biosensors and nanosensors for the detection of vascular endothelial growth factor (VEGF): a review, *Biosens. Bioelectron.* 110 (2018) 23–37.
- [27] M. Yousefi, et al., Aptasensors as a new sensing technology developed for the detection of MUC1 mucin: a review, *Biosens. Bioelectron.* 130 (2019) 1–19.
- [28] P. Jolly, N. Formisano, P. Estrela, DNA aptamer-based detection of prostate cancer, *Chem. Pap.* 69 (2015) 77–89.
- [29] D. Sun, J. Lu, L. Zhang, Z. Chen, Aptamer-based electrochemical cytosensors for tumor cell detection in cancer diagnosis: a review, *Anal. Chim. Acta* 1082 (2019) 1–17.
- [30] R. Eivazzadeh-Keihan, P. Pashazadeh-Panahi, B. Baradaran, A. Maleki, M. Hejazi, A. Mokhtarzadeh, M. de la Guardia, Recent advances on nano-material based electrochemical and optical aptasensors for detection of cancer biomarkers, *Trac. Trends Anal. Chem.* 100 (2018) 103–115.
- [31] Y. Yang, X. Yang, Y. Yang, Q. Yuan, Aptamer-functionalized carbon nanomaterials electrochemical sensors for detecting cancer relevant biomolecules, *Carbon* 129 (2018) 380–395.
- [32] E.M. Hassan, M.C. DeRosa, Recent advances in cancer early detection and diagnosis: role of nucleic acid based aptasensors, *Trac. Trends Anal. Chem.* 124 (2020) 115806.
- [33] R. Miranda-Castro, I. Palchetti, N. de-los-Santos-Álvarez, The translational potential of electrochemical DNA-based liquid biopsy, *Front. Chem.* 8 (2020), 143.
- [34] E.J. Cho, J.W. Lee, A.D. Ellington, Applications of aptamers as sensors, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2 (2009) 241–264.
- [35] Z. Tang, et al., Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4900–4907.
- [36] S. Goto, K. Tsukakoshi, K. Ikebukuro, Development of aptamers against uniprifurcated proteins, *Biotechnol. Bioeng.* 114 (2017) 2706–2716.
- [37] Y. Zheng, et al., DNA aptamers from whole-serum SELEX as new diagnostic agents against gastric cancer, *RSC Adv.* 9 (2019) 950–957.
- [38] K. Li, L. Qi, L. Gao, M. Shi, J. Li, Z. Liu, L. Zhao, Selection and preliminary application of a single stranded DNA aptamer targeting colorectal cancer serum, *RSC Adv.* 9 (2019) 38867–38876.
- [39] T. Wang, W.-X. Chen, G.-F. Xu, B. Zhang, S.-Q. Wei, J. Hu, K.-H. Zhang, A universal strategy designed for selecting bench-to-bedside aptamers to serum and validated in hepatocellular carcinoma diagnosis, *Microchem. J.* 150 (2019) 104152.
- [40] J.G. Bruno, Effects of various additives on cancer biomarker aptamer-magnetic pull-down in human serum, *J. Bionanoscience* 11 (2017) 45–51.
- [41] G.S. Zamay, et al., Aptamers selected to postoperative lung adenocarcinoma detect circulating tumor cells in human blood, *Mol. Ther.* 23 (2015) 1486–1496.
- [42] G.S. Zamay, et al., Electrochemical aptasensor for lung cancer-related protein detection in crude blood plasma samples, *Sci. Rep.* 6 (2016) 34350.
- [43] S. Li, et al., Identification of an aptamer targeting hnRNP A1 by tissue slide-based SELEX, *J. Pathol.* 218 (2009) 327–336.
- [44] H. Wang, et al., Morph-X-Select: morphology-based tissue aptamer selection for ovarian cancer biomarker discovery, *Biotechniques* 61 (2016) 249–259.
- [45] W.-T. Liu, W.-B. Lee, Y.-C. Tsai, Y.-J. Chuang, K.-F. Hsu, G.-B. Lee, An automated microfluidic system for selection of aptamer probes against ovarian cancer tissues, *Biomicrofluidics* 13 (2019), 014114.
- [46] W. Zhong, et al., Identification and application of an aptamer targeting papillary thyroid carcinoma using tissue-SELEX, *Anal. Chem.* 91 (2019) 8289–8297.
- [47] J. Mi, Y. Liu, Z.N. Rabbani, Z. Yang, J.H. Urban, B.A. Sullenger, B.M. Clary, In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs, *Nat. Chem. Biol.* 6 (2010) 22–24.
- [48] J. Mi, et al., In vivo selection against human colorectal cancer xenografts identifies an aptamer that targets RNA helicase protein DHX9, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 5 (2016) e315.
- [49] H. Wang, Y. Zhang, H. Yang, M. Qin, X. Ding, R. Liu, Y. Jiang, In vivo SELEX of an inhibitory NSCLC-specific RNA aptamer from PEGylated RNA library, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 10 (2018) 187–198.
- [50] L. Civit, et al., Targeting hormone refractory prostate cancer by in vivo selected DNA libraries in an orthotopic xenograft mouse model, *Sci. Rep.* 9 (2019) 4976.
- [51] L. Chen, et al., In vivo SELEX of bone targeting aptamer in prostate cancer bone metastasis model, *Int. J. Nanomed.* 14 (2018) 149–159.
- [52] J.-T. Zhang, J.-T. Cao, G.-F. Shi, K.-J. Huang, Y.-M. Liu, S.-W. Ren, A luminol electrochemiluminescence aptasensor based on glucose oxidase modified gold nanoparticles for measurement of platelet-derived growth factor BB, *Talanta* 132 (2015) 65–71.
- [53] X. Liu, H.-L. Shuai, K.-J. Huang, A label-free electrochemical aptasensor based on leaf-like vanadium disulfide-Au nanoparticles for the sensitive and selective detection of platelet-derived growth factor BB, *Anal. Methods* 7 (2015) 8277–8284.
- [54] Z. Hao, Y. Pan, W. Shao, Q. Lin, X. Zhao, Graphene-based fully integrated portable nanosensing system for on-line detection of cytokine biomarkers in saliva, *Biosens. Bioelectron.* 134 (2019) 16–23.
- [55] M. Heiat, M. Negahdary, Sensitive diagnosis of alpha-fetoprotein by a label free nanoaptasensor designed by modified Au electrode with spindle-shaped gold nanostructure, *Microchem. J.* 148 (2019) 456–466.
- [56] M. Cui, Y. Wang, M. Jiao, S. Jayachandran, Y. Wu, X. Fan, X. Luo, Mixed self-assembled aptamer and newly designed zwitterionic peptide as antifouling biosensing interface for electrochemical detection of alpha-fetoprotein, *ACS Sens.* 2 (2017) 490–494.
- [57] A. Rahi, N. Sattarahmady, H. Heli, Label-free electrochemical aptasensing of the human prostate-specific antigen using gold nanospears, *Talanta* 156–157 (2016) 218–224.
- [58] E. Heydari-Bafrooei, N.S. Shamszadeh, Electrochemical bioassay development for ultrasensitive aptasensing of prostate specific antigen, *Biosens. Bioelectron.* 91 (2017) 284–292.
- [59] B. Wei, K. Mao, N. Liu, M. Zhang, Z. Yang, Graphene nanocomposites modified electrochemical aptamer sensor for rapid and highly sensitive detection of prostate specific antigen, *Biosens. Bioelectron.* 121 (2018) 41–46.
- [60] N. Sattarahmady, A. Rahi, H. Heli, A signal-on built in-marker electrochemical aptasensor for human prostate-specific antigen based on a hairbrush-like gold nanostructure, *Sci. Rep.* 7 (2017) 11238.
- [61] A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, E.F. Rodríguez, M.J. Lobo-Castañón, Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: toward more specific detection of prostate cancer, *Biosens. Bioelectron.* 128 (2019) 83–90.
- [62] C. Ma, H. Liu, L. Zhang, H. Li, M. Yan, X. Song, J. Yu, Multiplexed aptasensor for simultaneous detection of carcinoembryonic antigen and mucin-1 based on metal ion electrochemical labels and Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup> electronic wires, *Biosens. Bioelectron.* 99 (2018) 8–13.
- [63] G. Paniagua, et al., Amperometric aptasensor for carcinoembryonic antigen based on the use of bifunctionalized Janus nanoparticles as biorecognition-signaling element, *Anal. Chim. Acta* 1061 (2019) 84–91.
- [64] W. Wen, et al., Increased electrocatalyzed performance through hairpin oligonucleotide aptamer-functionalized gold nanorods labels and graphenestrepavidin nanomatrix: highly selective and sensitive electrochemical biosensor of carcinoembryonic antigen, *Biosens. Bioelectron.* 83 (2016) 142–148.
- [65] J.-J. Yang, J.-T. Cao, Y.-L. Wang, H. Wang, Y.-M. Liu, S.-H. Ma, Sandwich-like electrochemiluminescence aptasensor based on dual quenching effect from hemin-graphene nanosheet and enzymatic biocatalytic precipitation for sensitive detection of carcinoembryonic antigen, *J. Electroanal. Chem.* 787 (2017) 88–94.
- [66] Z. Liu, S. Lei, L. Zou, G. Li, L. Xu, B. Ye, A label-free and double recognition–amplification novel strategy for sensitive and accurate carcinoembryonic antigen assay, *Biosens. Bioelectron.* 131 (2019) 113–118.
- [67] Y. Wang, et al., Label-free microfluidic paper-based electrochemical

- aptasensor for ultrasensitive and simultaneous multiplexed detection of cancer biomarkers, *Biosens. Bioelectron.* 136 (2019) 84–90.
- [68] L. Ge, W. Wang, X. Sun, T. Hou, F. Li, Affinity-mediated homogeneous electrochemical aptasensor on a graphene platform for ultrasensitive biomolecule detection via exonuclease-assisted target-analog recycling amplification, *Anal. Chem.* 88 (2016) 2212–2219.
- [69] W. Jiang, L. Liu, L. Zhang, Q. Guo, Y. Cui, M. Yang, Sensitive immunosensing of the carcinoembryonic antigen utilizing aptamer-based in-situ formation of a redox-active heteropolyacid and rolling circle amplification, *Microchim. Acta* 184 (2017) 4757–4763.
- [70] K. Malecka, D. Pankratov, E.E. Ferapontova, Femtomolar electroanalysis of a breast cancer biomarker HER-2/neu protein in human serum by the cellulase-linked sandwich assay on magnetic beads, *Anal. Chim. Acta* 1077 (2019) 140–149.
- [71] C. Shen, K. Zeng, J. Luo, X. Li, M. Yang, A. Rasooly, Self-assembled DNA generated electric current biosensor for HER2 analysis, *Anal. Chem.* 89 (2017) 10264–10269.
- [72] Y. Nie, M. Yang, Y. Ding, Gold nanoparticle enhanced hybridization chain reaction as a method for signal amplification. Application to electrochemical immunodetection of the ovarian cancer biomarker carbohydrate antigen 125, *Microchim. Acta* 185 (2018) 331.
- [73] L. Farzin, S. Sadjadi, M. Shamsipur, S. Sheibani, M.h. Mousazadeh, Employing AgNPs doped amidoxime-modified polyacrylonitrile (PAN-oxime) nanofibers for target induced strand displacement-based electrochemical aptasensing of CA125 in ovarian cancer patients, *Mater. Sci. Eng. C* 97 (2019) 679–687.
- [74] S. Mansouri Majd, A. Salimi, Ultrasensitive flexible FET-type aptasensor for CA 125 cancer marker detection based on carboxylated multiwalled carbon nanotubes immobilized onto reduced graphene oxide film, *Anal. Chim. Acta* 1000 (2018) 273–282.
- [75] S.G. Meirinho, L.G. Dias, A.M. Peres, L.R. Rodrigues, Electrochemical aptasensor for human osteopontin detection using a DNA aptamer selected by SELEX, *Anal. Chim. Acta* 987 (2017) 25–37.
- [76] M. Shamsipur, L. Farzin, M. Amouzadeh Tabrizi, F. Molaabasi, Highly sensitive label free electrochemical detection of VEGF165 tumor marker based on “signal off” and “signal on” strategies using an anti-VEGF165 aptamer immobilized BSA-gold nanoclusters/ionic liquid/glassy carbon electrode, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 369–375.
- [77] M. Amouzadeh Tabrizi, M. Shamsipur, L. Farzin, A high sensitive electrochemical aptasensor for the determination of VEGF165 in serum of lung cancer patient, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 764–769.
- [78] H. Ilkhani, M. Sarparast, A. Noori, S. Zahra Bathaie, M.F. Mousavi, Electrochemical aptamer/antibody based sandwich immunosensor for the detection of EGFR, a cancer biomarker, using gold nanoparticles as a signaling probe, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 491–497.
- [79] C.S. Ferreira, C.S. Matthews, S. Missailidis, DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers, *Tumour Biol.* 27 (2006) 289–301.
- [80] C.S.M. Ferreira, K. Papamichael, G. Guilbault, T. Schwarzacher, J. Garipey, S. Missailidis, DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer–antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1039–1050.
- [81] Z. Mi, H. Guo, P.C. Kuo, Identification of osteopontin-dependent signaling pathways in a mouse model of human breast cancer, *BMC Res. Notes* 2 (2009) 119.
- [82] S.G. Meirinho, L.G. Dias, A.M. Peres, L.R. Rodrigues, Development of an electrochemical RNA-aptasensor to detect human osteopontin, *Biosens. Bioelectron.* 71 (2015) 332–341.
- [83] F. Kuralay, S. Campuzano, J. Wang, Greatly extended storage stability of electrochemical DNA biosensors using ternary thiolated self-assembled monolayers, *Talanta* 99 (2012) 155–160.
- [84] S. Campuzano, et al., Ternary monolayers as DNA recognition interfaces for direct and sensitive electrochemical detection in untreated clinical samples, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 3577–3583.
- [85] R.Y. Lai, K.W. Plaxco, A.J. Heeger, Aptamer-based electrochemical detection of picomolar platelet-derived growth factor directly in blood serum, *Anal. Chem.* 79 (2007) 229–233.
- [86] L.R. Schoukroun-Barnes, F.C. Macazo, B. Gutierrez, J. Lottermoser, J. Liu, R.J. White, Reagentless, structure-switching, electrochemical aptamer-based sensors, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 9 (2016) 163–181.
- [87] M.A. Pellitero, A. Shaver, N. Arroyo-Currás, Critical review—approaches for the electrochemical interrogation of DNA-based sensors: a critical review, *J. Electrochem. Soc.* 167 (2020), 037529.
- [88] A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. Díaz, D. Suárez, N. de-los-Santos-Alvarez, M.J. Lobo-Castañón, Aptamers Targeting Protein-specific Glycosylation in Tumor Biomarkers: General Selection, Characterization and Structural Modeling, 2020 submitted.
- [89] C.Q. Vu, P. Rotkrua, Y. Tantirungrotechai, B. Soontornworajit, Oligonucleotide hybridization combined with competitive antibody binding for the truncation of a high-affinity aptamer, *ACS Comb. Sci.* 19 (2017) 609–617.
- [90] L.S. Green, Inhibitory DNA ligands to platelet-derived growth factor B-chain, *Biochemistry-U.S.* 35 (1996) 14413–14424.
- [91] G. Mahlknecht, R. Maron, M. Mancini, B. Schechter, M. Sela, Y. Yarden, Aptamer to ErbB-2/HER2 enhances degradation of the target and inhibits tumorigenic growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 110 (2013) 8170–8175.
- [92] J.D. Cohen, et al., Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test, *Science* 359 (2018) 926–930.
- [93] N. Savory, K. Abe, K. Sode, K. Ikebukuro, Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1386–1391.
- [94] C.L. Chaffer, R.A. Weinberg, A perspective on cancer cell metastasis, *Science* 331 (2011) 1559–1564.
- [95] Z. Shen, A. Wu, X. Chen, Current detection technologies for circulating tumor cells, *Chem. Soc. Rev.* 46 (2017) 2038–2056.
- [96] Y. Zhao, D. Xu, W. Tan, Aptamer-functionalized nano/micro-materials for clinical diagnosis: isolation, release and bioanalysis of circulating tumor cells, *Integr. Biol.* 9 (2017) 188–205.
- [97] Y. Song, et al., Selection of DNA aptamers against epithelial cell adhesion molecule for cancer cell imaging and circulating tumor cell capture, *Anal. Chem.* 85 (2013) 4141–4149.
- [98] H. Shen, et al., A novel label-free and reusable electrochemical cytosensor for highly sensitive detection and specific collection of CTCs, *Biosens. Bioelectron.* 81 (2016) 495–502.
- [99] C. Shen, S. Liu, X. Li, M. Yang, Electrochemical detection of circulating tumor cells based on DNA generated electrochemical current and Rolling Circle Amplification, *Anal. Chem.* 91 (2019) 11614–11619.
- [100] J.-X. Liu, N. Bao, X. Luo, S.-N. Ding, Nonenzymatic amperometric aptamer cytosensor for ultrasensitive detection of circulating tumor cells and dynamic evaluation of cell surface N-glycan expression, *ACS Omega* 3 (2018) 8595–8604.
- [101] L. Tian, et al., Copper (II) oxide nanzyme based electrochemical cytosensor for high sensitive detection of circulating tumor cells in breast cancer, *J. Electroanal. Chem.* 812 (2018) 1–9.
- [102] D. Ou, D. Sun, Z. Liang, B. Chen, X. Lin, Z. Chen, A novel cytosensor for capture, detection and release of breast cancer cells based on metal organic framework PCN-224 and DNA tetrahedron linked dual-aptamer, *Sensor. Actuator. B Chem.* 285 (2019) 398–404.
- [103] D. Shangguan, et al., Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 103 (2006) 11838–11843.
- [104] D. Shangguan, Z. Tang, P. Mallikaratchy, Z. Xiao, W. Tan, Optimization and modifications of aptamers selected from live cancer cell lines, *ChemBiochem* 8 (2007) 603–606.
- [105] S.-S. Wang, X.-P. Zhao, F.-F. Liu, M.R. Younis, X.-H. Xia, C. Wang, Direct plasmon-enhanced electrochemistry for enabling ultrasensitive and label-free detection of circulating tumor cells in blood, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4413–4420.
- [106] P. Miao, Y. Tang, Gold nanoparticles-based multipedal DNA walker for ratiometric detection of circulating tumor cell, *Anal. Chem.* 91 (2019) 15187–15192.
- [107] J. Cao, X.-P. Zhao, M.R. Younis, Z.-Q. Li, X.-H. Xia, C. Wang, Ultrasensitive capture, detection, and release of circulating tumor cells using a nanochannel–ion channel hybrid coupled with electrochemical detection technique, *Anal. Chem.* 89 (2017) 10957–10964.
- [108] B. Dou, L. Xu, B. Jiang, R. Yuan, Y. Xiang, Aptamer-functionalized and gold nanoparticle array-decorated magnetic graphene nanosheets enable multiplexed and sensitive electrochemical detection of rare circulating tumor cells in whole blood, *Anal. Chem.* 91 (2019) 10792–10799.
- [109] P. Mallikaratchy, Z. Tang, S. Kwame, L. Meng, D. Shangguan, W. Tan, Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobulin heavy mu chain in Burkitt's lymphoma cells, *Mol. Cell. Proteomics* 6 (2007) 2230–2238.
- [110] D. Sun, J. Lu, Z. Luo, L. Zhang, P. Liu, Z. Chen, Competitive electrochemical platform for ultrasensitive cytosensing of liver cancer cells by using nanotetrahedra structure with rolling circle amplification, *Biosens. Bioelectron.* 120 (2018) 8–14.
- [111] L. Qu, J. Xu, X. Tan, Z. Liu, L. Xu, R. Peng, Dual-aptamer Modification generates a unique interface for highly sensitive and specific electrochemical detection of tumor cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6 (2014) 7309–7315.
- [112] F. Li, S. Hu, R. Zhang, Y. Gu, Y. Li, Y. Jia, Porous graphene oxide enhanced aptamer specific circulating-tumor-cell sensing interface on light addressable potentiometric sensor: clinical application and simulation, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (2019) 8704–8709.
- [113] D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Pure Appl. Chem.* 71 (1999) 2333–2348.
- [114] R. Xu, A. Rai, M. Chen, W. Suwakulsiri, D.W. Greening, R.J. Simpson, Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15 (2018) 617–638.
- [115] J.-H. Kim, E. Kim, M.Y. Lee, Exosomes as diagnostic biomarkers in cancer, *Mol. Cell Toxicol.* 14 (2018) 113–122.
- [116] M.F. Peterson, N. Otoc, J.K. Sethi, A. Gupta, T.J. Antes, Integrated systems for exosome investigation, *Methods* 87 (2015) 31–45.
- [117] B.S. Chia, Y.P. Low, Q. Wang, P. Li, Z. Gao, Advances in exosome quantification techniques, *Trac. Trends Anal. Chem.* 86 (2017) 93–106.
- [118] H. Zhang, Z. Wang, Q. Zhang, F. Wang, Y. Liu, Ti3C2 MXenes nanosheets catalyzed highly efficient electrogenerated chemiluminescence biosensor for the detection of exosomes, *Biosens. Bioelectron.* 124–125 (2019) 184–190.
- [119] L. Zhao, R. Sun, P. He, X. Zhang, Ultrasensitive detection of exosomes by

