

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida

**Funcionalización y direccionamiento de partículas tipo virus
del bacteriófago P22 con actividad citocromo P450**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Miguel Alejandro Tapia Moreno

Ensenada, Baja California, México
2015

Tesis defendida por

Miguel Alejandro Tapia Moreno

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Codirector del Comité

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Codirector del Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Dr. Axayácatl Rocha Olivares



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Miguel Alejandro Tapia Moreno** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Funcionalización y direccionamiento de partículas tipo virus del bacteriófago P22 con actividad citocromo P450

Resumen aprobado por:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Codirector de tesis

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Codirector de tesis

Se ha determinado que ciertos tipos de cáncer, como lo es el cáncer de mama, presentan resistencia a los tratamientos de quimioterapia debido a una baja actividad citocromo P450 en las células tumorales, es por eso que en el presente trabajo, como parte de la estrategia de activación de profármacos, se diseñaron y sintetizaron partículas tipo virus (VLPs) del bacteriófago P22 con actividad citocromo P450 (CYP450) e inmunológicamente inertes que fueron funcionalizadas para ser reconocidas por células de cáncer cervical humano (HeLa). La metodología consiste en encapsular moléculas de citocromo P450 de *Bacillus megaterium* dentro de la cápside del bacteriófago P22 expresadas heterológamente y de manera diferencial en *E. coli*. Una vez purificadas, las VLPs con actividad enzimática se cubrieron con polietilenglicol, el cual tenía unido ácido fólico en el extremo distal con el objetivo de ser reconocidas por los receptores de folato presentes en las células cancerosas. La actividad citocromo P450 fue llevada a células HeLa mediante la transfección de las nanopartículas P22-CYP utilizando lipofectamina, de tal forma se pudo demostrar el potencial de las VLPs biocatalíticas para su uso como vehículos de entrega enzimática de importancia médica para aplicaciones clínicas. Por otro lado, se evaluó la capacidad de las VLPs funcionalizadas para ser reconocidas por células HeLa *in vitro* y a su vez lograr la activación del prófarma utilizado en quimioterapia tamoxifen. Los resultados comprueban que es posible el direccionamiento de las VLPs con actividad biocatalítica específicamente a células cancerosas mediante la funcionalización química, se consiguió una mayor eficiencia en la activación del tamoxifen a una concentración de 7 μM logrando hasta un 75% de muerte celular en comparación con el control en donde prácticamente a dicha concentración no se observó muerte celular. Estas partículas tipo virus con actividad citocromo P450 que pueden ser dirigidas a células tumorales, resultan ser atractivas para su potencial uso como nanobiorreactores con capacidad de entrega enzimática para aplicaciones terapéuticas a futuro.

Palabras clave: Citocromo P450, Nanobiorreactor, Terapia de activación de profármacos, Partículas tipo virus.

Abstract of the thesis presented by **Miguel Alejandro Tapia Moreno** as a partial requirement to obtain the Master degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

Functionalization and delivery of bacteriophage P22 virus-like particles with cytochrome P450 activity

Abstract approved by:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Codirector de tesis

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Codirector de tesis

It is known that many types of cancer, like breast cancer, could be resistant against chemotherapy because of a low cytochrome P450 activity in tumor cells. Hence, the aim of this work was to design and synthesize bacteriophage P22 virus-like particles (VLPs) with cytochrome P450 activity, immunologically inert and functionalized in order to be recognized by Human cervix carcinoma cells (HeLa). The methodology was based on the encapsulation of cytochrome P450 from *Bacillus megaterium* inside the capsid derived from the bacteriophage P22 both heterologously expressed in *E. coli*. Once purified, VLPs with enzymatic activity were covered with polyethyleneglycol that was functionalized in its distal end with folic acid in order to be recognized by folate receptors exhibited on tumoral cells. Cytochrome P450 activity was delivered into HeLa cells by transfection of P22-CYP nanoparticles through lipofectamine. These particular essays provide a clear demonstration of the potential of biocatalytic VLPs vehicles as medical relevant enzyme delivery system for clinical applications. In addition, functionalized VLPs were evaluated for their capacity to be recognized by HeLa cells *in vitro* and also the ability to transform the anti-carcinogenic prodrug tamoxifen. It was demonstrated the capacity of biocatalytic VLPs to be delivered specifically into tumoral cells by chemical functionalization, enhancing the efficiency of tamoxifen transformation which resulted in 75% of cell death in the presence of 7 μM of the prodrug, compared with controls in which no cell death was observed. This work provides evidence that functionalized nanoparticles with cytochrome P450 could be delivered into tumor cells offering an interesting platform as nanobioreactors for intracellular delivery of enzymatic activity,

Keywords: Cytochrome P450, Nanobioreactor, Enzyme prodrug therapy, Virus-like particles.

Dedicatoria

A mi abuelo Juan y a mi madre por ser el ejemplo más grande en mi vida,
por enseñarme que el trabajo arduo se hace todos los días.

Agradecimientos

A mis tutores de tesis, el Dr. Rafael Vázquez Duhalt y Dr. Rubén Darío Cadena Nava por estar siempre presentes; brindándome sus consejos y su apoyo para mi crecimiento profesional.

A la Dra. Rosa Mouriño por sus críticas y por ese ímpetu que impulsaba mi aprendizaje.

Al Dr. Axayácatl Rocha por el apoyo y su entera disposición.

A la Dra. Katrin Quester por su enorme apoyo, más allá de la parte técnica dentro del laboratorio.

Al Dr. Alejandro Huerta por su apoyo en la parte experimental.

A la Dra. Lorena Sánchez por transmitirme su conocimiento.

A la Dra. Karla Juárez por el apoyo experimental en la parte celular.

A CONACYT por la beca otorgada durante la maestría y el financiamiento otorgado para el proyecto: SEP-CONACYT (165633), así como a CICESE por el apoyo económico para la asistencia al congreso y su gente.

A mis profesores durante mi etapa de cursos, con especial cariño al Dr. Josué Álvarez Borrego por sus enseñanzas.

A la Dra. Margarita Rodríguez-Kessler y el Dr. Francisco Jiménez Bremont por todas sus enseñanzas y darme la oportunidad de involucrarme por primera vez en el ámbito científico.

A mi mamá, por el apoyo incondicional y por siempre estar en todo momento.

A mi papá, por sus consejos y su buena voluntad.

A mi familia, por mi formación y todas las enseñanzas.

A mi novia Valeria, por su paciencia, su apoyo y su amor.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por los momentos de convivencia y de aprendizaje juntos; en especial a Claudia Tapia (prima), Karla Alejo, Raúl Tafolla. Javier, Aldo, Elena, Moni, Chava, Kee, Leo.

Al “Club del Café”, por compartir su amistad y especialmente por esa chispa de intelecto que se servía en cada taza.

Al personal del Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM por sus atenciones y su buena disposición, especialmente al Sr. Francisco Ruiz por su apoyo con el TEM.