- target-triggered three-dimensional DNA walking machine and exonuclease III-assisted electrochemical ratiometric biosensing, *Anal. Chem.* 91 (2019) 14773–14779.
- [120] X. Yin, T. Hou, B. Huang, L. Yang, F. Li, Aptamer recognition-triggered label-free homogeneous electrochemical strategy for an ultrasensitive cancer-derived exosome assay, *Chem. Commun.* 55 (2019) 13705–13708.
- [121] Y. An, T. Jin, Y. Zhu, F. Zhang, P. He, An ultrasensitive electrochemical aptasensor for the determination of tumor exosomes based on click chemistry, *Biosens. Bioelectron.* 142 (2019) 111503.
- [122] B. Qiao, et al., An electrochemiluminescent aptasensor for amplified detection of exosomes from breast tumor cells (MCF-7 cells) based on G-quadruplex/hemin DNAszymes, *Analyst* 144 (2019) 3668–3675.
- [123] Y. Cao, L. Li, B. Han, Y. Wang, Y. Dai, J. Zhao, A catalytic molecule machine-driven biosensing method for amplified electrochemical detection of exosomes, *Biosens. Bioelectron.* 141 (2019) 111397.
- [124] H. Xu, C. Liao, P. Zuo, Z. Liu, B.-C. Ye, Magnetic-based microfluidic device for on-chip isolation and detection of tumor-derived exosomes, *Anal. Chem.* 90 (2018) 13451–13458.
- [125] Q. Zhou, A. Rahimian, K. Son, D.-S. Shin, T. Patel, A. Revzin, Development of an aptasensor for electrochemical detection of exosomes, *Methods* 97 (2016) 88–93.
- [126] <https://www.basepairbio.com/>. (Accessed 23 December 2019).
- [127] Y.-G. Zhou, et al., Interrogating circulating microRNAs and exosomes using metal nanoparticles, *Small* 12 (2016) 727–732.
- [128] R. Huang, et al., A sensitive aptasensor based on a hemin/G-quadruplex-assisted signal amplification strategy for electrochemical detection of gastric cancer exosomes, *Small* 15 (2019), e1900735.
- [129] H. Dong, H. Chen, J. Jiang, H. Zhang, C. Cai, Q. Shen, Highly sensitive electrochemical detection of tumor exosomes based on aptamer recognition-induced multi-DNA release and cyclic enzymatic amplification, *Anal. Chem.* 90 (2018) 4507–4513.
- [130] L. Zhang, et al., Evolution of functional six-nucleotide DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 6734–6737.
- [131] S. Wang, et al., Aptasensor with expanded nucleotide using DNA nanotetrahedra for electrochemical detection of cancerous exosomes, *ACS Nano* 11 (2017) 3943–3949.
- [132] F. Wei, J. Yang, D.T. Wong, Detection of exosomal biomarker by electric field-induced release and measurement (EFIRM), *Biosens. Bioelectron.* 44 (2013) 115–121.
- [133] H. Katoh, K. Nakamura, T. Tanaka, S. Satomura, S. Matsuura, Automatic and simultaneous analysis of Lens culinaris agglutinin-reactive  $\alpha$ -fetoprotein ratio and total  $\alpha$ -fetoprotein concentration, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2110–2114.
- [134] A.R. Horvath, et al., From biomarkers to medical tests: the changing landscape of test evaluation, *Clin. Chim. Acta* 427 (2014) 49–57.
- [135] M. Duan, et al., Selection and characterization of DNA aptamer for metastatic prostate cancer recognition and tissue imaging, *Oncotarget* 7 (2016) 36436–36446.
- [136] W. Sheng, T. Chen, W. Tan, Z.H. Fan, Multivalent DNA nanospheres for enhanced capture of cancer cells in microfluidic devices, *ACS Nano* 7 (2013) 7067–7076.
- [137] W. Zhao, et al., Bioinspired multivalent DNA network for capture and release of cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 109 (2012) 19626–19631.
- [138] <http://apollodx.com/investors/>. (Accessed 28 December 2019).
- [139] J.-F. Chen, et al., Clinical applications of NanoVelcro rare-cell assays for detection and characterization of circulating tumor cells, *Theranostics* 6 (2016) 1425–1439.
- [140] <https://patentscope.wipo.int/search/en/search.jsf>. (Accessed 7 April 2020).
- [141] S. Angione, M. Cooper, J. Coppeta, T. Mulhern, H. Azizogolshani, Regeneratable Biosensor and Methods of Use Thereof, EP3548891, 2019.
- [142] W. Fang, L. Wei, Probe Immobilization and Signal Amplification for Polymer-Based Biosensor, US20100330706, 2015.
- [143] F. Chunhai, Y. Fan, Z. Xiaolei, H. Qing, Integrated Type Microfluidic Electrochemical Biosensor System and Method for Rapid Biochemical Analysis, US20150153300, 2015.
- [144] M.B. Kjelstrup, C. Hejlesen, K.V. Gothelf, Z. Zhang, Detection of Non-nucleic Acid Analytes Using Strand Displacement Exchange Reactions, EP2895617, 2015.
- [145] M.B. Gu, J.W. Park, T. Rameshwar, Aptamers Screening Method Based on Graphene without Target Immobilization and the Aptamers Obtained from the Method, US20140363808, 2016.
- [146] C. Ban, Y.-K. Kim, H. Jo, S. Lee, H.J. Youn, DNA Aptamer Specifically Binding to EN2 (ENGRAILED-2) and Use Thereof, US20160187342, 2016.
- [147] W.R. Pagels, Systems and Methods for Diagnostic Testing, US20150268186, 2015.
- [148] S.J. Pearton, T. Lele, Sensors Using High Electron Mobility Transistors, US20110074381, 2014.
- [149] J. Lotvall, S.C. J. R. Crescitelli, Tissue-derived Extracellular Vesicles and Their Use as Diagnostics, GB2560897, 2018.

- [150] D. Halbert, V. Domyuk, D. Spetzler, T. Hornung, F. Schafer, N. Xiao, Aptamers and Uses Thereof, US20190317099, 2019.
- [151] C. Hui, Aptamer for the Capture, Diagnosis, Enumeration, and Eradication of Circulating Tumor Cells US20130035630, 2013.
- [152] G.A. Martin, S. Soper, M. Witek, J.J. Yeh, In Vitro Capture and Analysis of Circulating Tumor Cells, EP2919910, 2015.



**Ana Díaz-Fernández** received her BS in Chemistry in 2015 and her MS in Analytical and Bioanalytical Sciences in 2016 from University of Oviedo. She is now a PhD student in the Chemical, Biochemical and Structural Analysis and Computational Modeling doctoral program of the same University. Her PhD is focused on the selection of aptamers for the development of new aptamer-based biosensors for tumor biomarkers.



**Ramón Lorenzo-Gómez** received his BSc in Chemistry from University of Santiago de Compostela (Spain) in 2016 and his MSc in Analytical and Bioanalytical Sciences from University of Oviedo (Spain) in 2017. He is a PhD student in Chemical, Biochemical and Structural Analysis and Computational Modeling at University of Oviedo since September 2017, where he works as a researcher in the Electroanalysis research group headed by Prof. M. J. Lobo-Castañón. His current research focuses on the integration of isothermal nucleic acid amplification techniques to the development of aptamer-based bioassays and biosensors for the sensitive detection of cancer biomarkers.



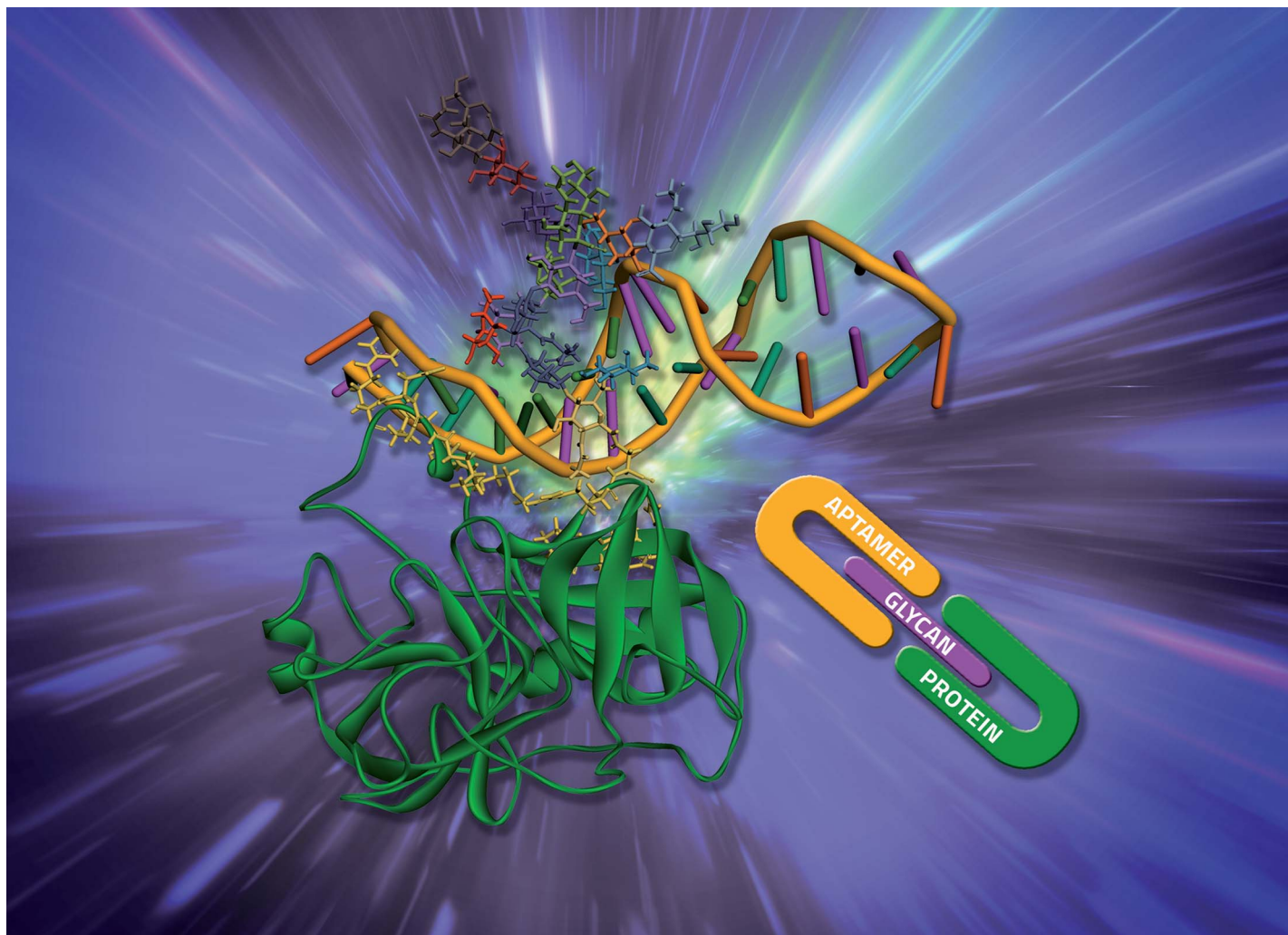
**Rebeca Miranda-Castro** is an Assistant Professor at University of Oviedo and belongs to the Electroanalysis Research Group headed by Prof. M.J. Lobo-Castañón. Her research interests focus on the development of electrochemical sensors for clinical diagnosis and food analysis using molecular recognition elements based on nucleic acids (genosensors and aptasensors).



**Noemí de los Santos-Álvarez** is an Associate Professor at Universidad de Oviedo (Spain). Her research experience expands from redox electrocatalysts characterization to electrochemical DNA-based sensors (aptasensors and genosensors) in food, environmental and clinical analysis with a brief excursion to fuel cells during her postdoc stage at Cornell University under H.D. Abruña supervision. Her strong background in aptamer selection and characterization is currently focused on cancer biomarkers for diagnostic devices.



**María Jesús Lobo-Castañón** is Professor at the University of Oviedo, Department of Physical and Analytical Chemistry, Spain, where she leads the Electroanalysis research group. Her current research interests focus on the development of electrochemical sensors for clinical diagnosis and food analysis, using different molecular recognition elements, such as enzymes, DNA and aptamers.



Showcasing research from Professor María Jesús Lobo-Castañón's laboratory, Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Spain.

Aptamers targeting protein-specific glycosylation in tumor biomarkers: general selection, characterization and structural modeling

Aberrant glycosylation of proteins is associated with cancer. Therefore, the detection of specific glycoforms could increase the diagnostic value of glycoprotein biomarkers. Here, we report a method for selecting aptamers towards the glycosylation site of a protein, integrating in the recognition both the glycan and peptide moieties. We computationally predicted the structure of the selected aptamer and its complex with the glycoprotein, confirming the binary recognition. The proposed selection strategy has great significance for obtaining new aptamers useful for site-specific glycosylation analysis.

As featured in:



See M. Jesús Lobo-Castañón *et al.*, *Chem. Sci.*, 2020, 11, 9402.

Cite this: *Chem. Sci.*, 2020, 11, 9402

All publication charges for this article have been paid for by the Royal Society of Chemistry

## Aptamers targeting protein-specific glycosylation in tumor biomarkers: general selection, characterization and structural modeling†

Ana Díaz-Fernández,<sup>ab</sup> Rebeca Miranda-Castro,<sup>ab</sup> Natalia Díaz,<sup>a</sup> Dimas Suárez,<sup>a</sup> Noemí de-los-Santos-Álvarez<sup>ab</sup> and M. Jesús Lobo-Castañón<sup>\*ab</sup>

Detecting specific protein glycoforms is attracting particular attention due to its potential to improve the performance of current cancer biomarkers. Although natural receptors such as lectins and antibodies have served as powerful tools for the detection of protein-bound glycans, the development of effective receptors able to integrate in the recognition both the glycan and peptide moieties is still challenging. Here we report a method for selecting aptamers toward the glycosylation site of a protein. It allows identification of an aptamer that binds with nM affinity to prostate-specific antigen, discriminating it from proteins with a similar glycosylation pattern. We also computationally predict the structure of the selected aptamer and characterize its complex with the glycoprotein by docking and molecular dynamics calculations, further supporting the binary recognition event. This study opens a new route for the identification of aptamers for the binary recognition of glycoproteins, useful for diagnostic and therapeutic applications.

Received 11th January 2020

Accepted 20th July 2020

DOI: 10.1039/d0sc00209g

rsc.li/chemical-science

### Introduction

Cancer precision medicine relies on the molecular characterization of tumors, commonly the genetic material, to guide individual patient therapy. However, aberrant changes in the human genome, which are progressively being uncovered by the rapidly evolving next-generation sequencing technologies, are not the only molecular changes that drive pre-cancer and cancer progression.<sup>1</sup> Proteins regulate cellular activity, but in addition to gene transcription, a plethora of posttranslational modifications (PTMs) modulate the proteins' function,<sup>2</sup> and dysregulations in the PTM machinery lead to the acquisition of aberrant protein functions involved in tumorigenesis.<sup>3</sup> Among the different PTMs, glycosylation is particularly important as it plays crucial roles in a variety of cellular processes involved in cancer progression, such as tumor cell differentiation and invasion, cell-matrix interaction and signaling, tumor immune surveillance and metastasis formation.<sup>4</sup>

Despite aberrant glycosylation patterns in certain proteins such as  $\alpha$ -fetoprotein, mucins or prostate specific antigen, have been described as a fundamental characteristic of

malignant transformations,<sup>5</sup> only the total level of the glycoproteins, ignoring the glycan moiety, is typically monitored in the clinical practice for cancer diagnosis and prognosis. A much more informative though challenging approach would be the detection of specific glycoforms of the protein biomarkers.

Two general strategies are available for obtaining information on the amount of a protein with a particular associated glycan.<sup>6</sup> The first approach is based on mass spectrometry in conjugation with different separation methods after a previous enzymatic digestion of the sample.<sup>7</sup> This is a powerful tool for glycopeptide mapping, although with important technical obstacles such as the weak ionization efficiency of glycopeptides and the important matrix effects in biological fluids, which leads to a limited sensitivity.<sup>8</sup> The second approach combines the use of a receptor selective for the protein, for example an antibody or an aptamer, and a lectin capable of recognizing specific carbohydrate structures,<sup>9–12</sup> although the glycosylation of antibodies complicates the analysis in the most common immune-lectin assays. It is also possible to detect protein-specific glycosylation by artificial linking a protein receptor, antibody or aptamer, with a metabolically engineered glycan, mainly with azide-containing sugars.<sup>13–15</sup> However, the risk of faulty linkages (open bridges) as a source of false positive results is a major drawback.<sup>16</sup>

Aptamers are good alternatives to antibodies as specific receptors, and there are some attempts to guide the aptamer selection toward the sugar moiety, either using as target

<sup>a</sup>Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Av. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain. E-mail: mjlc@uniovi.es

<sup>b</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Avenida de Roma, 33011 Oviedo, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0sc00209g



glycosylated-peptide fragments<sup>17</sup> or the whole glycoprotein.<sup>18–20</sup> Many of these strategies take advantage of the intrinsic ability of boronic acid for interacting with diols in the sugar moiety by incorporating such a group in the aptamer sequence<sup>18</sup> or in the support for the protein immobilization.<sup>19</sup> To date, however, the obtained aptamers have shown the ability to either recognize different glycan structures<sup>18</sup> or just a particular carbohydrate epitope regardless the protein to which it is attached.<sup>20</sup> To the best of our knowledge only one aptamer is claimed to recognize both peptide and glycan structure, but it was only challenged to short peptides instead of the complete protein.<sup>17a</sup>

Currently and despite its anticipated greater potential in cancer diagnostic and prognostic,<sup>4</sup> there is no synthetic receptor able to integrate the recognition of both the glycan moiety and the peptide surrounding in an intact glycoprotein, and it has only recently been shown that a mammalian lectin, Dectin-1, recognizes a glycan/peptide part in IgG antibodies.<sup>21</sup>

Motivated by the limited set of tools available for the binary recognition of glycoproteins, we present here a general selection approach to obtain aptamers capable of detecting an epitope that encompasses certain regions in both the glycan and the protein structures. We demonstrated the feasibility of the approach for prostate-specific antigen (PSA) as a model glycoprotein, evaluating the role that the sugars and the peptide sequence play in the aptamer-binding event. By combining structural predictions tools for RNA/DNA with molecular dynamics (MD) simulations on the  $\mu\text{s}$  time scale, we build and refine the 3D structure of the aptamer, which proved to be very valuable in guiding truncation studies in order to identify the minimum oligonucleotide sequence for binding. This model and the crystal structure of the protein<sup>22</sup> served as the starting point for computational docking and MD simulations, which help in the identification of amino acids, sugars and nucleotides involved in the formation of the glycoprotein-aptamer complex.

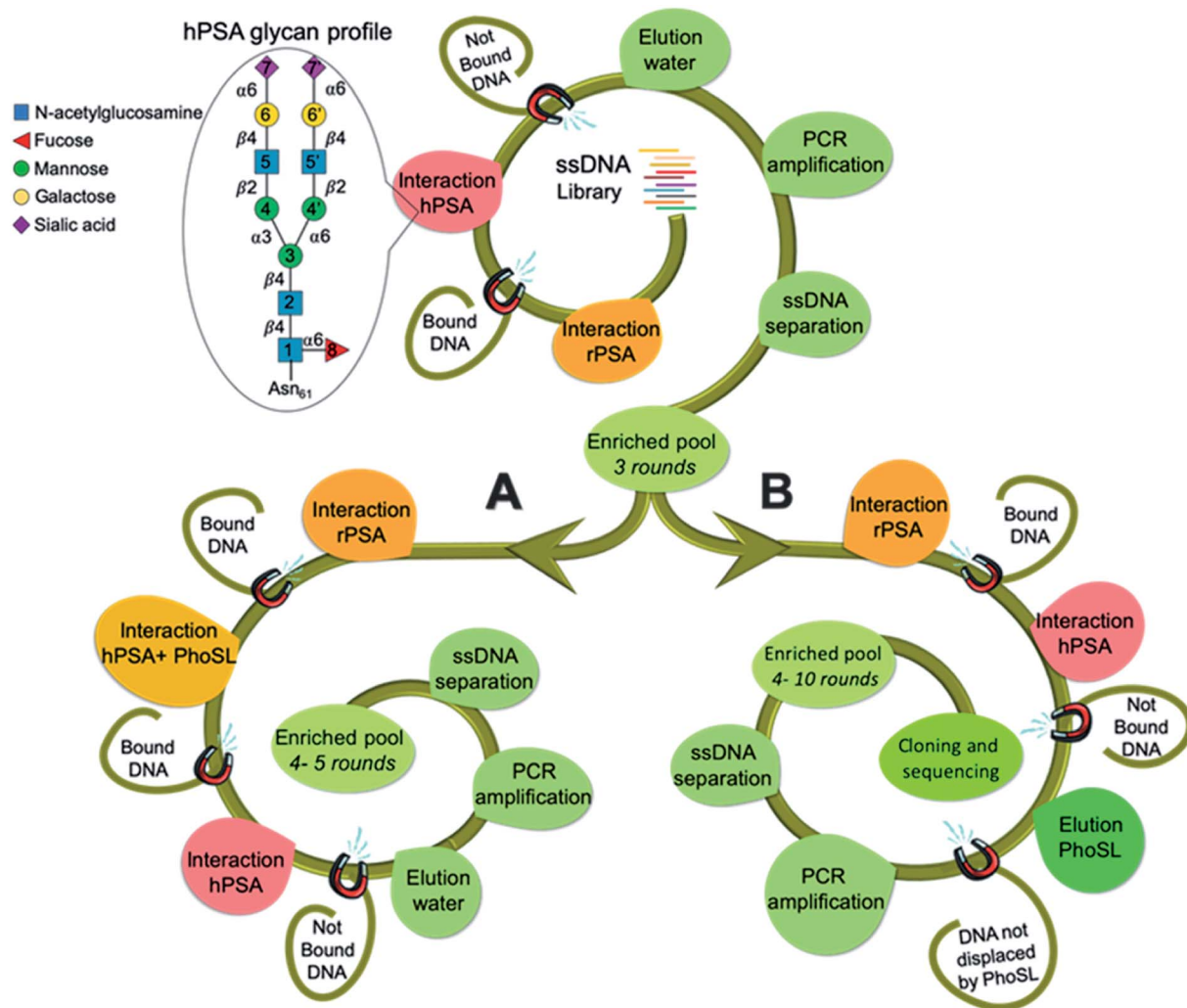


Fig. 1 Overview of SELEX procedure. Top spiral shows the steps for rounds 1–3, using glycosylated PSA as a target; the inset shows the consensus, most abundant glycan profile associated with human PSA. After round 3, SELEX separates into two routes, spiral A shows the strategy A, involving extra counter-selections with hPSA blocked with the lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa* (PhoSL) (rounds 4 and 5) and spiral B shows the strategy B, which is based on the competitive elution with the lectin (rounds 4–10).



## Results and discussion

### Directing the selection against site-specific glycan-peptide epitopes

Human prostate specific antigen (hPSA) is an attractive target as a model system because it is a glycoprotein whose serum level is used as the gold standard test for screening, diagnosing and monitoring disease progression in prostate cancer. However, this test is unable to distinguish indolent from aggressive disease and it lacks sufficient diagnostic selectivity.<sup>23</sup> In the absence of disease, hPSA has a single *N*-glycosylation site at asparagine-61 ( $\text{Asn}_{61} = \text{Asn}_{69}$  according to another assignment),<sup>22,24</sup> with a consensus biantennary glycan structure (Fig. 1) representing ~80% of the identified glycoforms.<sup>25</sup> A wide range of alterations in the oligosaccharides profile have been associated with prostate cancer development.<sup>26</sup> As such, a simple and straightforward approach to improve the use of PSA as a cancer biomarker could be to obtain aptamers that recognize glycosylation changes occurring at the specific site in the protein.

The selection approach is built on our previous work<sup>20</sup> to direct aptamers toward the glycan moiety using hPSA as a target

and recombinant PSA (rPSA) in counter selection steps. This yielded broad-spectrum glycan binders, as natural lectins, without discrimination ability between proteins with similar glycan structures. To achieve a finer direction of the aptamers for integrating in the recognition both the sugar and the near peptide region of hPSA, we envision two strategies (Fig. 1) using *Pholiota squarrosa* lectin (PhoSL) as a specific binder of  $\alpha$ 1-6 core-fucose,<sup>27</sup> which is linked to the innermost sugar residue, thus increasing the likelihood of obtaining aptamers specific for the glycosylation site of the protein.

The SELEX approach involved the immobilization of either hPSA or rPSA onto magnetic particles (MPs), using bovine serum albumin (BSA) as a blocking agent. Each SELEX round included a negative selection step with BSA-MPs to eliminate sequences that bind to BSA, followed by a counter-selection against rPSA-MPs to remove molecules that bind to the protein by regions different from the glycosylation site, and a positive selection step with hPSA-MPs to enrich the starting library in sequences that bind to the desired glycan moiety in the protein. After three common rounds, the pool was split to perform two distinct routes. Strategy A includes an extra more

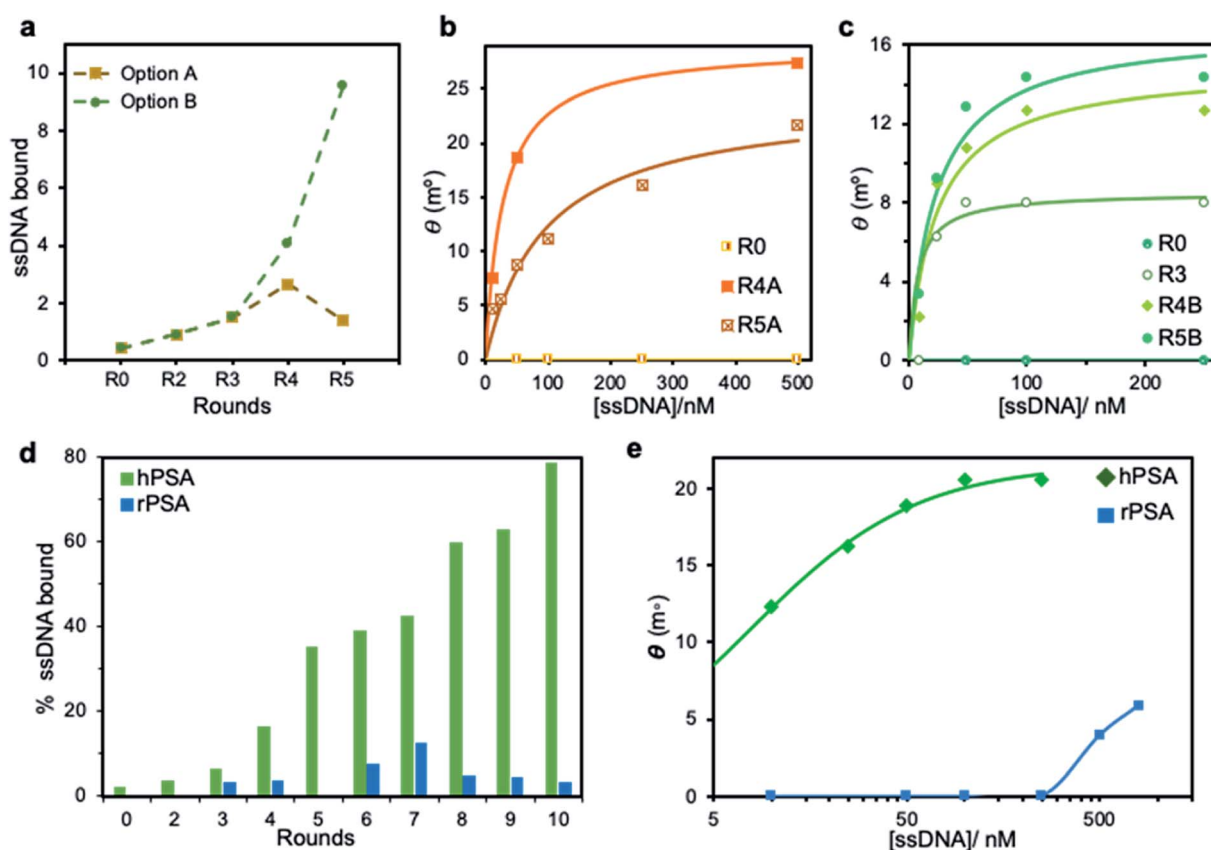


Fig. 2 Enrichment assays. (a) The amount of ssDNA bound to hPSA, measured by UV-vis spectroscopy at 260 nm, increases from R4 to R5 when using strategy B during SELEX, whereas it decreases for strategy A. (b) Representative SPR binding curves for ssDNA in pools after R4 and R5 of the SELEX option A show a decrease in the population of hPSA binders through the selection. This contrasts with (c) representative SPR binding curves for ssDNA remaining after R3 to R5 following the SELEX option B, which leads to an increase in the amount of good hPSA-binders. In both cases the binding of R0 is shown as control. (d) Evolution of the percentage of ssDNA that binds to hPSA and rPSA through the SELEX rounds obtained by absorbance measurements. (e) Representative SPR binding curves obtained with increasing concentrations of ssDNA from R10 to hPSA shift to much lower DNA concentrations than the binding to rPSA, demonstrating the higher affinity of this pool toward the glycosylated form of the protein.



stringent counter-selection step by blocking the  $\alpha$ 1-6 core-fucose with PhoSL, removing molecules that remained bound to the blocked protein. Strategy B, in contrast, relies on the competitive elution of ssDNA bound to the PhoSL binding site. Upon two additional rounds (R4 and R5) performed separately, the enrichment of both pools in sequences with affinity to hPSA was monitored by absorbance (Fig. 2a) and SPR measurements (Fig. 2b and c). The results revealed that strategy A leads to a decrease in the number of sequences bound to hPSA from R4 to R5 while the competitive elution with lectin produces a progressive increase in both population of hPSA-binders and their average binding affinity.

To maximize the affinity to hPSA, we performed five additional rounds of selection following the strategy B, monitoring the ability of the successive pools to recognize hPSA and rPSA by absorbance measurements (Fig. 2d). We observed a progressive enrichment in sequences with affinity toward the glycosylated protein, reaching an unusually high 78% of specific binders of hPSA in the tenth round. Concurrently, low affinity for rPSA was maintained in all rounds, with a final 3% that shows the efficiency of the strategy.

To confirm this, we performed binding curves on hPSA-modified Au SPR disks with serial dilutions of the PCR-amplified pools. The results showed a continuous shifting toward smaller ssDNA concentrations and higher resonance angles for each round, which corroborates the enrichment in hPSA-binders. Besides, the binding curve of the 10th pool to rPSA required significantly higher concentrations of ssDNA to achieve modest signals when compared with the binding curve for hPSA (Fig. 2e), which evidences a low affinity of the selected sequences for the protein in the absence of glycan on its surface. The average binding affinity of this pool to hPSA, measured as the equilibrium dissociation constant ( $K_d$ ) is estimated to be  $7.6 \pm 0.6$  nM. Remelting experiments also agree with enrichment assays (ESI, Fig. S1†).

### Screening and characterization of individual aptamers

Sequences from pool 10 were cloned into *E. coli* cells and 38 randomly selected clones were sequenced, analyzed and classified into families. 15 sequences possessing direct primer at the 5' end were grouped as family I though there is no additional homology. The three sequences with homology with PSA-1 aptamer, obtained in a previous SELEX for PSA,<sup>29</sup> were grouped as family II and the rest unrelated sequences formed family III (ESI, Fig. S2†).

We selected three representative sequences from families I and II as candidates for further testing. The unusually large number of sequences with the direct primer inserted led us to suppose that it might be important for binding rather than a PCR artifact so we selected clone 35 because its predicted relatively strong secondary structure<sup>28</sup> involves most of the nucleotides (ESI, Fig. S3†). Clone 15 presented the highest homology to PSA-1 and clone 3 occurred twice so both were also chosen as candidates.

To test the ability of the three selected aptamers to distinguish between the glycosylated and unglycosylated PSA, we developed

an electrochemical binding assay using hPSA or rPSA covalently bound to screen-printed gold electrodes (SPAuE). The modified electrodes were incubated with 500 nM of each 5'-fluorescein-labelled aptamer, in a phosphate buffer containing  $\text{Na}^+$  ions (PBS-Na). Upon the specific binding of anti-fluorescein (Fab fragment)-peroxidase (POD) conjugate, the sensor output was obtained through the measurement by chronoamperometry of the immobilized POD activity in the presence of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 3a). The three aptamers bind to the hPSA but the differences in the current intensity suggest different affinity for the protein or accessibility to their binding site. PSAG-1 (clone 3) shows the highest signal for hPSA ( $359 \pm 27$  nA) while the current falls 37% when using PSAG-2 (clone 15) and 44% for PSAG-3 (clone 35). PSAG-1, in contrast, produces a much smaller signal ( $50 \pm 3$  nA), against rPSA, whereas the signal with PSAG-2 and PSAG-3 is the same, within the experimental error, as that obtained for hPSA (ESI, Fig. S4†), so only PSAG-1 differentiates glycosylated from non-glycosylated protein and was selected for further experiments.

The binding curve of the fluorescein-tagged PSAG-1 to hPSA-modified SPAuE in PBS-Na (Fig. 3b) fitted well to the Langmuir model, calculating a  $K_d$  of  $72 \pm 8$  nM, which is at least one order of magnitude better than the values described for lectins, typically in the range 1–10  $\mu\text{M}$ .<sup>29</sup> For example, the affinity of PSAG-1 is more than 160 times better than an algal lectin specifically recognizing  $\alpha$ 1-6 fucosylated *N*-glycans<sup>30</sup> and 43 times superior to PhoSL.<sup>27</sup> Interestingly, the binding signal depends on the nature of the cation in the binding buffer. When sodium ions are replaced with potassium ions, maintaining the ionic strength, the signals increase; for example, the saturation signal changes from  $398 \pm 14$  nA with  $\text{Na}^+$  to  $970 \pm 17$  nA in  $\text{K}^+$  buffer, and the dissociation constant shifts to  $34 \pm 9$  nM. SPR experiments in PBS-K buffer confirmed an improved affinity. The changes in the resonance angle expressed in percentage of the maximum angle shift were plotted against the aptamer concentration and fitted to the Langmuir equation obtaining a dissociation constant of  $1.9 \pm 0.2$  nM (ESI, Fig. S5†).

Considering the high percentage of guanines in the aptamer sequence, and the well-known stabilizing effect of  $\text{K}^+$  ions on G-quadruplex, we hypothesized that the folding of PSAG-1 may present guanine quartets. However, circular dichroism spectra obtained in PBS-Na and PBS-K are virtually identical and UV thermal melting curves at 295 nm in PBS-K do not show the expected hypochromism (ESI, Fig. S6 and S7†) consistent with a G-quadruplex structure.