Tabla de contenido

	Página
Resumen español	ii
Resumen inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	x
 Capítulo 1. Introducción	 1
1.1 Problemática.....	1
1.2 Partículas tipo virus (VLPs)	2
1.2.1 Reducción de la inmunogenicidad de las VLPs	4
1.2.2 Funcionalización y direccionamiento de VLPs a células de cáncer.....	5
1.3 Bacteriófago P22.....	5
1.4 Citocromos P450.....	7
1.4.1 CYP de <i>Bacillus megaterium</i>	8
1.5 Terapia de activación de profármacos.....	8
 Capítulo 2. Hipótesis y objetivos	 10
2.1 Hipótesis.....	10
2.2 Objetivo principal.....	10
2.2.1 Objetivos particulares.....	10
 Capítulo 3. Materiales y métodos	 12
3.1 Plásmidos.....	12
3.2 Cepas.....	12
3.3 Expresión diferencial del CYPBM3-SP y CP P22.....	12
3.4 Purificación de VLPs P22-CYP.....	13
3.4.1 Perfil de desensamble de VLPs P22-CYP.....	14
3.5 Determinación de la concentración y actividad CYP de VLPs P22-CYP.....	14
3.6 Lipofección de VLPs P22-CYP en la línea celular de carcinoma cervical humano (HeLa).....	15
3.7 Ensayo de actividad citocromo P450 en células HeLa lipofectadas con VLPs P22-CYP.....	16
3.8 Pegilación de VLPs P22-CYP.....	17
3.9 Ensayo de citotoxicidad en células HeLa.....	17
3.10 Evaluación de la estabilidad frente a degradación por proteasas.....	18
 Capítulo 4. Resultados y Discusión	 19
4.1 Obtención de clones para la producción de VLPs P22-CYP.....	19
4.2 Expresión diferencial para la encapsulación <i>in vivo</i> del CYPBM3 en cápsides P22.....	21

4.3 Purificación de VLPs P22-CYP.....	22
4.3.1 Perfil de desensamble de VLPs P22-CYP.....	26
4.3.2 Análisis de las VLPs por medio de TEM.....	29
4.4 Determinación de la concentración y actividad CYP450 de VLPs P22-CYP.....	30
4.5 Lipofección de VLPs P22-CYP en células HeLa y evaluación de actividad citocromo P450.....	31
4.6 Pegilación de VLPs P22-CYP.....	34
4.6.1 Evaluación de la actividad de VLPs P22-CYP PEG-AF.....	35
4.6.2 Análisis de las VLPs pegiladas por medio de TEM.....	37
4.7 Ensayo de citotoxicidad en células HeLa.....	38
4.8 Evaluación de estabilidad frente a proteasas.....	41
Capítulo 5. Conclusiones	43
Capítulo 6. Perspectivas	44
Lista de referencias bibliográficas.....	45
Anexos.....	50

Lista de figuras

Figura		Página
1	Representación esquemática de las interfaces internas y externas de las VLPs que pueden ser modificadas.....	3
2	Ruta de ensamble del bacteriófago P22.....	6
3	Conformación de la estructura de la cápside del bacteriófago P22.....	7
4	SDS-PAGE al 12% de obtención de clonas.....	20
5	Esquema de inducción para la encapsulación <i>in vivo</i> CYP-SP en P22.....	21
6	SDS-PAGE al 12% con muestras de expresión y primer paso de purificación.....	22
7	Gráfica que muestra la densidad relativa mediante densitometría utilizando el software ImageJ. Gráfica que muestra la densidad relativa mediante densitometría utilizando el software ImageJ.....	24
8	Cromatograma de filtración en gel por FPLC y Gel SDS-PAGE al 12%.....	25
9	Cromatograma de filtración en gel por FPLC.....	26
10	Perfil de desensamble en gel de agarosa al 1%.....	27
11	Gel de agarosa al 1% para la determinación de VLPs correctamente ensambladas.....	28
12	Gel SDS-PAGE al 12% que muestra las proteínas que conforman las VLPs una vez concentradas.....	28
13	Nanobiorreactores P22-CYP vistos al TEM.....	30
14	Gráfica de actividad de VLPs P22-CYP.....	31
15	Ensayo de actividad citocromo P450 en la línea celular de carcinoma de cérvix humano (HeLa).....	33
16	Cromatograma de exclusión molecular para determinación de VLPs P22-CYP pegiladas y funcionalizadas.....	35

17	Gráfica de actividad CYP P450.....	36
18	Nanobiorreactores P22-CYP vistos al TEM.....	38
19	Ensayo de citotoxicidad mediante la activación de tamoxifen utilizando VLPs P22-CYP lipofectadas en células HeLa.....	39
20	Ensayo de citotoxicidad mediante la activación de tamoxifen utilizando VLPs P22-CYP PEG-AF.....	40
21	Estabilidad del CYP BM3 libre y encapsulado en P22 (VLPs sin modificar y VLPs PEG-AF) en presencia de tripsina (100U).....	41

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Concentraciones de CYP encapsuladas en VLPs P22.....	30
2	Actividad CYP P450 para enzima libre y encapsulada en VLPs P22 pegiladas y no pegiladas.....	36

Capítulo 1. Introducción

Uno de los aciertos que ha logrado la convergencia de la química, la biología y las ciencias de materiales ha sido la manipulación y el estudio de los biomateriales a escala nanométrica en por lo menos alguna de sus dimensiones, con la finalidad de generar aplicaciones prácticas (Destito *et al.*, 2009 & Uchida *et al.*, 2007). A partir de ello surge la Bionanotecnología, como una división de la nanotecnología, la cual se enfoca en la investigación y desarrollo de nuevos materiales a escala nanométrica basados en biomoléculas, como son los ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos, con el fin de desarrollar nuevos materiales y artefactos (Destito *et al.*, 2009). Dentro de los nanomateriales que han adquirido gran importancia en los últimos años son las partículas tipo virus o VLPs (del inglés, “virus-like particles”), que gracias a su arquitectura y características particulares presentan un gran potencial en el área de la nanomedicina y la ciencia de materiales (Manchester & Steinmetz, 2009). Resulta importante señalar que si bien se han usado de manera intensiva las partículas virales como nanoplataformas para la producción de vacunas (Uchida *et al.*, 2007 & Roldao *et al.*, 2010), su uso para el desarrollo de nuevas tecnologías de carácter biomédico presenta grandes desafíos; como lograr la reducción o eliminación de la respuesta inmune durante el suministro de los nanomateriales; así como mejorar su efecto por medio de la extensión de su biodisponibilidad en el cuerpo, y finalmente la funcionalización y el direccionamiento hacia células o tejidos diana.

1.1 Problemática

A nivel mundial una de las enfermedades con mayor incidencia es el cáncer, se estima que afecta alrededor de 13 millones de personas anualmente y a pesar de los esfuerzos que se realizan para abordar dicha problemática, la realidad es que aún no se ha resuelto (Cancer Research UK, 2012). Esta enfermedad no va en descenso y recientemente se proyectó que la incidencia del cáncer aumentaría de 13.3 millones a 21.4 millones de casos por año entre 2010 y 2030 (Cancer Research UK, 2012 & Wild, 2012). La quimioterapia es la estrategia terapéutica que más se utiliza actualmente para combatir los tumores cancerígenos, esto a pesar de los avances en el desarrollo de terapias anticáncer más eficientes, sin embargo en muchos casos es exitosa pero no deja de tener

efectos secundarios dramáticos que pueden llevar inclusive a la muerte (Al-Lazikani *et al.*, 2012).