We next characterize the selectivity with two core-fucosylated glycoproteins: lipocalin-2 (NGAL) and  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), both covalently linked to SPAuE. We find that the signal is different from background at high aptamer concentrations, but in contrast to what happens with hPSA, it does not increase significantly with the concentration of aptamer (Fig. 3c), comparable to the binding behavior against rPSA. Of note, our previous aptamer, PSA-1, only directed to the glycan but not to the glycosylation site, is not able to discriminate between hPSA and NGAL (Fig. 3d). Both aptamers maintain a statistically identical residual affinity at 95% confidence level for rPSA. Moreover, we challenge 500 nM PSAG-1 to immobilized





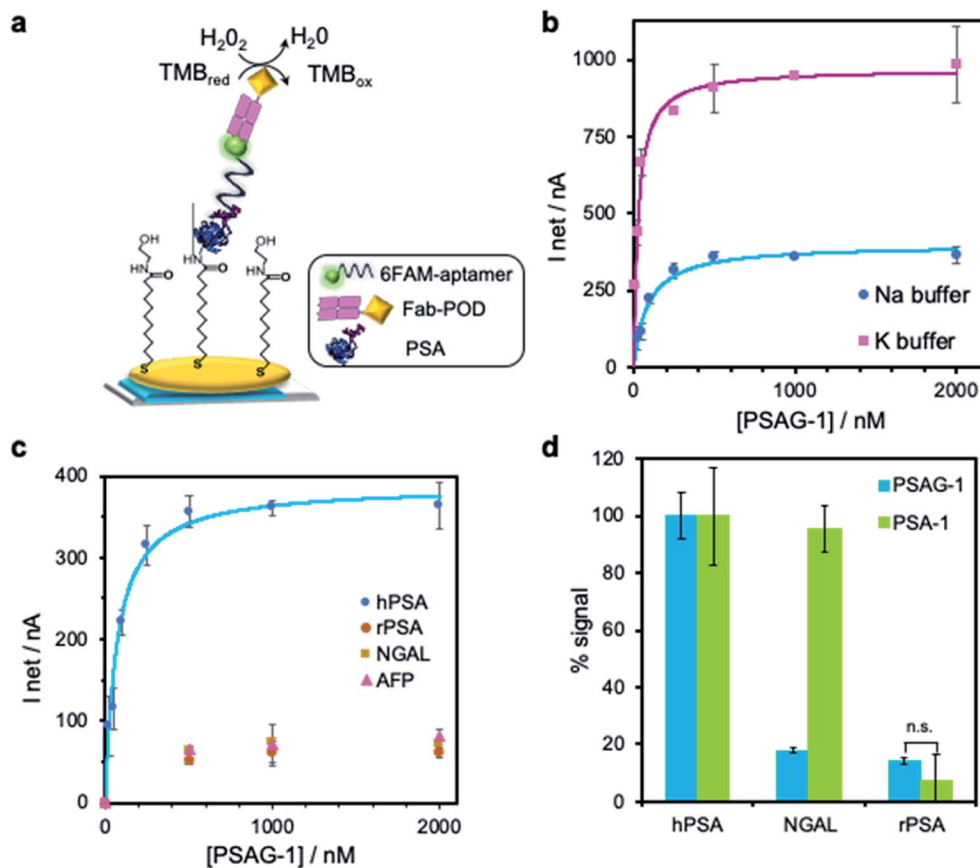


Fig. 3 Characterization of aptamer PSAG-1. (a) Schematic illustration of the binding assay on screen-printed gold electrodes with chronoamperometric detection at  $-0.2$  V. (b) Binding curves obtained with hPSA-modified electrodes in PBS–Na or PBS–K buffer showing the improved affinity toward hPSA in the presence of  $K^+$  ions. (c) Under identical conditions (PBS–Na) the aptamer showed not significant binding to recombinant PSA, NGAL and AFP. (d) Comparison of the selectivity of aptamer PSAG-1 and aptamer PSA-1 for hPSA, rPSA and NGAL (n.s.: not significant differences at 95% confidence level).

ovalbumin, a glycoprotein with high-mannose structures that lacks the fucose-core unit,<sup>31</sup> in PBS–K. We again observe a high impact on binding, with a fivefold decrease in the fraction of bound aptamer ( $21 \pm 2\%$ ), only slightly larger than that obtained for binding to rPSA ( $13 \pm 5\%$ ). Even for a protein such as transferrin, with more than one site of *N*-glycosylation but without fucose-core,<sup>32</sup> PSAG-1 shows a significantly lower affinity with  $45 \pm 5\%$  of binding. These results demonstrate the excellent selectivity of PSAG-1 against other glycoproteins.

### Empirical study of the binding site

To investigate the potential role of the glycan moiety in the recognition by both aptamers PSAG-1 and PSA-1, we sequentially removed the sugars of hPSA immobilized onto SPAuE employing different selective glycosidases as depicted in Fig. 4a. Upon each sugar elimination, we verify the binding ability of the aptamers with the electrochemical assay described in Fig. 3a, which is expressed as binding percentage, referred to the signal obtained with the intact hPSA.

The binding pattern is completely different for both aptamers (Fig. 4b). The removal of the terminal sialic acids does not affect the binding capacity of PSAG-1 while reduces the signal of PSA-1

by over 30%, indicating that only PSA-1 readily recognizes this sugar. Treatment with galactosidase further decreases the PSA-1 binding to a residual value ( $<20\%$ ) similar, within the experimental error, to that obtained for the binding to rPSA or after the hydrolysis with PNGaseF to completely eliminate the glycan. This means that PSA-1 binding mainly involves the external sugars of the glycan moiety, which agrees with the lack of recognition of the amino acid chain of the protein by this aptamer.

On the contrary, the novel aptamer, PSAG-1, exhibits affinity for the inner sugars close to the polypeptide chain. The gradual removal of sugars but sialic acid produces a progressive decrease in binding capacity, with step decreases in binding in the range 13–21%. The comparable signal percentage after one-step removal of glycan with PNGaseF and interaction with rPSA confirm a correct deglycosylation process. These results suggest that a large part of the oligosaccharide constitutes the aptamer binding site, including the core-fucose.

The importance of  $\alpha$ 1-6 core-fucose in the recognition was further investigated by a displacement binding assay in the presence of immobilized-hPSA blocked with  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  PhoSL for 1 h in PBS–Na buffer. Given that the PhoSL lectin specifically recognizes core-fucosylated *N*-glycans,<sup>33</sup> we deemed that the binding of the lectin to hPSA could inhibit the interaction of an



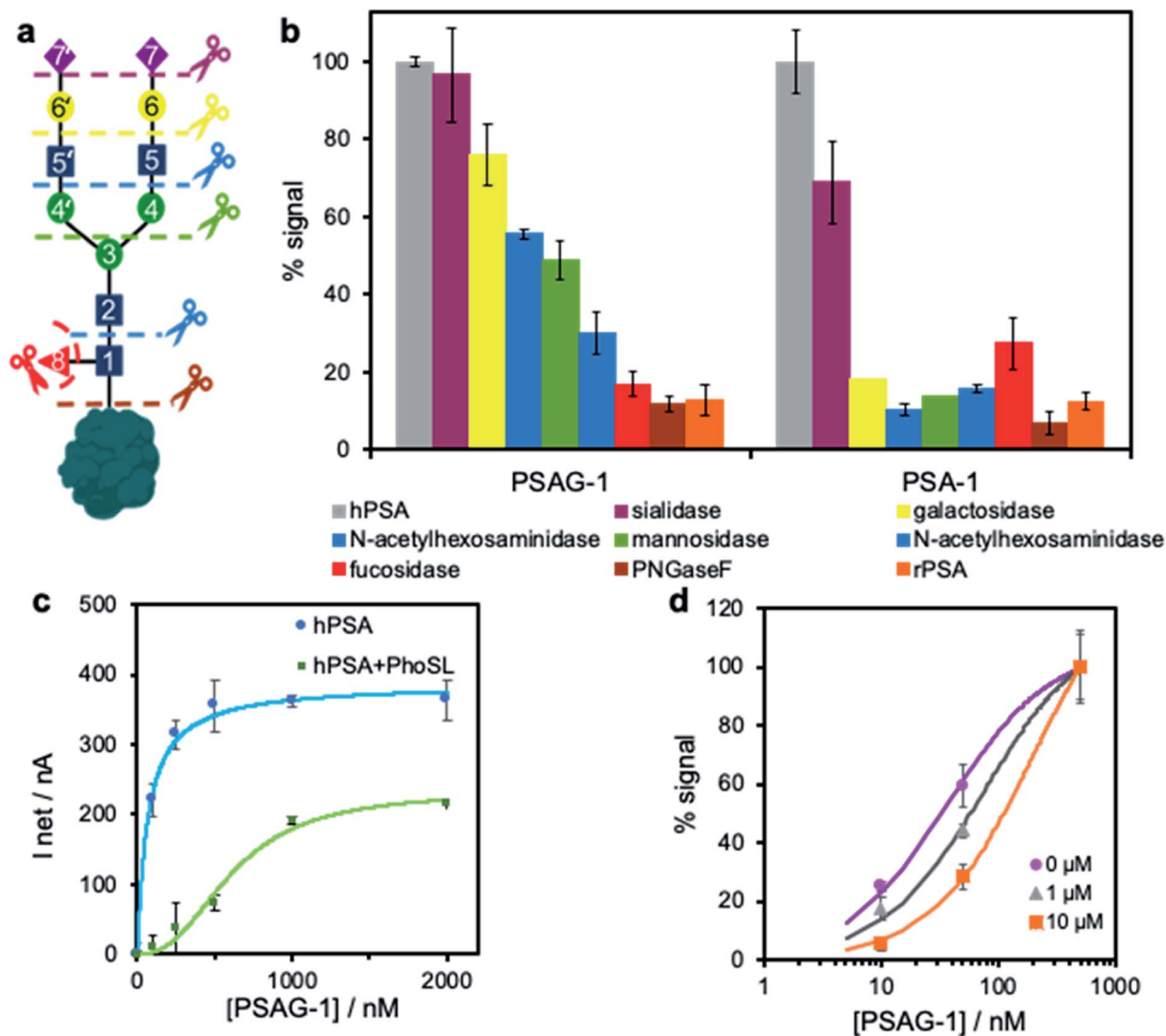


Fig. 4 Study of the binding site of PSAG-1. (a) Sugar chain on hPSA, identifying the hydrolysis site for the different glycosidases employed in a sequential way. (b) Deglycosylation experiment: percentage of binding measured electrochemically before and after each sugar elimination and comparison with the binding percentage to rPSA using 500 nM PSA-1 in BS and 100 nM PSAG-1 in PBS-K. (c) Binding of increasing concentrations of PSAG-1 in PBS-Na to hPSA and to PhoSL-blocked hPSA both immobilized on SPAuE. (d) Electrochemical competitive assay between immobilized hPSA and fucose in solution at 0, 1 and 10  $\mu\text{M}$  for 10, 50 and 500 nM of PSAG-1 in PBS-K.

aptamer able to recognize this sugar. We find nearly the same signals as those obtained for unblocked PSA when the assay is performed with PSA-1 (ESI, Fig. S8<sup>†</sup>), which indicates that the lectin and PSA-1 do not share a common binding site, in agreement with the deglycosylation study. However, when using PSAG-1, we observed a clear shift of the binding curve in the presence of the blocking lectin (Fig. 4c). The displacement at high aptamer concentrations indicates that both receptors have overlapping binding sites. Of note, we observe that the ability of the aptamer to recognize free-fucose is limited in a competitive assay between the core-fucose of the electrode-bound hPSA and *L*-fucose in solution. Using three different concentrations of *L*-fucose in the presence of increasing concentrations of PSAG-1 we obtained slight displacements in the binding curve to hPSA (Fig. 4d), proving that aptamer PSAG-1 binds to fucose but other sugars are also involved.

### Computational structural predictions for PSAG-1

As recently shown,<sup>34</sup> current molecular methods for the structural prediction of single stranded RNAs are also useful to obtain initial structures of ssDNA molecules that, however, require further refinement. Thus, starting at the secondary structures predicted by mfold, we employed the RNA-COMPOSER tool and molecular edition software to generate 3D structures for the 40-residue PSAG-1 aptamer. To refine this structure, we considered essential to perform MD simulations on the  $\mu\text{s}$  time scale (2.5  $\mu\text{s}$ ). Furthermore, we run first Gaussian-Accelerated MD (GaMD) simulations, which significantly increase the amount of conformational sampling, followed by conventional MD runs, which yield extensive equilibrium sampling of the structural and dynamical properties of the models (ESI, Scheme S1<sup>†</sup>).



For the PSAG-1 sequence, the mfold algorithm gave three secondary structures (labelled as **A1**, **A2** and **A3**) that are similarly ranked in terms of the estimated  $\Delta_{\text{fold}}G$  values ( $-3.16$ ,  $-3.16$  and  $-2.72$  kcal mol $^{-1}$ ). Therefore, we built three different 3D structures for PSAG-1 that were subjected to the GaMD/MD protocol. To discriminate among the three models, we computed their average MM–Poisson Boltzman Surface Area (MM–PBSA) energies along the MD simulations, the **A1** model being unequivocally the most stable one. For this reason, and for the sake of brevity, we focus on the structural and dynamical characterization of **A1** and present the results for **A2** and **A3** in the ESI.†

Fig. 5a and b displays the secondary structure and the ribbon representation, respectively, of the initial **A1** model. This structure is characterized by a hairpin loop (residues 13–18–TGGGAT–), a 6-base pair helical stacked stem constituted by canonical/wobble pairings, one isolated canonical pair (C12–G19) and three non-canonical base pairs (T13–T21, G14–A17, A17–A20). The 3'-end of the ssDNA chain exhibits an extended single-stranded conformation. The GaMD simulation started at the initial **A1** structure explored distant conformations as revealed by the 2D free energy map (Fig. 5c) in which the root-mean-squared-deviation (RMSD) and the interaction network fidelity index (INF) have values within the 6–16 Å and 0.05–0.30 intervals, respectively. Fig. 5c also shows the unweighted population distribution ( $P^*$ ) of the GaMD trajectory in terms of the

RMSD/INF values. The boundary 2D bins in the map are scarcely populated (*i.e.*, they have  $P^*$  values  $< 10^{-3}$ ) and correspond mainly with high free energies, but there are also wide fluctuations and/or deep minima that are most likely artefacts. As our objective was to choose a representative GaMD structure as the starting point for the equilibrium cMD simulation, we focused on the highly-populated area of the free energy map. Therefore, we selected one of the most stable snapshots within a broad and shallow free energy basin (see Fig. 5c), which accounts for  $\sim 25\%$  of the GaMD snapshots. The selected structure differs substantially from the initial model (RMSD = 9.7 Å, see Fig. 5b) although the hairpin loop and the helical elements remain quite similar.

The conventional MD (2.5  $\mu\text{s}$ ) trajectory fully relaxes the **A1** model in solution and characterizes its structural and dynamical properties. The stem of canonical/wobble base pairs is well maintained during the simulation, but the helical structure adjacent to the hairpin loop is altered after the rupture/formation of non-canonical base pair contacts (see Fig. 5a and d). The newly formed contacts (G14–T21, G15–A20 and G16–G19) kept stable during the simulation so that the helical elements were quite rigid as revealed by the RMSD superposition of the most populated cluster representatives (Fig. 5e). We also found that other non-pairing interactions are equally stabilized, especially in the case of  $\pi$ -stacking interactions outside the stem (*e.g.*, some cluster representatives exhibit

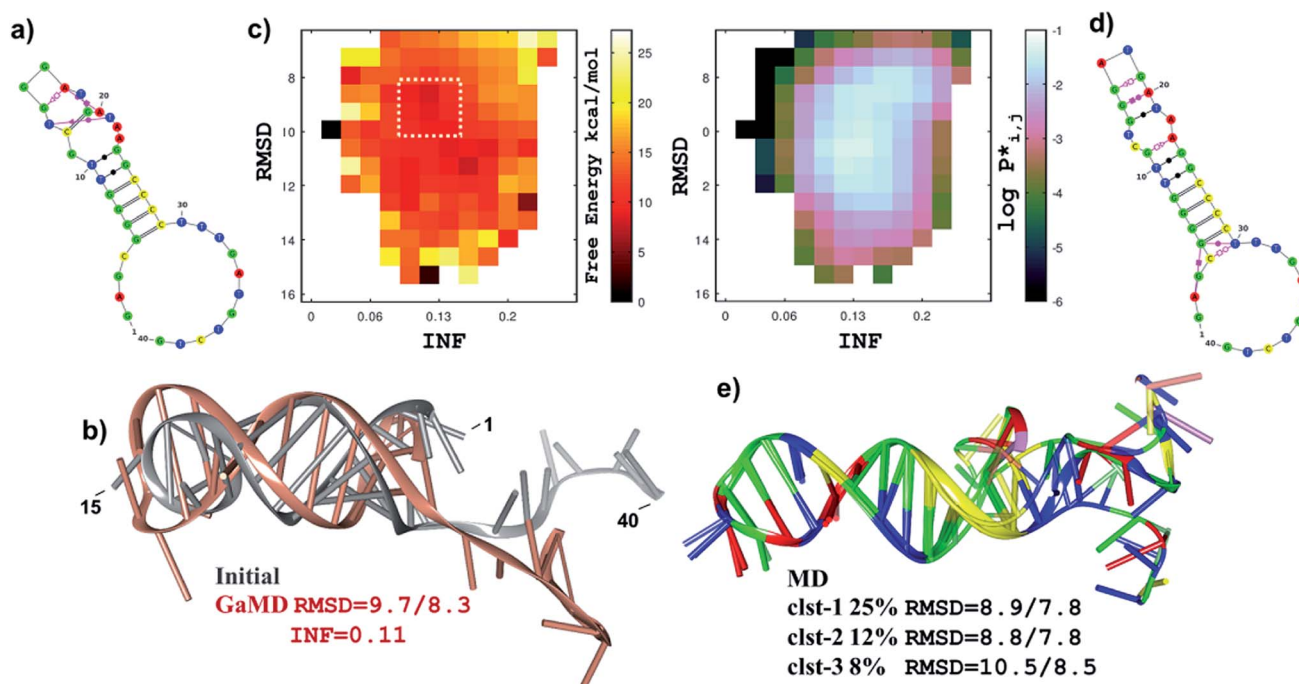


Fig. 5 The most stable model for PSAG-1. (a) Secondary structure of the initial **A1** model for PSAG-1. Base pairing is represented using the Leontis–Westhof graphical conventions. (b) Ribbons representation of the superposition of the initial **A1** model and the selected GaMD snapshot. RMSD data (in Å; considering CNOPS atoms in residues 3–38/5–30) between the two structures and the INF value of the GaMD structure are also indicated. (c) Free-energy (left) and logarithm of the GaMD population (right) maps in terms of the RMSD (residues 3–38) and INF structural indexes. The dashed line encloses the free energy basin with significant population from which the GaMD snapshot shown in (b) was selected. (d) Secondary structure of the refined **A1** model obtained from the major cluster representative. (e) Superposition of the cluster representatives of the three most populated clusters derived from the equilibrium MD simulation. Percentage population and RMSD values with respect to the initial **A1** structure are also given.



a non-pairing stack involving residues 28–38). However, the non-canonical base pairings at the non-loop helical part (*i.e.*, A2–G5, G5–T30) observed in the major cluster representative are lacking in the other ones. As a matter of fact, the 5'- and the 3'-ends of the A1 model are flexible during the MD trajectory as also revealed by the clustering analysis.