Los medicamentos comúnmente utilizados en quimioterapia son inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de la topoisomerasa y antracenodionas (antraciclinas) que inhiben la síntesis del ADN y la mitosis, con la finalidad de reducir la rápida proliferación de las células. Por otro lado, uno de los grandes problemas de estos fármacos citotóxicos utilizados en la quimioterapia es que estos no reconocen la diferencia entre las células cancerígenas y los otros tipos de células, como consecuencia la mayoría de dichos medicamentos ocasionan un efecto tóxico para las células sanas del cuerpo, por tanto la habilidad para controlar la entrega de fármacos y su subsecuente liberación en los sitios específicos aún se considera un gran reto (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014).

1.2 Partículas tipo virus (VLPs)

Los virus son entidades biológicas que se ensamblan a partir de múltiples copias de las proteínas de la cápside logrando arquitecturas con huecos precisos, los cuales en su estado nativo, contienen como cargo su material genético, protegiéndolo del ambiente exterior para que este pueda ser depositado dentro de una célula huésped. Tomando ventaja de estas características, muchas partículas virales pueden ser utilizadas y ensambladas de tal forma que no contengan el material genético como cargo, por lo cual no son partículas infecciosas y en efecto no tienen la capacidad de auto propagarse. De esta manera se generan partículas que mantienen sus geometrías exactas para ser utilizadas como andamiajes básicos para el diseño y fabricación de materiales nanoestructurados, concretamente contenedores proteicos que son llamados VLPs (O'Neil *et al.*, 2012 & Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014).

Las VLPs confieren excelentes ventajas para su uso en el diseño y síntesis como nanomaterial, entre ellas destacan: i) su arquitectura altamente ordenada y su capacidad de autoensamblarse *in vitro*; ii) una vez ensambladas sirven como contenedores con huecos, capaces de encapsular cargamentos no nativos a través de procesos de

ensamblaje directo; iii) una vez encapsulado dicho cargamento dentro de las VLPs, puede ser protegido del ambiente externo gracias a la estabilidad de las partículas (a pH, fuerza iónica, temperatura, etc.); iv) cuentan con grandes áreas superficiales con una gran cantidad y variedad de sitios reactivos que permiten el acoplamiento de múltiples ligandos (importantes para la funcionalización de las partículas); v) aunque estas estructuras permiten la permeabilidad de moléculas pequeñas, naturalmente estos contenedores proteicos no son penetrados por enzimas proteolíticas de gran tamaño; vi) así mismo tienen la capacidad de internalización dentro de las células, y son biocompatibles y biodegradables (Strable & Finn, 2009; Lee *et al.*, 2009; O'Neil *et al.*, 2012).

La compartimentalización es una característica que define la vida, como evidencia podemos observar que a través de membranas lipídicas los compartimentos han evolucionado para crear entornos locales basados en su actividad, creando un epicentro funcional especializado y altamente eficiente (O'Neil *et al.*, 2012). Una de las razones por las cuales estos contenedores proteicos derivados de virus han atraído un gran interés es debido a su alto grado de ordenamiento: un número exacto de proteínas con una simetría cúbica, gracias a dicha simetría las unidades funcionales están presentes en posiciones precisas (Cornelissen, 2012). Estos cuentan con tres interfaces disponibles para ser manipuladas ya sea químicamente o genéticamente dependiendo de la aplicación: la cara interna, la cara externa y la interface entre las subunidades proteicas (Fig. 1) (Douglas & Young, 2006).

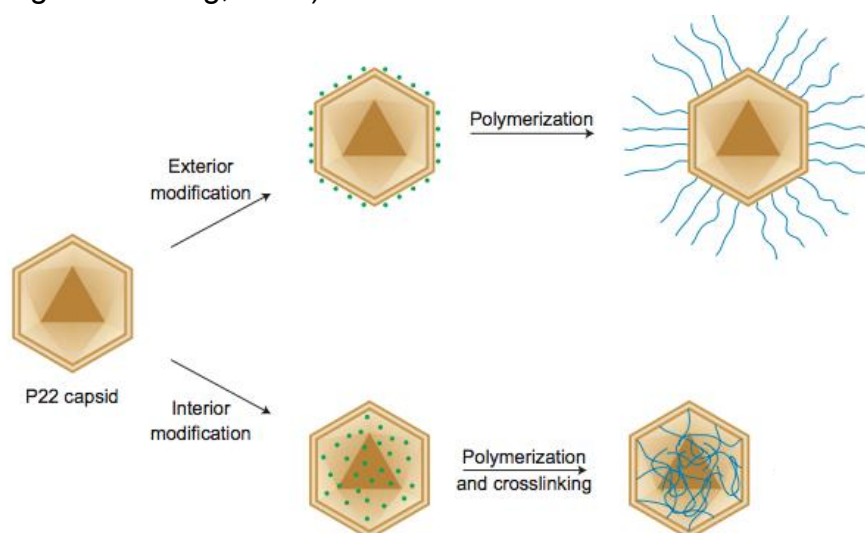


Figura 1. Representación esquemática de las interfaces internas y externas de las VLPs que pueden ser modificadas (Modificado de Cornelissen, 2012).

En un inicio las VLPs fueron estudiadas ampliamente para su uso potencial en la terapia génica, tratando de explotar la capacidad natural de estas partículas para transportar material genético e integrar sus genes al genoma del hospedero (Verma & Weitzman, 2005). Además de explotar dicha aplicación en terapia génica, han adquirido un gran auge las investigaciones enfocadas al encapsulamiento de proteínas con la finalidad de administrar dichas moléculas como agentes terapéuticos por medio de las VLPs. De los modelos más utilizados han sido la encapsulación de la proteína verde fluorescente (GFP) y la mCherry debido a su fácil detección (Schmidt *et al.*, 2001; Abbing *et al.*, 2004; Minten *et al.*, 2010; O'Neil *et al.*, 2012). A la fecha, existen algunos trabajos en los que se han encapsulado enzimas dentro de estos contenedores, generando nanobiorreactores con propiedades y capacidades catalíticas diferentes a sus contrapartes sin encapsidar (Patterson *et al.*, 2013). Como ya se mencionó anteriormente, el uso de las VLPs como vehículos ofrece grandes ventajas, entre las más importantes para el transporte de proteínas terapéuticas están su amplia capacidad de carga y la protección contra la degradación por proteasas y la función como barrera contra el reconocimiento por el sistema inmune (Inoue *et al.*, 2008 & O'Neil *et al.*, 2013).

Existen dos retos importantes para el uso de las VLPs como nanovehículos: a) La reducción de la respuesta inmune al ser introducidas al organismo. La modificación superficial con polímeros como el polietilenglicol (PEG) y poli-N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (poli-HPMA) tiene la finalidad de disminuir la inmunogenicidad de la partícula evitando así su rápida eliminación del organismo (Kreppel & Kochanek, 2008). b) La funcionalización de las partículas es, sin duda, uno de los campos más activos de investigación y que tiene como objetivo la posibilidad de entregar cargamentos a células específicas (Cornelissen, 2012).