As above mentioned, the A2 and A3 models of the PSAG-1 aptamer were subjected to the same GaMD/MD protocol (ESI, Fig. S9 and S10†). Their initial secondary structures contained also a hairpin-loop together with helical arrangements, but involving fewer base pairs than in A1. The GaMD/MD simulations led to wider conformational changes so that the MD-equilibrated models exhibit smaller structural elements and less compact structures than those of A1. More importantly, the average MM-PBSA energies point out that the folding of A2 and A3 are less stable by  $\sim 20/35$  and  $\sim 33/48$  kcal mol<sup>-1</sup>, respectively, (the values depend on the solute dielectric constant; see ESI, Table 1†). Such MM-PBSA energy differences, which are well above their statistical uncertainties, support A1 as the most likely computational model of the PSAG-1 aptamer.

Clearly, the major and minor grooves on the molecular surface of the stable hairpin-loop and helical stem regions in the refined A1 model could accommodate selective binding sites for the hPSA glycoprotein. Therefore, we hypothesized that a truncated PSAG-1 aptamer lacking the 3'-terminal segment would form specific non-covalent complexes resembling those of the 40-residue PSAG-1. To examine the structure and stability of such truncated aptamer (T-PSAG-1), we run a conventional MD simulation of the T-A1 system, which was built by removing the last 8-residues of the major A1 cluster representative. The 2.5  $\mu$ s simulation confirmed that the hairpin-loop and the helical packing in T-A1 are indeed stable (Fig. 6).

With respect to A1, the T-A1 secondary structure exhibits the same pattern of base pair contacts in the stem part although a few changes occur at the tip of the hairpin loop (*i.e.*, the G14–T21/G15–A20/G16–G19 contacts in A1 are replaced by T13–T21 and G15–G19 in T-A1). Thus, the hairpin loop may be more sensitive to environment effects while the surface grooves over the helical stem would be more rigid. Anyway, the overall RMSD (2.8 Å) in the positioning of residues 3–30 between the A1 and T-A1 major cluster representatives is moderate. Therefore, the present simulations support the hypothesis that both the 40- and 32-residue aptamers could give similar complexes.

### Truncation studies

To validate the modelling proposal for aptamer truncation, we removed 8 nucleotides from the 3'-end of PSAG-1, synthesizing the T-PSAG-1. We found that this 32-mer aptamer is sufficient to effectively recognize hPSA, with slightly lower affinity and similar selectivity to PSAG-1. In stark contrast with these results, when some of the bases involved in the stem are removed, just keeping the first 26 nucleotides from the 5'-end of PSAG-1, the binding to hPSA is completely lost, confirming that the stem part of the structure made a crucial contribution to the interaction.

The binding curve of T-PSAG-1 toward hPSA on SPAuEs in PBS–Na, expressed as percentage of the saturation signal, was

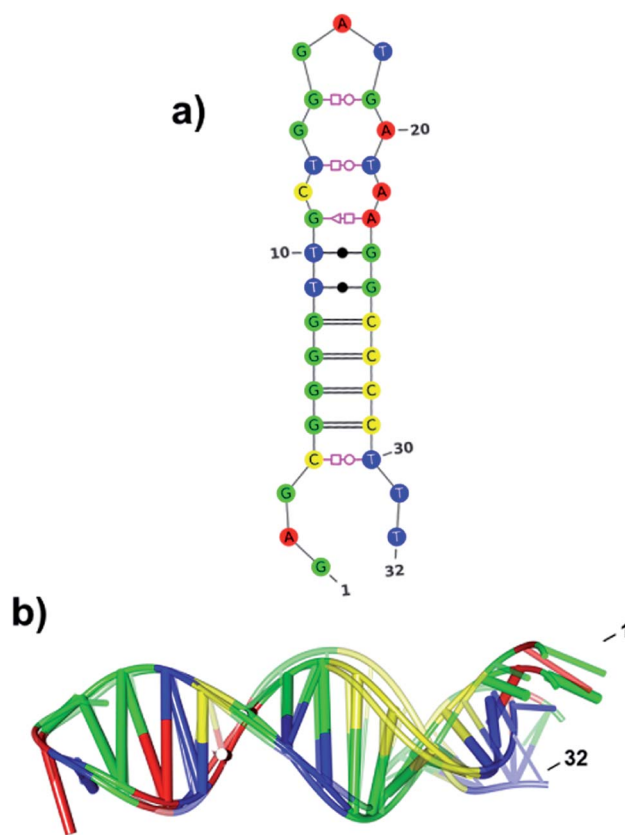


Fig. 6 Model of the truncated aptamer. (a) Secondary structure of the T-A1 model for the T-PSAG-1 aptamer obtained from the major cluster representative. (b) Superposition of the cluster representatives of the three most-populated clusters derived from the MD simulation.

fitted to the Langmuir equation, resulting a dissociation constant of  $121 \pm 25$  nM (Fig. 7a). This value is less than twice the value obtained for PSAG-1, demonstrating that the reduced sequence maintains high-affinity binding to the glycosylated protein.

To study the selectivity of the truncated aptamer, a 500 nM solution of T-PSAG-1 was challenged against immobilized rPSA and NGAL in PBS–Na. Expressing the response as current percentage with respect to that obtained for the interaction with hPSA (Fig. 7b) we obtained values of  $19 \pm 6\%$  and  $23 \pm 3\%$  for rPSA and NGAL, respectively, statistically equal to the response displayed by the parent aptamer, PSAG-1.

### Docking of T-PSAG-1 into hPSA

To gain insight into the binding mode between T-PSAG-1 and hPSA, we carried out first Autodock calculations, in which the hPSA protein glycosylated at Asn<sub>61</sub> is treated as the fixed receptor and the T-PSAG-1 aptamer as the rigid ligand. A total of 500 docking poses were produced and grouped into 35 clusters. In the majority of the cluster representatives (ESI, Table 2 and Fig. S11†), the aptamer is anchored simultaneously by protein and glycan residues whereas, in other structures, it contacts only protein atoms located in distant regions from the sugars. As the rigid docking of the large T-A1 aptamer molecule may



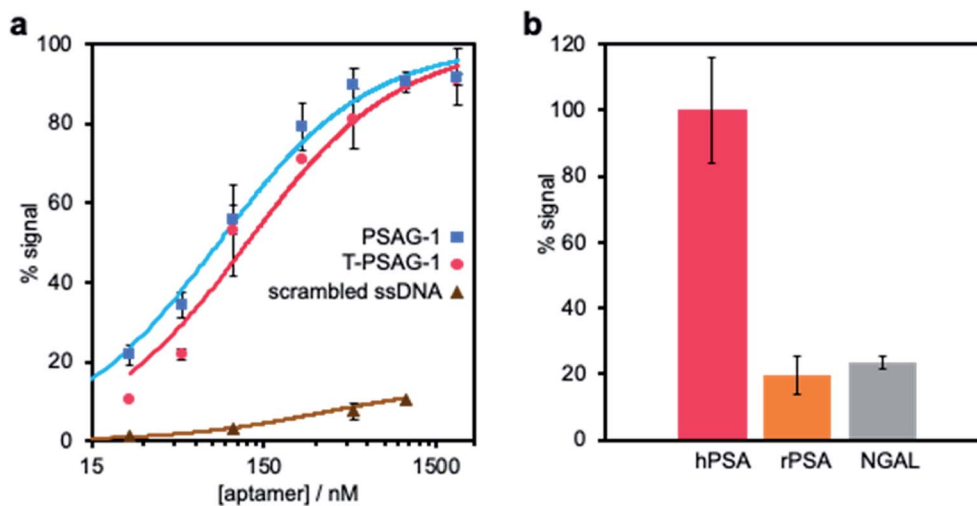


Fig. 7 Characterization of truncated aptamer (T-PSAG-1). (a) Affinity study of the truncated 32-mer aptamer (T-PSAG-1). The binding of increasing concentrations of T-PSAG-1 to hPSA covalently bound to SPAuEs, was performed using the binding assay presented in Fig. 3a in a PBS–Na buffer. The curve was fitted to the Langmuir model, resulting in a  $K_d = 121 \pm 25$  nM, which is 1.7 times higher than the complete aptamer (PSAG-1), shown for comparison. In contrast, a scrambled sequence used as control does not give a significant binding. (b) Selectivity of T-PSAG-1. The binding assay was repeated immobilizing other proteins (rPSA and NGAL), and the response is expressed as percentage of signal with respect to that obtained for the binding to hPSA.

result in sporadic bad contacts, we partially relaxed the cluster representatives by means of MM energy minimizations. The relaxed structures were finally ranked in terms of the Autodock scoring function that estimates several binding free energy contributions (electrostatics, van der Waals (vdW), and H-bond interactions, as well as desolvation). The resulting  $\Delta_{\text{bind}}G$  values for the 35 clusters range from  $-15.8$  to  $-6.9$  kcal mol $^{-1}$  (ESI, Table 2 $\dagger$ ).

In the most favorable docked complex, which has a  $\Delta_{\text{bind}}G$  scoring 2.0 kcal mol $^{-1}$  below the second one, the aptamer aligns almost perpendicularly to the hPSA active site groove and gives favorable contacts with the hPSA protein and the glycan moieties. On one hand, the Arg $_{95G}$ , Asn $_{95F}$ , and Lys $_{95E}$  side chains in the kallikrein loop (3QUM numbering for the protein residues) give H-bonds/salt-bridges with backbone phosphate groups. On the other one, the polar groups in NAG1, MAN3, NAG5' and GAL6' form H-bond contacts with several phosphate backbone groups located in the major groove around the helical T-A1 stem, in which the relevant fucose unit is placed in a central position.

### Molecular dynamics of the hPSA/T-PSAG-1 complex

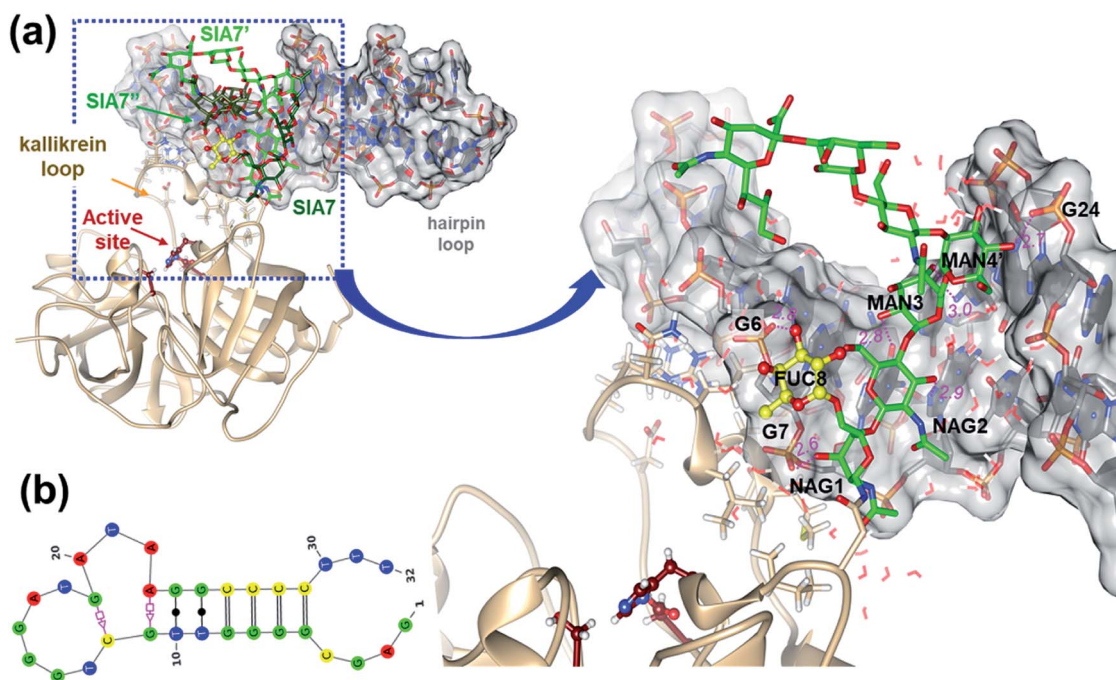
To refine the aptamer binding mode predicted by the docking calculations, as well as to incorporate the role of explicit solvent and thermal fluctuations, we performed a conventional MD simulation (2.5  $\mu$ s) starting from the best docked complex (ESI, Scheme S2 $\dagger$ ), in which the protein and the glycan chains retain essentially the 3D structure observed in the solid state. As expected, the aqueous environment induces some structural rearrangements. Thus, the time evolution of the RMSD values, molecular surface, and the MM–PBSA energies (ESI, Fig. S12 $\dagger$ ) exhibit pronounced drifts and/or wide oscillations during the

first  $\mu$ s, which signal thus the “search phase” of the simulation. Subsequently, these and other descriptors keep fluctuating around stable mean values during the last half of the trajectory, which was considered then as the “fully-relaxed” phase.

During the simulation, the overall protein structure remains quite stable, the largest RMSD values arising at several loop regions including the large kallikrein loop. In contrast, the relative orientation and internal conformation of the glycan chains is largely altered (ESI, Fig. S12 and S13 $\dagger$ ). Compared to the X-ray structure, the antennas adopt a more compact shape favoring their interaction with the aptamer and the protein. Clustering analysis performed for the carbon atoms in the sugar units results in three highly populated clusters (53%, 19%, and 11%). In these clusters, the NAG5''–GAL6''–SIA7'' antenna approaches the protein surface in the region around the glycosylated Asn $_{61}$ , with the SIA7'' carboxylate group presenting a fluctuating interaction with the Arg $_{36}$  side chain (maximum occupancy of 16%). The other two sugar antennas, which mainly point towards the bulk solvent, interact with each other (e.g., NAG5'@N2H...O2N@NAG5, NAG5@O6H...O4@GAL6'; ESI, Table 3 and Fig. S14 $\dagger$ ). Interestingly, the helical stacked stem of the T-PSAG-1 aptamer remains essentially unaltered (Fig. 8b) and is involved in the majority of hPSA...aptamer contacts. Some plasticity is observed in the hairpin loop region, in which non-canonical base pair contacts are being formed/broken along the simulation.

The MD simulation reveals that the T-PSAG-1 aptamer binds to the hPSA protein through highly persistent contacts (Fig. 8). In the initial structure, the kallikrein-loop Lys $_{95E}$  and Arg $_{95G}$  residues interact with the aptamer phosphate groups (Arg $_{95G}$ ...C4, Arg $_{95G}$ ...G5, and Lys $_{95E}$ ...T32), but their side chains approach the C4 and G5 bases during the simulation (ESI, Table 4 $\dagger$ ). In addition, a new salt bridge is formed between Arg $_{95J}$  and





**Fig. 8** hPSA/T-PSAG-1 MD simulation (a) Ribbon and stick representations of the hPSA glycoprotein in complex with T-PSAG-1. The structure shown corresponds to a cluster representative from the hPSA/T-PSAG-1 MD trajectory. The sugar residues and specific protein residues (numbered as in the 3QUM crystal structure)<sup>22</sup> are shown in stick models. The T-PSAG-1 aptamer is shown in stick representation with filled nucleobases and enclosed by its transparent molecular surface. For the sake of clarity, the coordinates of the  $\alpha$ 1,6- $\beta$ 1,2 and  $\alpha$ 1,6- $\beta$ 1,6 sugar antennas are removed in the enlarged view. MD-averaged interatomic distances between heavy atoms for selected contacts are indicated in Å. (b) Secondary structure of the complexed T-PSAG-1 aptamer obtained from the same cluster representative.

the T31 phosphate group. Other residues in the kallikrein loop like Asp<sub>95</sub>, Met<sub>95A</sub>, Leu<sub>95D</sub>, and Asn<sub>95F</sub> also contribute to the binding of the aptamer through water-mediated polar contacts and/or vdW interactions (ESI, Tables 4 and 5<sup>†</sup>). On the other hand, T-PSAG-1 is firmly anchored to the first portion of the glycan moiety (*i.e.* Asn<sub>61</sub> ~ NAG1-NAG2-MAN3-MAN4(MAN4')) thanks to highly stable H-bonds and vdW contacts. Among the polar contacts, the sugar alcohol groups interact with both phosphate/polar groups defining the major groove in the stem region (NAG1@O3H...OP2@G7, MAN4'@O4H...OP2@G24; NAG2@O3H...N7@G8, MAN3@O2H...O6@G7, MAN3@O4...HN4@C26). More particularly, the fucose ring gives a stable H-bond (FUC8@O3H...OP2@G6) and vdW interaction with the sugar ring of G6.

Clearly, the computational hPSA/T-PSAG-1 model presents a binary recognition pattern involving many protein and glycan residues, what is well in consonance with the experimental observations. Furthermore, the molecular contacts unveiled by the simulations (Fig. 8) are in reasonable agreement with the observed effects on the PSAG-1 binding associated with the gradual removal of sugars in hPSA (Fig. 4). Thus, the computational model and the truncation experiments show that all the sugars excepting SIA can be important for the binding of the aptamer. In this respect, the structure and dynamics of the hPSA/T-PSAG-1 complex along the cMD simulation suggest that the relevant glycan residues can promote aptamer binding in two complementary ways. On one hand, the inner sugars up to MAN4 and including FUC8 play a direct role by giving close

polar and vdW contacts with T-PSAG-1. On the other hand, although the outer NAG5 and GAL6 sugars do not interact with T-PSAG-1, the inter-antennas NAG5...NAG5' and NAG5...GAL6' contacts may contribute to stabilize the glycan conformations more favorable for aptamer binding.

## Conclusions

We have demonstrated, for the first time, a generalizable approach for tweaking the selection of aptamers to achieve the binary recognition of glycoproteins, thus enhancing the selectivity of the identified synthetic receptors. A key innovation is to use a natural lectin, which recognizes core-fucosylation on glycoproteins, to selectively elute during the successive rounds of selection sequences that are displaced by the lectin, and therefore recognize the innermost sugar residues and the peptide region surrounding the glycosylation site, whereas excluding sequences that are bound to the protein by a different region. By exploiting this approach, we have developed an aptamer (PSAG-1) that allows selective recognition of the glycan structure in hPSA, discriminating this glycoprotein from a non-glycosylated form, rPSA. Moreover, PSAG-1 is not just a glycan-binder but it also recognizes the peptide region surrounding the glycosylation site as it is able to discriminate hPSA from other core-fucosylated proteins with a very similar glycan structure, such as NGAL, and AFP. Interestingly, we note that PSAG-1 may provide a means of detecting core-fucosylation because the inability of the aptamer to recognize ovoalbumin,



a glycoprotein where fucose core is not present, and the competitive displacement by free fucose. In addition, PSAG-1 aptamer shows at least one order of magnitude better affinity toward the glycoprotein than the natural lectins, even 43 times higher than the affinity of the PhoSL lectin employed during selection.

To provide a structural basis for the PSAG-1 mode of action, it is necessary to obtain a reliable 3D model of the aptamer. Besides taking advantage of mfold and available methods for ssRNA structural prediction as formerly proposed, we have shown that extensive MD simulations using both enhanced-sampling and conventional algorithms are required to generate well-relaxed aptamers and to better discriminate between alternative folding models. For PSAG-1 the best model exhibits well-defined structural elements (one hairpin loop and two base-paired helical segments) as well as an extended and flexible chain at the 3'-terminus, which would play only a minor role in binding. This assumption has been experimentally confirmed because the truncated T-PSAG-1 retains a high affinity toward hPSA and a similar selectivity to that of PSAG-1. These and the former binding studies are complemented by the computational docking between a T-PSAG-1 model and the 3QUM protein structure followed by the 2.5  $\mu$ s MD simulation of the most favoured complex in explicit solvent. The structural and dynamic properties of the glycoprotein/aptamer complex provide a useful framework for analysing the role of the sugars and amino acids in selective binding. Thus, the aptamer binds simultaneously to the kallikrein protein loop and to several glycan residues located at the inner-most part of the triantennary glycan (also present in biantennary glycans), the fucose core being also involved in the binding to the aptamer stem.

This strategy for obtaining binary receptors is not restricted to core-fucose monoglycosylated proteins. We envision the use of other specific lectins to direct the selection toward different aberrant alterations in the sugar chain associated with tumor growth. Overall, these results provide a basis for the development of multiple applications of this or other aptamers able to recognize glycoproteins by the glycosylation site, including the development of sensing strategies to exploit the alteration of protein glycoforms that may occur with cancer development for improving biomarker performance.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgements

We thank the Biomedical and Biotechnological core facilities of University of Oviedo. We also thank Prof. R. de Llorens (UDG) for his kind donation of PhoSL lectin. We acknowledge the financial support by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (CTQ2015-63567-R) and Ministerio de Ciencia y Universidades (RTI2018-095756-B-I00), as well as Principado de Asturias Government (IDI2018-000217 and IDI2018-000177), co-financed by FEDER funds. A. D. F. was supported by Asociación Española contra el Cáncer (AECC) with a PhD fellowship.

## References

- 1 A. A. Friedman, A. Letai, D. E. Fisher and K. T. Flaherty, *Nat. Rev. Cancer*, 2015, **15**, 747–756.
- 2 C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova and G. J. Gatto, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 7342–7372.
- 3 T. Hitosugi and J. Chen, *Oncogene*, 2014, **33**, 4279–4285.
- 4 S. S. Pinho and C. A. Reis, *Nat. Rev. Cancer*, 2015, **15**, 540–555.
- 5 P. M. Drake, W. Cho, B. Li, A. Prakobphol, E. Johansen, N. L. Anderson, F. E. Regnier, B. W. Gibson and S. J. Fisher, *Clin. Chem.*, 2010, **56**, 223–236.
- 6 U. Kuzmanoy, H. Kosanam and E. P. Diamandis, *BMC Med.*, 2013, **11**, 31.
- 7 N. Leymarie and J. Zaia, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 3040–3048.
- 8 R. Mnatsakanyan, G. Shema, M. Basik, G. Batist, C. H. Borchers, A. Sickmann and R. P. Zahedi, *Expert Rev. Proteomics*, 2018, **15**, 515–535.
- 9 H. Kekki, M. Peltola, S. van Vliet, C. Bangma, Y. van Kooyk and K. Pettersson, *Clin. Biochem.*, 2017, **50**, 54–61.
- 10 J. Wu, J. Zhu, H. Yin, R. J. Buckanovich and D. M. Lubman, *J. Proteome Res.*, 2014, **13**, 2197–2204.
- 11 D. Li, H. Chiu, J. Chen, H. Zhang and D. W. Chan, *Clin. Chem.*, 2013, **59**, 315–324.
- 12 P. Jolly, P. Damborsky, N. Madaboosi, R. R. Soares, V. Chu, J. P. Conde, J. Katrlík and P. Estrela, *Biosens. Bioelectron.*, 2016, **79**, 313–319.
- 13 B. Belardi, A. de la Zerda, D. R. Spiciarich, S. L. Maund, D. M. Peehl and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 14045–14049.
- 14 P. V. Robinson, G. de Almeida-Escobedo, A. E. de Groot, J. L. McKechnie and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 10452–10455.
- 15 J. Li, S. Liu, L. Sun, W. Li, S. Y. Zhang, S. Yang, J. Li and H. H. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 16589–16595.
- 16 Y. Liu, L. Liu, S. Li, G. Wang, H. Ju and L. Ding, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 6027–6034.
- 17 (a) C. M. Rose, M. J. Hayes, G. R. Stettler, S. F. Hickey, T. M. Axelrod, N. P. Giustini and S. W. Suljak, *Analyst*, 2010, **135**, 2945–2951; (b) I. M. Ferreira, C. M. de Souza Lacerda, L. Santana de Faria, C. Rodrigues Corrêa and A. Silva Ribeiro de Andrade, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, **174**, 2548–2556; (c) C. S. M. Ferreira, M. C. Cheung, S. Missailidis, S. Bisland and J. Gariépy, *Nucleic Acids Res.*, 2009, **37**, 866–876.
- 18 M. Y. Li, N. Lin, Z. Huang, L. Du, C. Altier, H. Fang and B. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 12636–12638.
- 19 (a) Y. Ma, X. Li, W. Li and Z. Liu, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, **10**, 40918–40926; (b) X. Li, Y. He, Y. Ma, Z. Bie, B. Liu and Z. Liu, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 9805–9812; (c) H. Nie, Y. Chen, C. Lü and Z. Liu, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 8277–8283.
- 20 A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, E. Fernández-Rodríguez and M. J. Lobo-Castañón, *Biosens. Bioelectron.*, 2019, **128**, 83–90.
- 21 Y. Manabe, R. Marchetti, Y. Takakura, M. Nagasaki, W. Nihei, T. Takebe, K. Tanaka, K. Kabayama, F. Chiodo,



- S. Hanashima, Y. Kamada, E. Miyoshi, H. P. Dulal, Y. Yamaguchi, K. Adachi, N. Ohno, H. Tanaka, A. Silipo, K. Fukase and A. Molinaro, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2019, **58**, 18697–18702.
- 22 E. A. Stura, B. H. Muller, M. Bossus, S. Michel, C. Jolivet-Reynaud and F. Ducancel, *J. Mol. Biol.*, 2011, **414**, 530–544.
- 23 S. Gilgunn, P. J. Conroy, R. Saldova, P. M. Rudd and R. J. O’Kennedy, *Nat. Rev. Neurol.*, 2013, **10**, 99–107.
- 24 J. Tkac, V. Gajdosova, S. Hroncekova, T. Bertok, M. Hires, E. Jane, L. Lorencova and P. Kasak, *Interface Focus*, 2019, **9**, 20180077.
- 25 N. Leymarie, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics*, 2013, **12**, 2935–2951.
- 26 J. Munkley, I. G. Mills and D. J. Elliott, *Nat. Rev. Neurol.*, 2016, **13**, 324–333.
- 27 Y. Kobayashi, H. Tateno, H. Dohra, K. Moriwaki, E. Miyo-Shi, J. Hirabayashi and H. Kawagishi, *J. Biol. Chem.*, 2012, **287**, 33973–33982.
- 28 M. Zuker, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 3406–3415.
- 29 A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart and M. E. Etzler, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.Y., 2008.
- 30 A. S. do Nascimento, S. Serna, A. Beloqui, A. Arda, A. H. Sampaio, J. Walcher, D. Ott, C. Unverzagt, N. C. Reichardt, J. Jimenez-Barbero, K. S. Nascimento, A. Imberty, B. S. Cavada and A. Varrot, *Glycobiology*, 2015, **25**, 607–616.
- 31 M. Thaysen-Andersen, S. Mysling and P. Hojrup, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 3933–3943.
- 32 Y. Satomi, Y. Shimonishi, T. Hase and T. Takao, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, **18**, 2983–2988.
- 33 A. Cabanettes, L. Perkams, C. Spies, C. Unverzagt and A. Varrot, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2018, **57**, 10178–10181.
- 34 I. Jeddi and L. Saiz, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1178.





## **Impedimetric Aptamer-based Glycan PSA Score for Discrimination of Prostate Cancer from other Prostate Diseases**

Ana Díaz-Fernández<sup>1,2</sup>, Rebeca Miranda-Castro<sup>1,2</sup>, Noemí de-los-Santos-Álvarez<sup>1,2</sup>,  
María Jesús Lobo-Castañón<sup>1,2\*</sup> and Pedro Estrela<sup>3,4\*</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo, Av. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Avenida de Roma, 33011 Oviedo, Spain.

<sup>3</sup> Centre for Biosensors, Bioelectronics and Biodevices (C3Bio), University of Bath, BA2 7AY, Bath, United Kingdom.

<sup>4</sup> Department of Electronic and Electrical Engineering, University of Bath, BA2 7AY, Bath, United Kingdom.

\* Corresponding author:

MJLC: [mjlc@uniovi.es](mailto:mjlc@uniovi.es)

PE: [p.estrela@bath.ac.uk](mailto:p.estrela@bath.ac.uk)

## **Abstract**

Prostate specific antigen (PSA) is the common biomarker for prostate cancer (PCa). However, its lack of specificity to differentiate PCa from benign prostate disorders stimulates the search for alternative cancer biomarkers to improve the clinical management of the patients. Different studies have described changes in the core-fucosylation level of PSA between PCa patients and healthy controls. To exploit these findings, we have adapted an impedimetric aptamer-based sensor to the dual recognition of PSA. Two different aptamers, PSAG-1 and anti-PSA, are immobilized onto two adjacent nanostructured gold electrodes. The direct binding from diluted serum samples of specific glycosylated-PSA to the first sensor and total PSA to the second one leads to changes in the charge transfer resistance, which correlate to the amount of glycosylated and total PSA in the sample. The sensors are able to measure PSA in serum with a dynamic range between 0.26 and 62.5 ng/mL (PSAG-1) and from 0.64 to 62.5 ng/mL (anti-PSA), with a reproducibility of 5.4 %. The final output of the proposed platform is the ratio between PSAG-1 reactive PSA and total PSA, defined as the glycan score. The glycan score was tested in serum samples from patients with different pathologies, showing excellent correlation between the measured score and the known diagnosis of the patients. Hence this dual aptamer-based impedimetric biosensor could be used as a minimally invasive method (e.g. through a finger prick) for the diagnosis of prostate cancer.

**Keywords:** Aptasensor; Glycosylation pattern; Impedimetric sensor; Prostate cancer; PSA

## **1. Introduction**

Prostate cancer (PCa), the most common solid tumor in men (Butler et al., 2020), is usually suspected on the basis of a digital rectal exam and elevated serum prostate-specific antigen (PSA) levels. However, PSA is an organ specific but not cancer-specific biomarker. In consequence, serum PSA test has limited diagnostic value, with a high false positive rate as confirmed after histopathological verification of prostate biopsy (Schröder et al., 2009). This leads to many unnecessary repeated prostate biopsies, with the associated risks and overtreatment of clinically insignificant cancers (Lomas and Ahmed, 2020; Macefield et al., 2010). Therefore, significant effort has been focused on the development of new methods able to improve the diagnostic performance of PCa, especially for patients with serum PSA levels in the range 4-10 ng/mL, the ambiguous area called the diagnostic grey zone (Saini, 2016).

Besides PSA, the US Food and Drug Administration (FDA) has recently approved a few new tests such as the prostate health index, which combines the detection of different molecular forms of PSA in serum (Catalona et al., 2011) and PCA3 score, a ratio between the concentration of prostate cancer gene 3 (PCA3) and PSA mRNA molecules in first-catch urine after a post-digital rectal exam (Jung et al., 2004). Many other biomarkers remain at the investigation or validation phase (Saini, 2016). Among them are altered PSA glycosylation patterns, which are potentially useful in the development of more reliable diagnostic tools for PCa (Gilgunn et al., 2013).

Glycosylation is a post-translational modification that has been shown to play important roles in development and progression of cancer. There are numerous studies linking changes in the glycan composition of PSA to malignant transformation and prostate tumor progression (Munkley et al., 2016). PSA contains N-glycans attached to

the amine nitrogen of asparagine 69 (Asn<sub>69</sub>). These are sugars extremely structurally diverse, but all contain a saccharide core with a N-acetylglucosamine (GlcNAc) directly linked to the Asn<sub>69</sub>. Fucosylation of this GlcNAc in the core of the N-glycans (core-fucosylation) is significantly altered in patients with PCa (Peracaula et al., 2003; Song et al., 2015). Despite this, the study of specific glycoforms of PSA has lagged behind because there is still no single test for measuring the percentage of PSA with tumor-specific glycan moieties. This information is typically obtained by combining an ELISA for measuring total or free PSA and lectin immunosorbent assays for detecting specific glycosylated forms of PSA (Jolly et al., 2016; Li et al., 2015; Llop et al., 2016; Pihíková et al., 2016a, 2016b; Xia et al., 2017).

In response to the need for improved tests for PCa diagnosis, we have recently developed an aptamer (PSAG-1) targeting the glycosylation site of PSA (Díaz-Fernández et al., 2020). There are other RNA (Jeong et al., 2010; Svobodova et al., 2013) and DNA-aptamers (Díaz-Fernández et al., 2019; Li et al., 2018; Park et al., 2016; Savory et al., 2010) recognizing PSA, but PSAG-1 is the only one that achieves the binary recognition of this glycoprotein through both the peptide region and the innermost sugar residues, in the core region of the protein. Given the above attributes, we were motivated to include this aptamer in an impedimetric label-free aptasensor (Jolly et al., 2017) for the sensitive measurement of a specific fraction of PSA in serum samples. When compared with other aptamer-based sensors (Akiba and Anzai, 2016; Damborska et al., 2017; Daniel et al., 2013; Ghorbani et al., 2019; Negahdary et al., 2020), this is a simple approach where the target-recognizing aptamer is immobilized by one end to a nanostructured gold electrode. The direct binding of the protein alters the charge-transfer resistance when the sensor is electrochemically interrogated in the presence of a redox probe. Using this approach, we describe here a platform for the

convenient measurement of an empirical index, a glycan score, in serum samples. The platform uses a dual receptor approach, combining two different aptamers: anti-PSA (Savory et al., 2010) recognizing total PSA and PSAG-1 (Díaz-Fernández et al., 2020) that binds to core-fucosylated PSA. The percentage of PSAG-1 reactive PSA is shown to be a more accurate index than total PSA for the diagnosis of PCa.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Materials*

The DNA aptamers anti-PSA: AATTAAAGCTCGCCATCAAATAGCTTT and PSAG-1: GAGCGGGGTTGCTGGGATGATAAGGCCCTTTGATGTCTG were obtained from Metabion (Germany) as lyophilized powder after HPLC purification. Both aptamers were synthesized with a thiol group at the 5' end and a spacer of six carbons and five thymine bases. PSA Certified Reference Material BCR®-613 and albumin from human serum were purchased from Sigma-Aldrich (Spain and UK). Recombinant Human PSA (ab126692) from *Escherichia coli* and Recombinant Human Lipocalin-2, NGAL, from HEK 293 cells (ab167728) were obtained from Abcam (UK). 11-Amino-1-undecanethiol hydrochloride, phosphate buffer saline (PBS) tablets, phosphate buffer and potassium chloride were purchased from Sigma-Aldrich (Spain and UK) as molecular biology grade reagents. 6-Mercapto-1-hexanol (MCH), gold nanoparticles (20 nm diameter, stabilized), potassium hexacyanoferrate (III), potassium hexacyanoferrate (II), hydrogen peroxide 30%, ammonium hydroxide 20% and acetone were also supplied by Sigma-Aldrich (Spain and UK). Absolute ethanol was purchased from VWR (Spain). Sulfuric acid (95-98 %) was supplied by J.T. Baker (Fisher Scientifics, Spain). Microscope slides with round edges were obtained from VWR (UK). All aqueous solutions were prepared using ultra-pure water from a MilliQ system (Millipore).

## 2.2 PSA serum samples

Serum samples from twelve men as well as a pool of women serum samples were provided by the clinical analysis laboratory at Hospital de Cabueñes (Gijón, Spain). Male serum samples were obtained from patients with elevated PSA levels ( $> 4$  ng/mL), with a final diagnosis confirmed by prostate biopsies. The female serum sample was used as PSA negative control.

## 2.3 Instruments

Electrochemical measurements were performed in a  $\mu$ Autolab III/FRA2 and Autolab Pgstat-12 with FRA2 module for impedance measurements connected to a computer with NOVA 2.1 software (Metrohm, The Netherlands). For all the electrochemical measurements an external Ag|AgCl reference and Pt counter electrodes were used. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements were performed in a solution of 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  and 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  in  $1\times$  PBS at 0.22 V vs. Ag|AgCl, the formal potential of the redox couple as measured by cyclic voltammetry. The frequency was varied in the range from 100 kHz to 100 mHz with an amplitude of 0.01 V.

Surface plasmon resonance (SPR) measurements were carried out using an Autolab ESPRIT SPR instrument (Metrohm, The Netherlands) equipped with a two-channel cuvette and an autosampler, which is controlled by Data Acquisition Software (version 4.4). The temperature of the cell was controlled with a thermostat HaakeD1 (Germany). The SPR gold sensors were obtained from XanTec bioanalytics (Germany).