1.2.1 Reducción de la inmunogenicidad de las VLPs

Como se mencionó anteriormente, uno de los compuestos más utilizados para reducir la inmunogenicidad en el suministro de medicamentos es el polietilenglicol (PEG), este es un polímero anfipático cuya estructura básica es $\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$. Esta es una

molécula neutra no inmunogénica que puede ser sintetizada en diferentes longitudes. Es importante resaltar su aprobación por la Agencia Norteamericana de Alimentos y Drogas (FDA) para su uso en cosméticos, alimentos y medicamentos. Actualmente existen abundantes publicaciones y algunos productos farmacéuticos comerciales en donde la unión covalente del PEG sobre moléculas reduce significativamente su antigenicidad e inmunogenicidad, así como incrementando su solubilidad, logrando mantener su bioactividad *in vivo* (An *et al.*, 2007; Kreppel & Kochanek, 2008; Akhtar *et al.*, 2012; da Silva Freitas *et al.*, 2013).

1.2.2 Funcionalización y direccionamiento de VLPs a células de cáncer

Uno de los campos de investigación en medicina y farmacología con gran futuro ha sido el proceso llamado en inglés “drug delivery” (suministro controlado de medicamentos) el cual tiene como finalidad el direccionamiento de biomoléculas a tejidos específicos, el cual se describirá con mayor detalle más adelante. Se han reportado diferentes casos de éxito, como el direccionamiento de nanopartículas (puntos cuánticos) hacia células cancerosas mediante la funcionalización con un péptido (arginina-glicina-ácido aspártico) para dirigirse y visualizar la vascularización de tumores, mostrando buena especificidad y mediante una posterior pegilación se consiguió una mejor estabilidad (Cai *et al.*, 2006). Así como el suministro de manera intravenosa de fragmentos de ADN a gliomas con fines de terapia génica utilizando la conjugación de las partículas con la clorotoxina (un polipéptido que se une específicamente a los receptores expresados en los gliomas) logrando el acoplamiento específicamente a las células tumorales del sistema nervioso (Huang *et al.*, 2011).

1.3 Bacteriófago P22

Se ha estimado que de la vasta cantidad de biomasa que comprenden los virus en la Tierra, los más abundantes son los bacteriófagos con cola constituidos de DNA de doble cadena (dsDNA), este es el caso del bacteriófago P22 el cual infecta *Salmonella typhimurium* (Parent *et al.*, 2010). El ensamble *in vivo* del P22 involucra la co-

polimerización de 420 proteínas de la cápside (coat protein, CP) (producto del gen 5; gp5), con la ayuda de 60 a 300 copias de la proteína de andamiaje (scaffolding protein, SP) (gp8), así como también de algunas proteínas minoritarias (proteínas del portal y de expulsión) (Suhanovsky *et al.*, 2010 & Parent *et al.*, 2010). La proteína de andamiaje (SP) es la que dirige el ensamblaje y promueve la incorporación de las proteínas de la cápside (CP) al centro de nucleación logrando una nanoestructura icosaédrica de 58 nm conocida como procápside (Fig. 2). La posterior maduración del virus involucra el empaquetamiento del DNA mediante las proteínas del portal al mismo tiempo que las proteínas de andamiaje son expulsadas de la estructura (ocurre una expansión de la cápside, 63 nm); finalmente son incorporadas las proteínas de cola, dando como resultado el virus en su forma infectiva (Teschke & Parent, 2010).

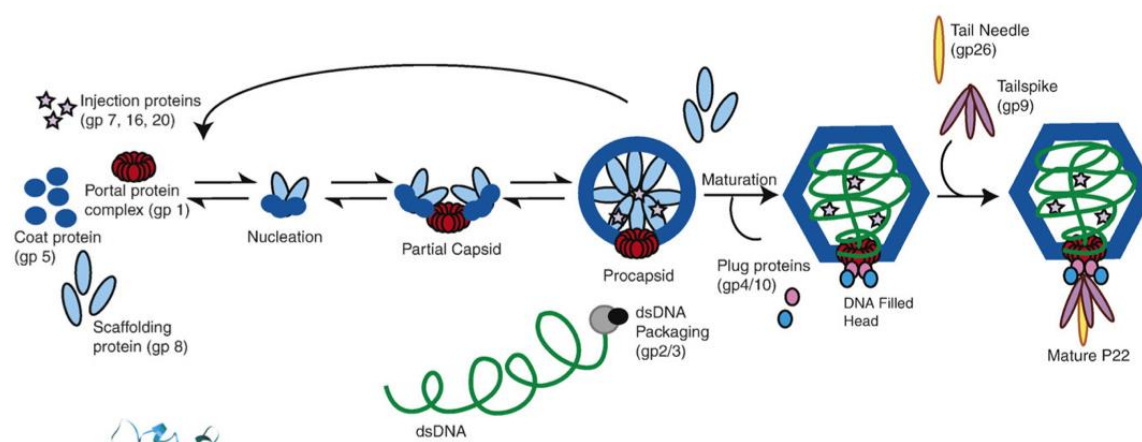


Figura 2. Ruta de ensamble del bacteriófago P22 (Modificado de Teschke, 2010).

La característica interesante del bacteriófago P22 es su mecanismo de autoensamble, para obtener la nanopartícula en su estructura de procápside, tan sólo requiere la proteína de andamiaje (para dirigir la nucleación) y la de la cápside (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la proteína de cápside no llega a ensamblarse en ausencia de la proteína de andamiaje, o en su defecto por altas concentraciones de la misma, como resultado son observadas cápsides icosaédricas T=4 y estructuras aberrantes con forma de espiral (Suhanovsky *et al.*, 2010).

La arquitectura de la procápside es el resultado del ensamble de 71 capsómeros constituidos por la proteína de la cápside, de los cuales 60 son hexámeros y 11 son pentámeros (Fig. 3A). En cuanto a la proteína de la cápside, esta se encuentra formada

por 430 aminoácidos que comprenden una masa de aproximadamente 47 kDa que a su vez se encuentran plegados en 6 dominios distintos (Fig. 3B). De acuerdo a la organización de los capsómeros, los hexámeros se encuentran distorsionados, presentando en el centro un poro con un diámetro que va de los 3 a los 4.5 nm (Thuma-Commike *et al.*, 1996 & Parent *et al.*, 2010).