## 2.4 SPR measurements

SPR gold chips were cleaned with piranha solution (70 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ + 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) for 2 min and then washed with water and ethanol and dried with nitrogen. A mixed self-

assembled monolayer of the thiolated aptamer and MCH was formed onto the surface of the chip. The surface was incubated at 4 °C overnight with a mixture of aptamer and MCH in a 1:100 ratio, with a total thiol concentration of 100 μM in PBS. Then the surface was cleaned with PBS and dried with nitrogen before placing it onto a clean hemi-cylinder prism, previously coated with a drop of immersion oil. Finally, the surface was blocked with 50 μL of 1 mM MCH in PBS for 1 hour at 25 °C.

To measure the binding of PSA to the surface, baselines in both channels were acquired by triplicate injections of PBS buffer for 5 min each. Then the association step was performed adding increasing concentrations of PSA in one channel and buffer or NGAL in the reference channel for 10 min. After washing the surface with PBS, the dissociation step was registered for 10 min to eliminate the unspecifically bound molecules and a stable signal was obtained. The difference between the signal after the dissociation step and the baseline before the interaction is related to the binding of the protein to the aptamer after subtraction of both the buffer and the non-specific signal measured in the reference channel. After that, a new cycle was performed with the next PSA concentration without regeneration. All the injections and signals registered were performed automatically by the ESPRIT autosampler and sequencer. During each injection the solution was continuously stirred, and all the interactions were thermostated at  $25 \pm 1$  °C.

### *2.5 Fabrication of evaporated gold electrodes.*

The working gold electrodes were prepared in-house by thermal evaporation on glass slides. The slides were first cleaned by immersion in a solution of H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5:1:1 for 30 minutes. Then they were rinsed sequentially with acetone, isopropanol and water and dried with nitrogen. Finally, they were cleaned with oxygen plasma (Diener

Plasma Chamber with Oxygen, Zepto, Germany) at a pressure of 0.2 mbar and a voltage of 10 mV for 10 minutes.

Chrome and gold pieces with a size of 1-3 mm were cleaned with acetone and isopropanol before thermal evaporation and deposition on a glass slide with a mask to define the shape of the working electrode (a circle with 4 mm of diameter). An adhesion layer of 10 nm chromium and 100 nm of gold were subsequently evaporated using a BOC Edwards (USA) thermal evaporator. Evaporated gold electrodes were cleaned prior to their use with acetone vapour for 4-5 times and with UV-ozone for 15 min.

### *2.6 Aptasensor fabrication*

The impedimetric sensors were fabricated using a previously established approach (Jolly et al., 2017), schematically shown in [Figure 1A](#). First the gold electrodes were nanostructured with gold-nanoparticles (AuNPs). With this aim, a self-assembled monolayer (SAM) of 11-amino-1-undecanethiol was formed by overnight incubation at 4 °C of the evaporated gold electrodes in 50  $\mu$ L of 1 mM 11-amino-1-undecanethiol in pure ethanol. Following this, the electrode surface was rinsed with ethanol and dried with nitrogen. Then the surface was blocked with 1 mM MCH in ethanol for 1 hour at RT. Next, the electrodes were washed with ethanol and water and dried with nitrogen. Thereafter they were incubated overnight at RT with 50  $\mu$ L of 20 nm AuNPs solution. Onto the new gold surface, a second mixed SAM was formed by incubation with a solution 1:100 of the thiolated aptamer (anti-PSA or PSAG-1) and MCH in PBS buffer (PBS 1  $\times$  + 2.7 mM KCl, pH 7.4) for 2 hours at RT. The total concentration of thiols in the solution was 100  $\mu$ M. Then the electrodes were rinsed with PBS buffer and incubated with this buffer for 3 hours to stabilize the SAM prior to the EIS measurements.



### 2.7 PSA detection

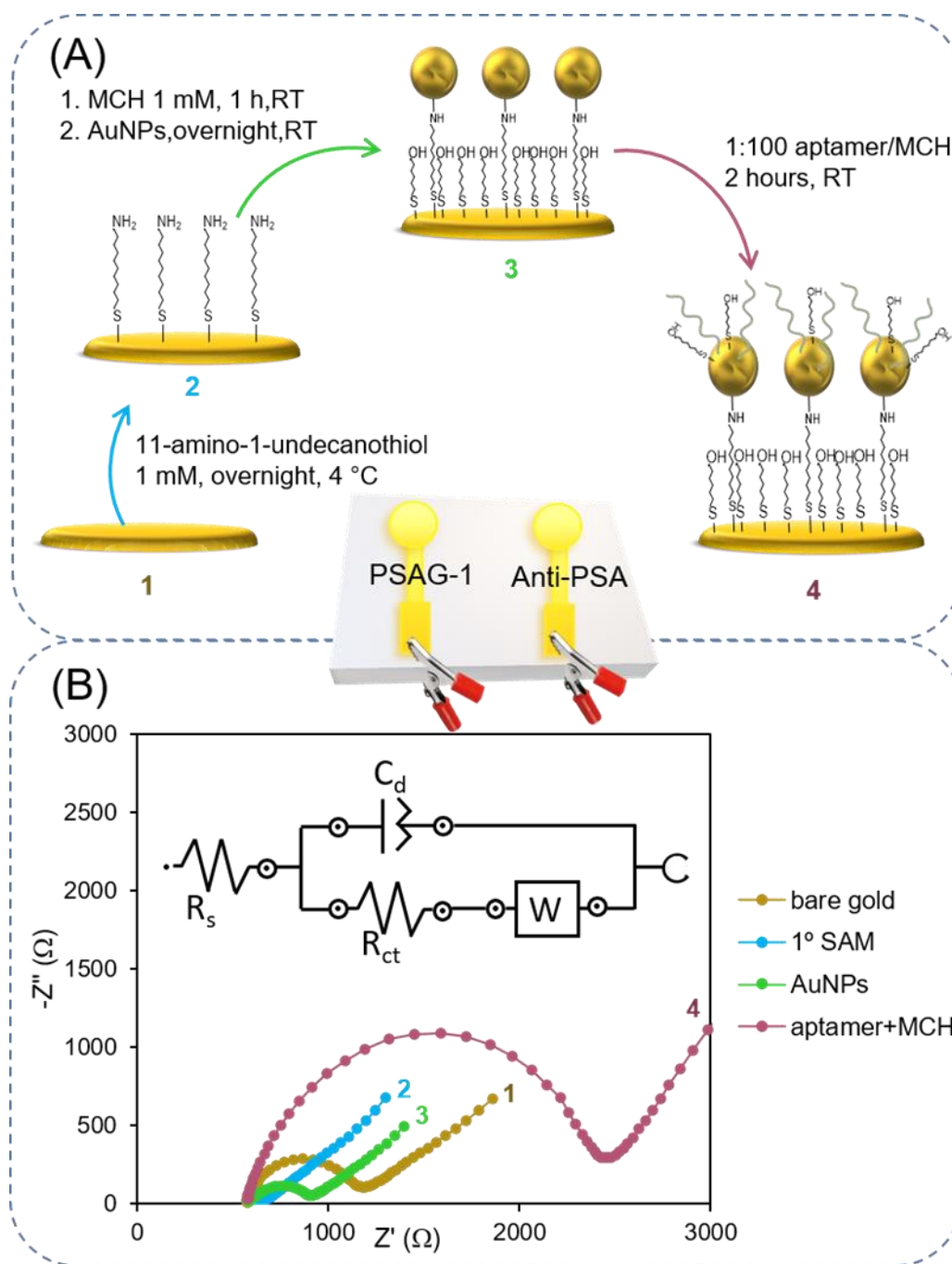
PSA solutions were prepared by serial dilution of the stock PSA standard in PBS buffer or serum diluted 1:5. For PSA detection, 50  $\mu$ L of each solution was incubated onto the modified working electrode for 30 min at room temperature. Then the electrodes were rinsed with PBS and the impedance spectrum was recorded.

### 3. Results and discussion.

We employed a DNA aptamer (PSAG-1) previously developed in our group, which displays high affinity and selectivity towards PSA, recognizing both the peptide region surrounding the glycosylation site and the glycan at the core, including fucose (Díaz-Fernández et al., 2020). Because tumour transformations imply changes in the N-glycan moiety attached to PSA, and specifically in the level of core-fucosylation, we investigated the use of a dual impedimetric platform for obtaining information about the fraction of serum PSA that is PSAG-1 reactive, and its utility as an indicator of PCa. This requires a second aptamer capable of entrapping the total serum PSA, denoted as anti-PSA (Savory et al., 2010). Both aptamers are immobilized onto nanostructured gold electrodes through a thiol group (**Figure 1A**). The gold nanoparticles are attached to the evaporated gold surface through the interaction with an amine-terminated self-assembled monolayer of 11-amino-1-undecanethiol, and MCH acts as backfiller to prevent non-specific interactions. The increase in the active area allowed an effective immobilization of the aptamer in a subsequent step, using MCH as diluent.

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) allowed us to monitor the different steps of the fabrication process (**Figure 1B**). The charge transfer resistance,  $R_{ct}$ , of the bare gold electrode ( $759 \pm 20 \Omega$ ) decreased after the first monolayer formation ( $117 \pm 19 \Omega$ ), which is due to the positive charges of the amino groups electrostatically attracting the redox probe in solution. The coating with AuNPs led to an increase in the  $R_{ct}$  value (420

$\pm 47 \Omega$ ), a value that is still lower than the initial resistance for the bare gold, demonstrating the benefits of creating a nanostructured gold surface with improved electron transfer properties and increased surface area for subsequent modification. Finally, after the aptamer immobilization we observed an increase in  $R_{ct}$  ( $2864 \pm 155 \Omega$ ) due to the electrostatic repulsion by the negatively charged oligonucleotide. These results suggest a correct fabrication of the aptasensor.

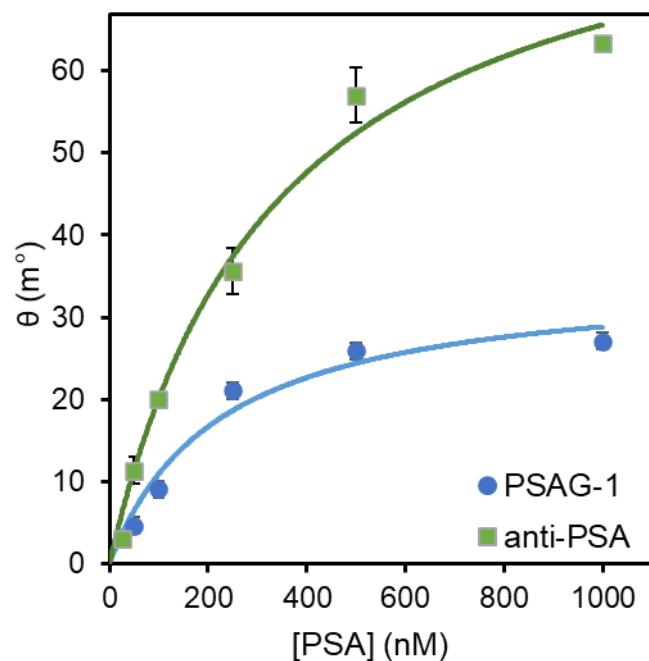


**Figure 1.** A) Steps involved in the construction of the dual impedimetric aptamer-based platform for the sequential measurement of PSAG-1 reactive PSA and total PSA. B) Nyquist plot recorded in 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  during the stepwise aptasensors fabrication. The inset shows the Randles equivalent circuit used to fit the experimental data.

### *3.1 Characterization of the affinity of the immobilized aptamers.*

The first step in the design of the dual-impedimetric platform is the identification of the appropriate aptamers that achieve clinically relevant affinity and selectivity towards different regions of PSA. The selected aptamers have shown ability to bind to immobilized human PSA (hPSA), a glycosylated form of the protein, although with different affinities i.e. dissociation constants ( $K_d$ ) of  $177 \pm 5$  nM for anti-PSA (Díaz-Fernández et al., 2019), and  $1.9 \pm 0.2$  nM for PSAG-1 (Díaz-Fernández et al., 2020) as estimated by SPR measurements with the aptamers in solution. In addition, anti-PSA showed even improved affinity ( $K_d = 70 \pm 5$  nM) (Díaz-Fernández et al., 2019) towards recombinant PSA (rPSA), an unglycosylated form of the protein. These results suggest that anti-PSA recognizes PSA by a region different from the glycosylation site, while the fucose-core plays an important role in the formation of the PSAG-1:hPSA complex (Díaz-Fernández et al., 2020). However, previous studies have indicated that the interaction aptamer-protein depends on which partner has been immobilized due to surface interactions (Amaya-González et al., 2015; Daniel et al., 2013; Miranda-Castro et al., 2018). The immobilization of the aptamers onto the sensing surface could change their conformation and their ability to bind to the protein. Consequently, the adopted configuration for the design of the impedimetric platform could modify the aptamer affinity binding due to changes in the aptamer accessibility or steric hindrance between near aptamers (Daniel et al., 2013). Consistent with this, we tested in the proposed configuration (immobilized aptamer and protein in solution) the affinities of both aptamers towards hPSA. To evaluate this, we immobilized the thiolated aptamers onto SPR gold chips establishing a refractive angle baseline in the PBS buffer solution, followed by titration with increasing concentrations of hPSA. Fitting the titration curves to the Langmuir model, which assumes a 1:1 stoichiometry,

yielded a dissociation constant of  $223 \pm 65$  nM for PSAG-1 and  $336 \pm 63$  nM for anti-PSA (Figure 2). It is therefore apparent that in the proposed configuration (immobilized aptamer and protein in solution) both aptamers showed a decrease in their affinities towards hPSA.



**Figure 2.** SPR binding curves obtained after incubation of the SPR-chip modified with each aptamer: anti-PSA (green square) and PSAG-1 (blue circles) with increasing amounts of hPSA. Solid lines represent the fit to the Langmuir model.

Although the immobilization of the aptamers, with the corresponding conformational constraints, leads to a reduction in their affinity towards the protein, the magnitude of this effect is different in both cases. While the affinity of anti-PSA diminished by two-fold, that of PSAG-1 decreased by more than 100 times. There are two potentially significant differences. First, both aptamers recognize different epitopes on the protein, with different accessibility. Second, the hPSA standard used for titration may contain different glycosylation forms, and it has been previously found that about 77% of the standard PSA isolated from seminal fluid carries core-fucosylated N-glycans

(Llop et al., 2016). Nevertheless, the obtained affinities support PSA measurements across the clinical range.

### 3.2 Analytical performance of the impedimetric aptamer-based platform.

To obtain information about the fraction of hPSA that is reactive to the aptamer PSAG-1, the two adjacent sensing surfaces in the designed platform, one modified with the aptamer PSAG-1 and the second one with anti-PSA, were challenged with increasing concentrations of hPSA in PBS. The binding of the protein produced an increase in the  $R_{ct}$  value, obtained from the Nyquist plot. To correct variations due to the differences in the microscopic surface area of the sensing phase and in the aptamer-packing, we used as read-out signal the percent change in  $R_{ct}$  with respect to the initial value, in the absence of protein,  $R_{ct,0}$ . In both cases, this signal increases with increasing hPSA concentrations until it approaches saturation (**Figure 3**). We found that PSAG-1 aptasensor leads to higher signals than the anti-PSA one. At saturating hPSA level the sensing phase fabricated with PSAG-1 exhibited  $39.7 \pm 0.5$  % of  $R_{ct}$  increase, while the anti-PSA sensor gave a  $26.5 \pm 0.9$  % change. This difference is higher at low hPSA concentrations, for example at 0.64 ng/mL of hPSA the response of PSAG-1 sensor is 2.7 times that of anti-PSA. Consequently, the dynamic range of the response covers from 0.64 ng/mL to 62.5 ng/mL for anti-PSA aptamer, and 0.26 ng/mL to 62.5 ng/mL for PSAG-1 aptamer. This probably stems from two effects: the differences in the affinity constant of the two aptamers and the different orientation of the protein once bound to the sensing phase taking into account that both aptamers recognize different epitopes in the protein.

The PSAG-1-sensing phase, in contrast, produces a much smaller signal increase for rPSA, while the surface modified with anti-PSA gives rise to similar signal changes for hPSA and rPSA (**Figure 3**). The signal increase for anti-PSA when we employ rPSA

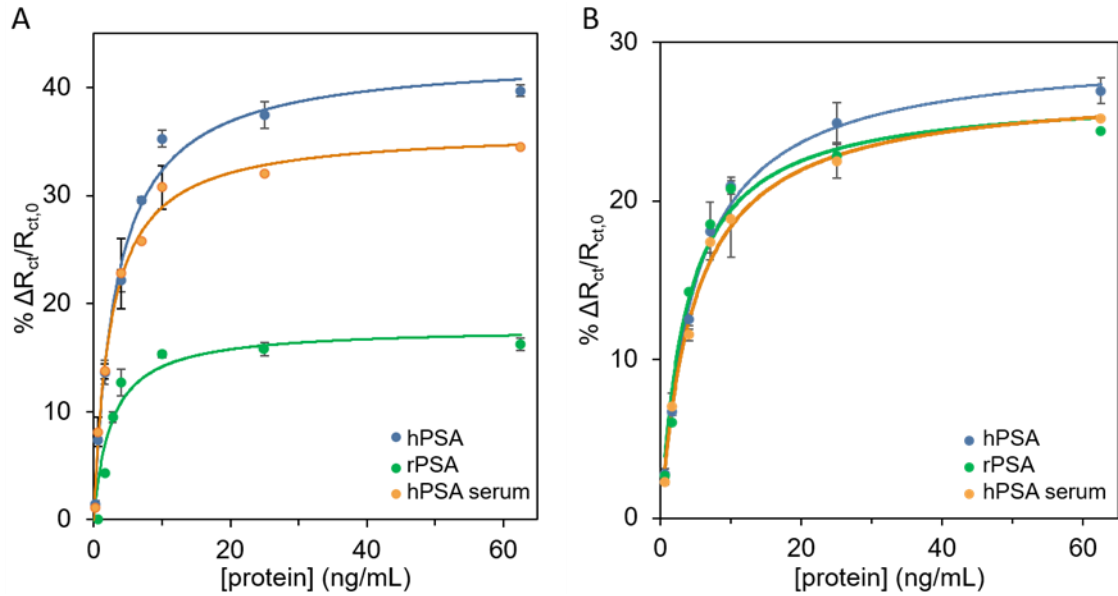
is 96% of that of hPSA versus only 37% when using PSAG-1 as receptor. This again confirms the differences in the recognition site of both aptamers, being PSAG-1 the only one that recognizes the glycosylation site of the protein.

As a demonstration of the selectivity of our platform, we next challenged it with human serum albumin (HSA), the most abundant protein in human serum. After incubation of both aptasensors with 10 ng/mL of HSA in PBS for 30 min, we find that the percentage of change in the  $R_{ct}$  ( $0.4 \pm 0.3$  % for the PSAG-1 sensor and  $2.9 \pm 0.5$  % for anti-PSA) was significantly lower than the obtained for the same concentration of hPSA ( $36 \pm 2$  % in the case of PSAG-1 and  $21.0 \pm 0.5$  % for anti-PSA).

The sensors also support effective hPSA sensing in serum samples. One of the most important challenges to overcome when working in this complex media is to minimize the non-specific adsorption of other components of the matrix. To minimize these effects, we diluted the serum 5-fold with PBS buffer and conditioned the sensing phase by incubating it for 30 min in women serum, with a PSA content  $<0.01$  ng/mL certified by an ELISA test. We used the  $R_{ct}$  value obtained after this conditioning step as reference. The signal increase we observed under these conditions for increasing concentrations of hPSA is similar to that seen in buffer within the low concentration range (**Figure 3**). For example, at 0.64 ng/mL of hPSA the PSAG-1 sensing phase leads to a  $7.6 \pm 0.4$  % of increase in diluted serum (vs.  $7.4 \pm 0.2$  % of change in buffer). In consequence, the useful dynamic range in serum is the same as in buffer. However, the saturating signals are lower than that seen in buffer, probably because the number of recognition sites is reduced due to the adsorption of other proteins present in the serum matrix during the conditioning.

The calibration curves obtained in diluted serum were fitted to Langmuir equation  $y = (y_{max} \cdot x)/(P + x)$  with a  $y_{max}$  value of  $27.2 \pm 0.8$  % and  $P$  of  $4.8 \pm 0.5$

ng/mL with a correlation of 0.996 for anti-PSA aptamer, and a  $y_{\max}$  value of  $36 \pm 2 \%$  and  $P$  of  $2.3 \pm 0.4$  ng/mL with a correlation of 0.993 for PSAG-1 aptamer (**Figure 3**).



**Figure 3.** Calibration curve for the dual impedimetric platform. The PSAG-1 (A) and the anti-PSA (B) sensing interfaces respond efficiently to hPSA in PBS (blue circles) and in 5-fold diluted serum (orange circles). PSAG-1 sensor shows a much smaller response to rPSA (green circles) than anti-PSA sensor. The lines represent fits of the data to a Langmuir equation. Error bars represent the standard deviation of measurements with three independently fabricated sensors.

### 3.3 Analysis of PSA in clinical samples

To explore the clinical utility of our platform we next challenged it for detecting PCa associated PSA glycan alterations. The Hospital of Cabueñes (Gijón- Asturias) provided us serum samples from 12 patients classified in three groups: patients with a benign prostate pathology, with diagnosed PCa and healthy (see Table 1). The samples were selected with levels of total PSA in the grey zone or above ( $> 4$  ng/mL), quantified



with the automated ADVIA Centaur® (Siemens) ELISA assay at the central laboratory of the hospital.

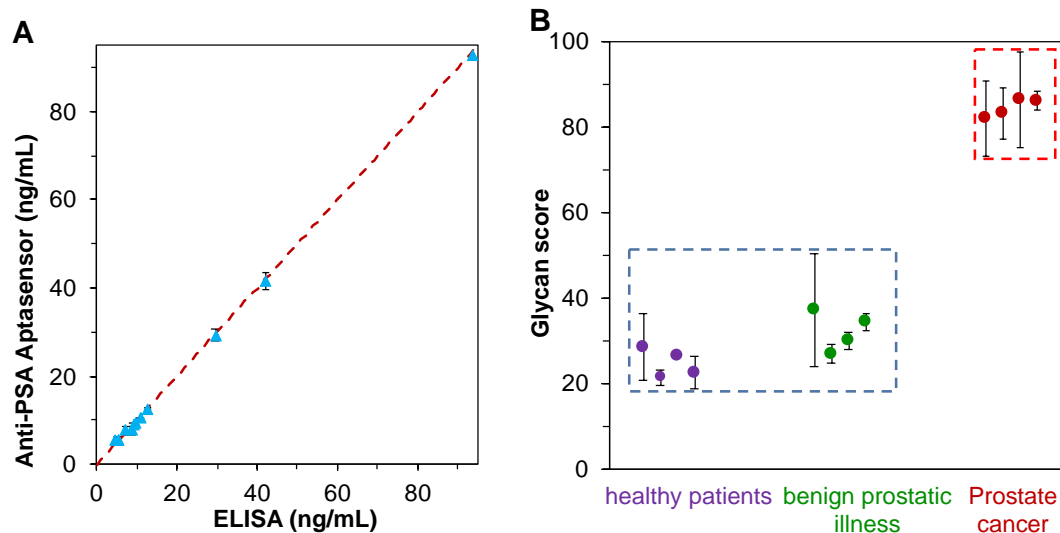
The impedimetric platform first conditioned in free-PSA serum was incubated with the 5-fold diluted serum sample. The percentage of change in  $R_{ct}$  obtained with each sensor was referred to the corresponding calibration curve in diluted serum to obtain the concentration of PSA. We observed that the results obtained with the anti-PSA-modified sensing phase perfectly matched those obtained in the hospital with the commercial ELISA (**Figure 4A**). On the other hand, the PSAG-1 based sensor gives concentration values consistently lower than those obtained with the anti-PSA sensor. This is in agreement with the fact that PSAG-1 reactive PSA represents only a fraction of total PSA in the sample.

To evaluate the diagnostic value of the proposed dual-approach we defined the glycan score (GS) as the ratio between the concentration measure with PSAG-1 aptamer and the concentration measure with anti-PSA aptamer (total PSA) multiplied by 100. Neither total PSA nor PSAG-1 reactive PSA clearly correlates with the state of health of the patient (see specific values in Table 1 and Box-and-Whisker plots in the Supplementary information Figures S1 and S2). On the contrary, GS significantly correlates with the final diagnosis (Table 1, **Figure 4B** and Figure S3), distinguishing non-PCa patients from patients finally diagnosed with PCa. On the basis of the GS value it is possible to differentiate two groups. The first one with GS values between 22 and 37 for non PCa patients, includes healthy patients and patients with a benign prostatic illness (prostatitis or benign prostate hyperplasia, BPH). The other group, with GS values between 82 and 86, corresponds to PCa patients. These results are in agreement with a significant increase of PSAG1-reactive PSA in PCa patients, which could be associated to changes in the core-fucosylation levels (Li et al., 2015) or an

increase in highly branched glycan structures associated to cancer (Munkley et al., 2016). The glycan score could be a good alternative for the diagnosis of PCa in men with levels of PSA in the grey zone or above, with potential to improve the clinical outcomes of PSA test and to reduce the number of unnecessary biopsies.

**Table 1:** Levels of total and glycosylated PSA of each sample and value of the glycan score.

Sample	[tPSA] (ng/mL)	[gPSA] (ng/mL)	Glycan score	Diagnosis
1	9.2 ± 0.2	2.6 ± 0.5	28 ± 5	Diabetes type II (DMII), hypertension
2	5.6 ± 0.3	1.22 ± 0.01	22 ± 1	DMII
3	9.1 ± 0.4	2.7 ± 0.2	29 ± 2	aortic prosthesis
4	8 ± 1	1.83 ± 0.08	24 ± 3	morbid obesity
5	12.7 ± 0.3	10 ± 1	82 ± 9	Prostate cancer
6	42 ± 2	35 ± 2	83 ± 6	Prostate cancer
7	5.6 ± 0.6	4.8 ± 0.1	86 ± 10	Prostate cancer
8	10.4 ± 0.2	8.8 ± 0.4	84 ± 3	Prostate cancer
9	5.48	2.0 ± 0.8	37 ± 13	prostatitis
10	7.6 ± 0.9	1.83 ± 0.08	24 ± 3	BPH
11	29 ± 1	8.8 ± 0.4	30 ± 2	BPH
12	92.6	25 ± 2	27 ± 2	BPH



**Figure 4.** Results of the analysis of serum samples with the impedimetric dual-platform. A) Correlation between total PSA serum levels found by a standard ELISA and those obtained with the anti-PSA aptamer-based sensor. B) Correlation between the glycan score, obtained as the ratio between PSAG-1 reactive PSA and total PSA, and the diagnosed pathology.

#### 4. Conclusions

The finding that prostate tumour malignancy is associated with changes in the glycosylation pattern of PSA motivates the development of a new liquid biopsy test for PCa diagnostic. The availability of the aptamer PSAG-1 to recognize the core-glycan and the surrounding peptide in PSA opens the door to the development of new diagnostic tests for improving the predictive and prognostic value of this biomarker. Here, we demonstrated that a label-free impedimetric platform, which combines PSAG-1 aptamer for directly entrapping specific glycosylated forms of the protein with another aptamer able to bind total PSA, has the potential to achieve this unmet clinical need. The dual system can rapidly and conveniently measure the different fractions of PSA in serum after a simple dilution of the sample. The two sensors have a useful dynamic

range covering the clinical range, with a lower limit of 0.26 ng/mL for the PSAG-1 reactive PSA and 0.64 ng/mL for total PSA and up to 62.5 ng/mL, achieving a reproducibility of 5.4 % across this range. The two signals obtained as read-out of this dual platform are used to calculate the ratio of PSAG-1-reactive PSA to total PSA. This ratio, defined as glycan score, has better predictive power to separate PCa from non-PCa patients than just total PSA. Although further validation is required, our results support the use of the glycan score to reduce unnecessary biopsies without compromising the ability to diagnose PCa.

### **CRedit authorship contribution statement**

**Ana Díaz-Fernández:** Methodology, Investigation, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Rebeca Miranda-Castro:** Methodology, Writing - review & editing. **Noemí de-los-Santos Álvarez:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing. **María Jesús Lobo-Castañón:** Conceptualization, Resources, Project administration, Supervision, Writing - review & editing. **Pedro Estrela:** Conceptualization, Supervision, Writing - review & editing.

### **Declaration of competing interest**

The authors declare no competing financial interest.

### **Acknowledgments**

We thank Dr. E. Fernández-Rodríguez and Dr. S. García-Alonso (Hospital Universitario de Cabueñes-Asturias) for providing the serum samples. The work was funded by the Spanish Ministerio de Ciencia y Universidades (RTI-2018-095756-B-I00), and Principado de Asturias Government (IDI2018-000217), co-financed by FEDER funds. A.D.F. was supported by Asociación Española contra el Cáncer (AECC) with a Ph.D. fellowship and by Banco Santander and University of Oviedo with a grant in the framework of the economic mobility of excellence grants for teachers and researchers.

## References

- Akiba, U., Anzai, J., 2016. Recent progress in electrochemical biosensors for glycoproteins. *Sensors* 16, 2045. <https://doi.org/10.3390/s16122045>
- Amaya-González, S., López-López, L., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A.J., Lobo-Castañón, M.J., 2015. Affinity of aptamers binding 33-mer gliadin peptide and gluten proteins: Influence of immobilization and labeling tags. *Anal. Chim. Acta* 873, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.053>
- Butler, E.N., Kelly, S.P., Coupland, V.H., Rosenberg, P.S., Cook, M.B., 2020. Fatal prostate cancer incidence trends in the United States and England by race, stage, and treatment. *Br. J. Cancer* 123, 487–494. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0859-x>
- Catalona, W.J., Partin, A.W., Sanda, M.G., Wei, J.T., Klee, G.G., Bangma, C.H., Slawin, K.M., Marks, L.S., Loeb, S., Broyles, D.L., Shin, S.S., Cruz, A.B., Chan, D.W., Sokoll, L.J., Roberts, W.L., Van Schaik, R.H.N., Mizrahi, I.A., 2011. A multicenter study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *J. Urol.* 185, 1650–1655. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.12.032>
- Damborska, D., Bertok, T., Dosekova, E., Holazova, A., Lorencova, L., Kasak, P., Tkac, J., 2017. Nanomaterial-based biosensors for detection of prostate specific antigen. *Microchim. Acta* 184, 3049–3067. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2410-1>
- Daniel, C., Roupioz, Y., Gasparutto, D., Livache, T., Buhot, A., 2013. Solution-Phase vs Surface-Phase aptamer-protein affinity from a label-free kinetic biosensor. *PLoS*

One 8, e75419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075419>

- Díaz-Fernández, A., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Fernández-Rodríguez, E., Lobo-Castañón, M.J., 2019. Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: Toward more specific detection of prostate cancer. *Biosens. Bioelectron.* 128, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.040>
- Díaz-Fernández, A., Miranda-Castro, R., Díaz, N., Suárez, D., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M.J., 2020. Aptamers targeting protein-specific glycosylation in tumor biomarkers: general selection, characterization and structural modeling. *Chem. Sci.* <https://doi.org/10.1039/d0sc00209g>
- Ghorbani, F., Abbaszadeh, H., Dolatabadi, J.E.N., Aghebati-Maleki, L., Yousefi, M., 2019. Application of various optical and electrochemical aptasensors for detection of human prostate specific antigen: A review. *Biosens. Bioelectron.* 142. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111484>
- Gilgunn, S., Conroy, P.J., Saldova, R., Rudd, P.M., O’Kennedy, R.J., 2013. Aberrant PSA glycosylation - A sweet predictor of prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* 10, 99–107. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.258>
- Jeong, S., Han, S.R., Lee, Y.J., Lee, S.W., 2010. Selection of RNA aptamers specific to active prostate-specific antigen. *Biotechnol. Lett.* 32, 379–385. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0168-1>
- Jolly, P., Damborsky, P., Madaboosi, N., Soares, R.R.G., Chu, V., Conde, J.P., Katrlík, J., Estrela, P., 2016. DNA aptamer-based sandwich microfluidic assays for dual quantification and multi-glycan profiling of cancer biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* 79, 313–319. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2015.12.058>
- Jolly, P., Zhuravski, P., Hammond, J.L., Miodek, A., Liébana, S., Bertok, T., Tkáč, J.,

- Estrela, P., 2017. Self-assembled gold nanoparticles for impedimetric and amperometric detection of a prostate cancer biomarker. *Sensors Actuators B Chem.* 251, 637–643. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2017.05.040>
- Jung, M., Xu, C., Spethmann, J., Johannsen, M., Deger, S., Stephan, C., Loening, S.A., Jung, K., 2004. DD3PCA3-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur. Urol.* 46, 271–273. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2004.03.003>
- Li, M., Guo, X., Li, H., Zuo, X., Hao, R., Song, H., Aldalbahi, A., Ge, Z., Li, J., Li, Q., Song, S., Li, S., Shao, N., Fan, C., Wang, L., 2018. Epitope binning assay using an electron transfer-modulated aptamer sensor. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10, 341–349. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b17324>
- Li, Q.K., Chen, L., Ao, M.H., Chiu, J.H., Zhang, Z., Zhang, H., Chan, D.W., 2015. Serum fucosylated prostate-specific antigen (PSA) improves the differentiation of aggressive from non-aggressive prostate cancers. *Theranostics* 5, 267–276. <https://doi.org/10.7150/thno.10349>
- Llop, E., Ferrer-Batallé, M., Barrabés, S., Guerrero, P.E., Ramírez, M., Saldova, R., Rudd, P.M., Aleixandre, R.N., Comet, J., de Llorens, R., Peracaula, R., 2016. Improvement of prostate cancer diagnosis by detecting PSA glycosylation-specific changes. *Theranostics* 6, 1190–1204. <https://doi.org/10.7150/thno.15226>
- Lomas, D.J., Ahmed, H.U., 2020. All change in the prostate cancer diagnostic pathway. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17, 372–318. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0332-z>
- Macefield, R., Metcalfe, C., Lane, J., Donovan, J., Avery, K., Blazeby, J., Down, L., Neal, D., Hamdy, F., Vedhara, K., 2010. Impact of prostate cancer testing: an evaluation of the emotional consequences of a negative biopsy result. *Br. J. Cancer* 102, 1335–1340. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605648>



- Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M.J., 2018. Characterization of aptamer-ligand complexes, in: *Aptamers for Analytical Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 127–172. <https://doi.org/10.1002/9783527806799.ch4>
- Munkley, J., Mills, I.G., Elliott, D.J., 2016. The role of glycans in the development and progression of prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* 13, 324–333. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.65>
- Negahdary, M., Sattarahmady, N., Heli, H., 2020. Advances in prostate specific antigen biosensors-impact of nanotechnology. *Clin. Chim. Acta* 504, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.01.028>
- Park, J.W., Lee, S.J., Ren, S., Lee, S., Kim, S., Laurell, T., 2016. Acousto-microfluidics for screening of ssDNA aptamer. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep27121>
- Peracaula, R., Tabarés, G., Royle, L., Harvey, D.J., Dwek, R.A., Rudd, P.M., de Llorens, R., 2003. Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. *Glycobiology* 13, 457–470. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg041>
- Pihíková, D., Belicky, S., Kasák, P., Bertok, T., Tkac, J., 2016a. Sensitive detection and glycoprofiling of a prostate specific antigen using impedimetric assays. *Analyst* 141, 1044–1051. <https://doi.org/10.1039/c5an02322j>
- Pihíková, D., Kasak, P., Kubanikova, P., Sokol, R., Tkac, J., 2016b. Aberrant sialylation of a prostate-specific antigen: Electrochemical label-free glycoprofiling in prostate cancer serum samples. *Anal. Chim. Acta* 934, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.043>
- Saini, S., 2016. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell. Oncol.* 39, 97–106. <https://doi.org/10.1007/s13402-016-0268-6>

- Savory, N., Abe, K., Sode, K., Ikebukuro, K., 2010. Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing. *Biosens. Bioelectron.* <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.057>
- Schröder, F.H., Hugosson, J., Roobol, M.J., Tammela, T.L.J., Ciatto, S., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Lilja, H., Zappa, M., Denis, L.J., Recker, F., Berenguer, A., Mänttinen, L., Bangma, C.H., Aus, G., Villers, A., Rebillard, X., van der Kwast, T., Blijenberg, B.G., Moss, S.M., de Koning, H.J., Auvinen, A., 2009. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized european study. *N. Engl. J. Med.* 360, 1320–1328. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810084>
- Song, E., Hu, Y., Hussein, A., Yu, C.Y., Tang, H., Mechref, Y., 2015. Characterization of the glycosylation site of human PSA prompted by missense mutation using LC-MS/MS. *J. Proteome Res.* 14, 2872–2883. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00362>
- Svobodova, M., Bunka, D.H.J., Nadal, P., Stockley, P.G., O’Sullivan, C.K., 2013. Selection of 2’F-modified RNA aptamers against prostate-specific antigen and their evaluation for diagnostic and therapeutic applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 9149–9157. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7350-y>
- Xia, N., Cheng, C., Liu, L., Peng, P., Liu, C., Chen, J., 2017. Electrochemical glycoprotein aptasensors based on the in-situ aggregation of silver nanoparticles induced by 4-mercaptophenylboronic acid. *Microchim. Acta* 184, 4393–4400. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2488-5>