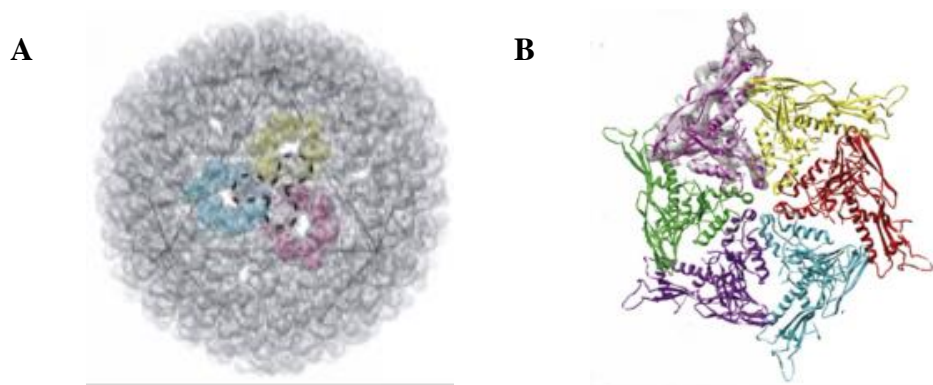


Figura 3. Conformación de la estructura de la cápside del bacteriófago P22. A) Modelo de cryoreconstrucción mostrando el arreglo de 3 hexámeros de la procápside. B) Capsómero de la proteína de la cápside (CP) mostrando los seis dominios (Modificados de Parent, 2010) y el ensamblaje del bacteriófago P22 (Modificado de Teschke & Parent, 2010).

1.4 Citocromos P450

Los citocromos P450 (CYPs) forman una familia grande de hemoproteínas microsomales que catalizan muchos tipos de reacciones de oxidación sobre sustratos endógenos y exógenos. Se han identificado más de 270 familias diferentes de CYPs, de las cuales 18 han sido identificadas en mamíferos (Huttunen *et al.*, 2008). En general, los CYPs que metabolizan compuestos endógenos son muy específicos para ciertos sustratos, mientras que los CYPs que metabolizan compuestos exógenos presentan una baja especificidad y son capaces de transformar una gran variedad de compuestos (Huttunen *et al.*, 2008).

Los CYPs son hemoproteínas que catalizan una gran variedad de reacciones, como la hidroxilación de cadenas largas de amidas y alcoholes e igualmente la epoxidación de ácidos grasos insaturados de cadena larga (Vidal-Limón *et al.*, 2013). En el caso particular de los CYPs, estos son responsables de metabolizar los compuestos xenobióticos, por tanto estos se encargan de la detoxificación del organismo presentando

de igual forma un amplio rango de especificidad (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014). La importancia médica del estudio de los CYPs radica en la capacidad que tienen para metabolizar fármacos, exhibiendo un gran potencial para su uso como proteínas terapéuticas debido a que son los responsables de activar profármacos, principalmente aquellos implicados en quimioterapia y antivirales (Huttunen *et al.*, 2008 & Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014).

De manera general, los CYPs presentan similitud en cuanto a su estructura y mecanismo general de acción, aunque algunos presentan marcadas diferencias en funciones más detalladas. La reacción básica catalizada por estas enzimas es la monooxigenación, en donde un átomo de oxígeno es incorporado al sustrato, esta oxidación puede realizarse en átomos de carbono o de igual forma en heteroátomos (N, S, P, I) (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014).

1.4.1 CYP de *Bacillus megaterium*

La oportunidad para desarrollar sistemas enzimáticos para la detoxificación y biotransformación ha logrado diversos avances, como es el caso particular del CYPBM3. Este es un citocromo P450 proveniente de *Bacillus megaterium*, ha sido ampliamente estudiado debido a su gran estabilidad y solubilidad a diferencia de citocromos de eucariontes. Diversas mutantes han sido generadas a partir de esta enzima con el fin de mejorar sus propiedades catalíticas por sustratos específicos. Una de estas mutantes es la variante CYPBM3 “21B3” la cual fue generada por Cirino y Arnold (2003), contiene únicamente el dominio hemo e incluye la mutación F87A así como otras 9 substituciones generadas por mutagénesis al azar, con esto se logró que la enzima tenga un significativo aumento en la actividad peroxigenasa, una disminución en la K_M (constante de Michaelis) para el peróxido de hidrógeno de la enzima original (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014).

1.5 Terapia de activación de profármacos

La mayoría de los compuestos químicos utilizados en quimioterapia son administrados como profármacos, de tal forma que deben ser activados y por tanto transformados en el

fármaco con potencial anticarcinogénico. Esta activación es realizada principalmente por los citocromos de la superfamilia P450. Una gran parte de dichos profármacos son activados en el hígado, en donde comúnmente los citocromos se encuentran sobre-expresados, mientras que en otros tejidos la expresión de los CYP varía significativamente (Choudhary *et al.*, 2003). Es importante hacer notar que en algunos casos como en el cáncer de mama, la actividad CYP es mucho menor en el tumor que en las células sanas circundantes (Zhao *et al.*, 2012). Como respuesta a esta problemática existe lo que se conoce como terapia de activación de profármacos utilizando enzimas exógenas, que tiene como objetivo aumentar la concentración local del fármaco activo en las células tumorales, lo cual incrementaría la eficiencia del medicamento en el tumor y reduciría la toxicidad producida por el fármaco en el resto de las células del hospedero (Hetch & Wazman, 2000 & Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014).

La terapia de activación de profármacos antes descrita se lleva a cabo en dos pasos; en el primero, la enzima exógena debe ser dirigida a las células de interés y acumularse en el sitio para posteriormente, en un segundo paso, administrar el profármaco (ya sea de manera dirigida o sistémica), activándose selectivamente en las células blanco (Al-Lazikani *et al.*, 2012). A grandes rasgos, se han propuesto dos métodos para llevar a cabo el suministro de la enzima capaz de activar el profármaco a las células de interés: mediante el suministro de genes que codifican las enzimas activadoras, conocido por sus siglas en inglés como GDEPT (gene-directed enzyme prodrug therapy) (Xu & McLeod, 2001 & Dachs *et al.*, 2005); y la terapia basada en anticuerpos, conocida como ADEPT (antibody-directed enzyme prodrug therapy) (Niculescu-Duvaz & Springer, 1997 & Francis *et al.*, 2002).

Debido a lo anterior, el presente proyecto propone como una alternativa terapéutica, el desarrollo y producción de VLPs estables capaces de contener estas enzimas terapéuticas y que sean reconocidas por las células tumorales con el objetivo de utilizarlos como nanobiorreactores para la activación de profármacos.

Capítulo 2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

Las moléculas de la variante del citocromo P450 de *Bacillus megaterium* encapsuladas en procápsides del bacteriófago P22, recubiertas con polietilenglicol y funcionalizadas con ácido fólico serán reconocidas específicamente por células cancerosas. Además tendrán la capacidad de activar el profármaco tamoxifen utilizado en quimioterapia.

2.2 Objetivo principal

Diseñar, producir y caracterizar partículas tipo virus (VLPs) del bacteriófago P22 con actividad citocromo P450 para su uso como nanobiorreactores para la activación de profármacos y que sean inmunológicamente inertes, además de ser reconocidas específicamente por células cancerosas.

2.2.1 Objetivos particulares

- Producción de VLPs del bacteriófago P22 que contengan el CYPBM3 en su interior mediante la expresión diferencial en células electrocompetentes de *E. coli* BL21 DE3.
- Diseño de una estrategia eficiente de purificación de VLPs P22-CYP.
- Reducir la inmunogenicidad de las VLPs P22-CYP mediante la pegilación.
- Inserción y evaluación de la actividad de los nanobiorreactores dentro de células cancerosas HeLa.
- Direccionamiento de las VLPs P22-CYP *in vitro* hacia células cancerosas de la línea celular HeLa mediante la funcionalización con ácido fólico.

- Estudio de muerte celular de células cancerosas HeLa direccionadas con VLPs P22-CYP funcionalizadas.

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1 Plásmidos (Anexo 1)

- **pBAD CYP-SP** (resistente a ampicilina, promotor araBAD, inducible por arabinosa, gen que codifica para el CYPBM3 “21B3” fusionado a SP₁₄₁₋₃₀₃, un fragmento de la proteína de andamiaje del bacteriófago P22. Suministrado por la Dra. Lorena Sánchez quien lo clonó y expresó previamente.
- **pRSF CP P22** (resistencia a kanamicina, promotor T7, inducible por IPTG, gen que codifica para la proteína de la cápside del bacteriófago P22). Suministrado por el Dr. Trevor Douglas, Indiana University.

3.2 Cepas

- ***Escherichia coli* BL21 DE3 pLysS** (contiene el gen de la T7 RNA polimerasa controlado por el promotor lacUV5 en su DNA cromosomal y el gen lisozima T7 en el plásmido pLysS). Suministrado por la M. en C. Viviana Cabanillas, Unidad de Desarrollo Biomédico CICESE.

3.3 Expresión diferencial del CYPBM3-SP y CP P22

Los plásmidos pBAD CYP-SP y pRSF CP P22 (30 ng de cada uno) se electroporaron en 50 µL de células competentes BL21 DE3 pLysS. Al final de 1 hora de recuperación, 10 µL de células fueron plaqueadas en cajas de LB con ampicilina y kanamicina y fueron crecidas por 16 h a 37°C. Se realizó un screening para obtener la clona que fuera inducible por IPTG y L-arabinosa y que presentara altos niveles de expresión, corroborado mediante la separación de las proteínas en un gel SDS-PAGE al 12%, que se corrió a 20 mA y se tiñó con InstantBlue (Expedeon, Cambridge, UK).

Se expresó primero la proteína CYP-SP para posteriormente expresar la proteína de la cápside CP. Se llevó a cabo 1 L de cultivo, se tomaron 10 mL de un precultivo de la

cepa transformada para inocular el cultivo de medio TB (Terrific Broth) con ampicilina y kanamicina suplementado con 0.5 mM de tiamina y elementos traza. Se dejó crecer a 35 °C a 150 rpm durante 7 h. En este punto se indujo la expresión de la proteína CYP-SP adicionando 0.125% de L-arabinosa y 1 mM de ácido aminolevulínico. Se dejaron crecer los cultivos por 16 h más a 30 °C a 120 rpm. Finalmente se indujo la expresión de la CP adicionando 0.3 mM de IPTG y se crecieron los cultivos por 3 h más a 30 °C y 150 rpm.

Al término de la inducción los cultivos se centrifugaron en frío a 3840 x g por 10 min, se resuspendieron las células en amortiguador de lisis (50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.6) y se sonicó la muestra. Se centrifugó a 12000 g por 30 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante.

3.4 Purificación de VLPs P22-CYP

La purificación de las cápsides del P22 que contienen citocromo como cargo se realizó mediante un esquema de dos pasos: ultracentrifugación y posteriormente una cromatografía por filtración en gel.

Una vez recuperado el sobrenadante (aproximadamente 100 mL por litro de cultivo) proveniente de la lisis celular, se ultracentrifugó utilizando un colchón de sacarosa al 35% (5 mL) preparado en amortiguador PBS (50 mM Na₂HPO₄, 25 mM NaCl, pH 7). La ultracentrifugación se llevó a cabo a 215,000 g (42 240 rpm) durante 1 h a 4°C utilizando el rotor de ángulo fijo 50.2 Ti Beckman Coulter, Inc. (Optima XPN-100 Ultracentrifuge, Beckman Coulter). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en amortiguador PBS (aproximadamente 2.5 mL) utilizando agitación leve y constante.

Posteriormente la muestra se centrifugó a 12000 x g por 15 min a 4 °C (remoción de agregados) y se cargó en una columna de filtración en gel HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR (GE Healthcare) utilizando un flujo de 1 ml/min de amortiguador PBS en el equipo ÄKTA prime plus (GE Healthcare). La cromatografía tuvo una duración de 125 min. Las fracciones correspondientes a la elución de las cápsides correctamente ensambladas (con un pico máximo alrededor de los 59 min) fueron colectadas y posteriormente

concentradas por medio de una ultracentrifugación (sin colchón de sacarosa) a 215,000 g durante 1 h a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de cápsides en 100 mM Tris-HCl pH 8 utilizando agitación leve y constante a 4 °C.

Una vez resuspendidas las cápsides virales se analizaron mediante el microscopio electrónico de transmisión (TEM). Para esto se utilizó la técnica de tinción negativa, colocando las VLPs P22-CYP en una rejilla de cobre de 400 mesh, cubiertas con una película fina de carbón, durante dos minutos. Posteriormente, se retiró el exceso de la muestra con papel filtro (Whatman No.4) y se realizó la tinción negativamente con acetato de uranilo al 2% durante un minuto. Las observaciones fueron analizadas con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2010 (JEOL Ltd., Peabody, MA, USA).

3.4.1 Perfil de desensamble de VLPs P22-CYP

Se utilizó el protocolo de desensamble de la cápside del bacteriófago MS2 reportado por Glasgow *et al.* (2012) con ciertas modificaciones. Una muestra de 10 mg/mL de VLPs en buffer Tris-HCl pH 8 es mezclada con ácido acético glacial frío a una concentración final de 66% de ácido. La mezcla es incubada en hielo por 30 min, posteriormente es cargada en un gel de agarosa al 1% bajo un voltaje constante de 40V a 4 °C durante dos horas.

3.5 Determinación de la concentración y actividad CYP de VLPs P22-CYP

Se realizó un ensayo de unión a CO, el cual es específico para los citocromos P450. El CO tiene una gran afinidad por el hierro presente en el CYP, en su forma reducida (Fe^2), dicha unión forma un complejo que produce un espectro con un máximo de absorción a 450 nm. A través de dicho ensayo es posible determinar la integridad del CYP, ya que la pérdida en la actividad del CYP está asociada a una pérdida en la banda a 450 nm (Guengerich *et al.*, 2009). Tomando como referencia el protocolo descrito por Guengerich *et al.*, 2009, se procedió a diluir 200 μL de las VLPs P22-CYP en 2 mL de buffer Tris-HCl pH 8 y el volumen se dividió en cantidades iguales en dos celdas de plástico, posteriormente se tomó una celda como blanco (línea base) en un espectrofotómetro

Perkin-Elmer haciendo un barrido de 400 a 500 nm. Se removió la celda muestra del equipo y se realizó un burbujeo lento de CO dentro de la celda con una pipeta Pasteur insertada al fondo de la misma. El flujo de CO se reguló a alrededor de 60 burbujas por min. El CO se produjo al poner a reaccionar ácido fórmico con ácido sulfúrico. Posteriormente, se añadió a ambas celdas alrededor de 1 mg de ditionita de sodio y se disolvió el compuesto por inversión. Finalmente, se realizó la lectura de las muestras haciendo un barrido de 400 a 500 nm varias veces hasta que la banda de absorción a 450 nm no cambió (aproximadamente 35 minutos). Se anotaron las absorbancias a 450 y 490. Se utilizó un $\epsilon_{450} = 0.091 \text{ nM cm}^{-1}$.

$$[CYP] = \frac{\Delta(Abs_{450} - Abs_{490})}{0.091} \times \text{dilución} = \mu\text{M P450}$$

Se probó la actividad de las cápsides P22 con CYP encapsulado utilizando como sustrato el 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMF) a 500 μM y el H_2O_2 como aceptor de electrones. La determinación de actividad se realizó con una concentración final de 5 mM de peróxido de hidrógeno. Para la determinación de la cantidad de la enzima encapsulada que se utilizó para el ensayo, se realizó el método concentración por unión a CO, específico para CYPs. La actividad catalítica fue monitoreada espectrofotométricamente a 468 nm ($\epsilon_{468} = 14800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) usando un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-Vis. Las constantes catalíticas se obtuvieron por medio del programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.).

3.6 Lipofección de VLPs P22-CYP en la línea celular de carcinoma cervical humano (HeLa)

Se utilizó la línea celular HeLa proveniente de carcinoma cervical humano. Los cultivos celulares se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado al 10% con suero fetal bovino (FBS), 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin, 100 U/mL de penicilina y 2 mM de L-glutamina. Los cultivos se mantuvieron en atmósfera húmeda a

37 °C y con un contenido de CO₂ del 5%. La línea celular fue subcultivada por tripsinización cada 2 días, de forma de mantener una confluencia menor o igual a 70%. Todas las líneas celulares que se utilizaron fueron de un margen de tiempo que no superó los 12 pases o ciclos de cultivo.

Para la lipofección se utilizaron 2.5×10^5 células HeLa por cada muestra en cajas Petri de 35 mm con fondo de vidrio (MatTek, 35 mm glass bottom dishes No. 15) en medio DMEM después de 12 hrs a 37°C y 5% de CO₂ para permitir su adhesión. Se realizaron dos tratamientos utilizando dos concentraciones diferentes de VLPs, 1.57×10^{11} y 3.14×10^{11} . Para cada tratamiento en tubos separados se añadieron: las VLPs en 100 µL de medio DMEM; por otro lado 3 y 6 µL, por cada tratamiento respectivamente, de lipofectamina 2000 (Life Technologies) en 100 µL de medio DMEM; se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclaron las VLPs y la lipofectamina de acuerdo a cada tratamiento, dejando incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se añadió cada uno de los tratamientos a las placas que contienen las células, una por tratamiento, se dejaron incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregó medio DMEM a cada placa y se incubó por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se lavó con PBS (NaCl 120 mM, KCl 2.7 mM y búffer fosfato 10mM y pH 7.4) y se incubó en medio DMEM por 12 hrs a 37°C y 5% de CO₂.

3.7 Ensayo de actividad citocromo P450 en células HeLa lipofectadas con VLPs P22-CYP

La actividad citocromo P450 se determinó utilizando 7-benciloxiy-4-(trifluorometil) coumarina (BFC, Invitrogen), una vez que las células fueron lipofectadas con las VLPs P22-CYP. El medio de las placas con las células lipofectadas fue removido, y se agregó BFC para una concentración final de 2 mM diluido en medio completo y se dejó incubando por 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂, al final se cambió por medio fresco. Posteriormente, se añadió H₂O₂ hasta una concentración final de 3 mM y se dejó incubando por 10 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Se removió el medio y se lavó con PBS, y al final se agregó medio fresco y se incubó durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Por último, se retiró el medio y se agregó 1 mL de solución fijadora (formaldehído al 4% diluido en PBS) y se incubó por 10 minutos en frío y en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de fijación, se retiró el fijador y se lavó en dos ocasiones con PBS. Se agregó 1 mL de solución de permeabilización (Tritón 0.5% en PBS) y se incubó por 15 minutos en frío y en oscuridad. Posteriormente, se removió la solución de permeabilización, se agregó DAPI y se incubó por 10 min en agitación constante a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró el DAPI y se realizaron cinco lavados con PBS de 1 min por lavado, y al término de los lavados las muestras se mantuvieron en la solución de PBS y a 4°C bajo oscuridad.

En cuanto a la placa control, esta se procesó de igual forma que es descrito anteriormente con la excepción de que las células no fueron lipofectadas con las VLPs P22-CYP. Todas las muestras se analizaron utilizando el microscopio confocal Olympus FluoView FV1000 (Olympus, Japan).

3.8 Pegilación de VLPs P22-CYP

Se realizó la modificación de la superficie de las VLPs utilizando un polietilenglicol funcionalizado con ácido fólico, el cual por el otro extremo contiene un éster de succinimida (Ácido fólico-PEG₅₀₀₀-NHS) obtenido de Nanocs Inc. (New York, NY). La reacción se llevó a cabo a pH 8 con un exceso de 5 en base molar a los aminos libres de la cápside a temperatura ambiente. La comprobación de las VLPs pegiladas fue realizada mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una columna Zorbax GF-250 (Agilent, 0.94 x 25 cm, 4 µm), el equilibrio y la fase de elución se realizaron con agua destilada.

3.9 Ensayo de citotoxicidad en células HeLa

Se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad para evaluar la sensibilidad de las células HeLa al tamoxifen, el cual es activado por los nanobiorreactores. Con el fin de comparar las respuestas tanto para VLPs P22-CYP pegiladas y no pegiladas, se realizaron

paralelamente dos bloques de mediciones; en el primero, las VLPs P22-CYP no pegiladas fueron lipofectadas según el método anteriormente descrito; en el segundo, las VLPs P22-CYP pegiladas y funcionalizadas fueron direccionadas hacia los receptores de folato presentes en las células HeLa. Para ambos bloques se emplearon 3.14×10^{11} VLPs. Una vez que las células fueron lipofectadas o direccionadas, se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 10,000 células por pozo y por triplicado para cada tratamiento en 100 μ L de medio DMEM, e incubadas durante toda la noche. Al día siguiente, se adicionó 3 mM de H_2O_2 a las células y se incubaron por 10 minutos a 37 °C y 5% de CO_2 , se removió el medio y se lavó con PBS,. Al final las células fueron tratadas con 0.007, 0.015, 0.031, 0.062, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mM de tamoxifen diluido en medio fresco y se incubaron toda la noche a 37°C y 5% de CO_2 . Cumplido el tiempo de tratamiento, se adicionaron 100 μ L de MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis) en concentración 0.5 mg/mL en cada pozo con medio sin suplementar. Las células fueron incubadas durante 4 horas a 37 °C y 5% de CO_2 . Al final del período de incubación se eliminó el sobrenadante y se adicionó isopropanol acidificado con HCl 0.05 N. Para la lectura de las placas de cultivo, se midió la absorbancia a 570 nm para el muestreo y a 690 nm como longitud de onda de referencia por medio del espectrofotometro (Mutiskan GO; Thermo Scientific, USA).

3.10 Evaluación de la estabilidad frente a degradación por proteasas

Los ensayos de proteólisis se llevaron a cabo utilizando como muestras la enzima CYPBM3 libre, VLPs P22-CYP y las VLPs P22-CYP pegiladas y funcionalizadas con ácido fólico. Las tres muestras fueron tratadas con 100 U de tripsina, incubando por 148 horas a 37°C. Al termino del tiempo se tomó una alícuota de la muestra y se midió la actividad residual en buffer 100 mM Tris-HCl pH 8 utilizando como sustrato 500 μ M de 2,6-DMF e iniciando la reacción con 5 mM de H_2O_2 .

Capítulo 4. Resultados y Discusión

4.1 Obtención de clonas para la producción de VLPs P22-CYP

Para llevar a cabo la encapsulación del citocromo CYPBM3 dentro de la cápside del bacteriófago P22 *in vivo*, se seleccionó la cepa *Escherichia coli* BL21 DE3 pLysS la cual contiene la T7 RNA polimerasa capaz de reconocer el promotor T7 presente en la proteínas de la cápside CP.

Se realizó una electroporación utilizando ambos plásmidos (pBAD CYP-SP y pRSF CP P22) al término de este paso las células fueron depositadas en cajas con medio LB adicionadas con ampicilina y kanamicina. Una vez formadas las colonias, se realizó un screening para seleccionar una clona capaz de sobreexpresar ambas proteínas. Para esta exploración se pusieron precultivos de 9 colonias en medio LB adicionado con ambas resistencias, posteriormente se tomaron 250 μ L de los precultivos (excepto uno para utilizarlo como control) para inocular medio fresco LB adicionado con ambas resistencias en dos esquemas diferentes; el primer grupo añadiendo 0.5 mM de IPTG para la inducción de la proteína de la cápside CP (Fig. 4A), en el segundo grupo añadiendo 0.125% de L-arabinosa (Fig. 4B).

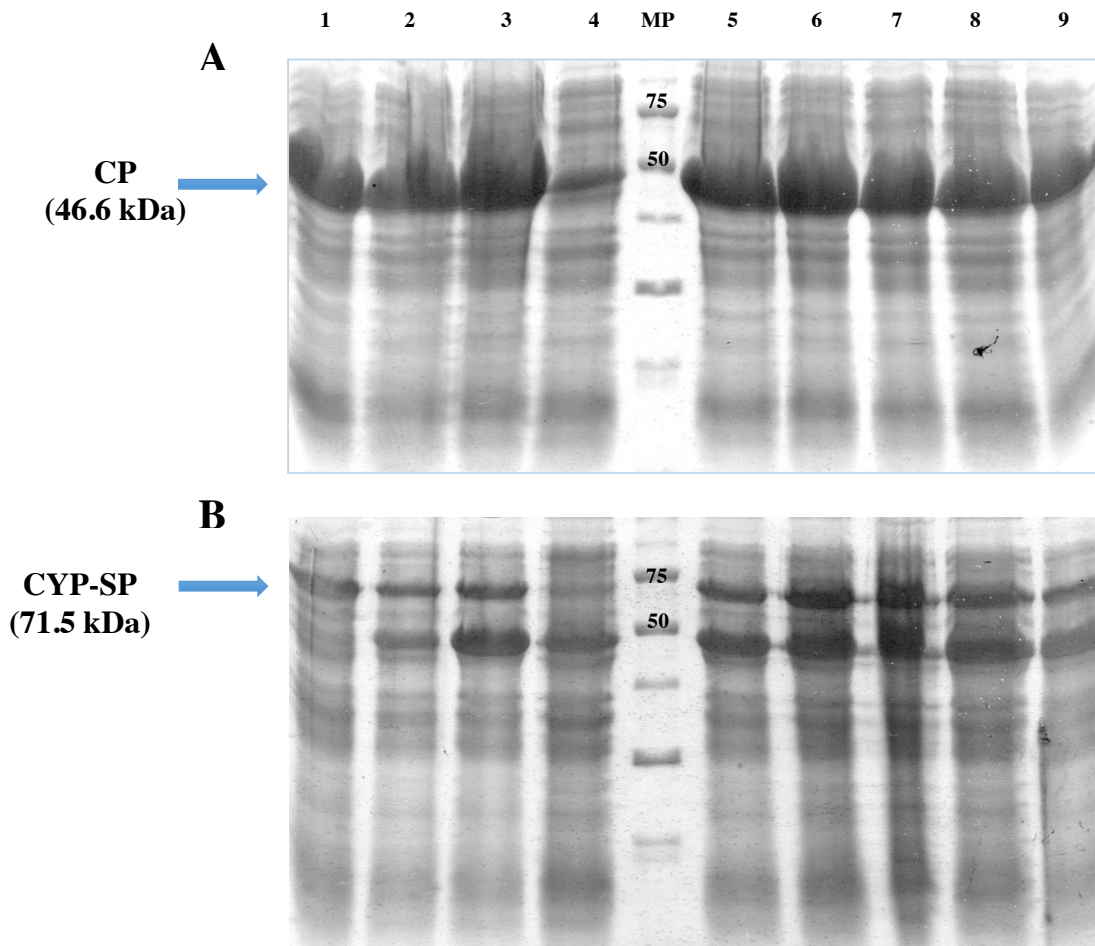


Figura 4. SDS-PAGE al 12% de 8 clones BL21 DE3 pLysS pBAD CYP-SP + pRSF CP P22, clona 4 control sin inductor, MP = marcador de peso molecular (Precision Standard 250 kDa, Bio-Rad Labs). A) Inducción con 0.5 mM IPTG. B) Inducción con 0.125% L-arabinosa.

Como se puede observar en la figura 4B, existe una expresión basal de la proteína de la cápside (46.6 kDa) lo cual sugiere realizar un ajuste en la inducción añadiendo cloranfenicol al medio para activar la represión de T7 RNA polimerasa y así evitar la sobreexpresión de la proteína de la cápside ya que como se ha descrito en trabajos previos, la expresión temprana de la proteína de la cápside ocasiona una mayor proporción de especies aberrantes. De acuerdo a este ensayo, se seleccionaron las clones 1 y 6 ya que como se puede observar en la figura 4, estas presentan aparentemente una menor expresión basal de la proteína de la cápside.

4.2 Expresión diferencial para la encapsulación *in vivo* del CYPBM3 en cápsides P22

Como se ha detallado anteriormente, los genes fueron clonados en distintos vectores (pBAD-CYPBM3-SP y pRSF-CP P22) para poder realizar la inducción de los genes de manera diferencial. En este caso, el gen que codifica para el CYP-SP fue expresado primero y posteriormente se realizó la inducción del gen de la proteína de la cápside.

La expresión diferencial se inició utilizando un precultivo de la clona 6 para inocular 1 L de medio TB en un esquema de inducción representado en la figura 5.

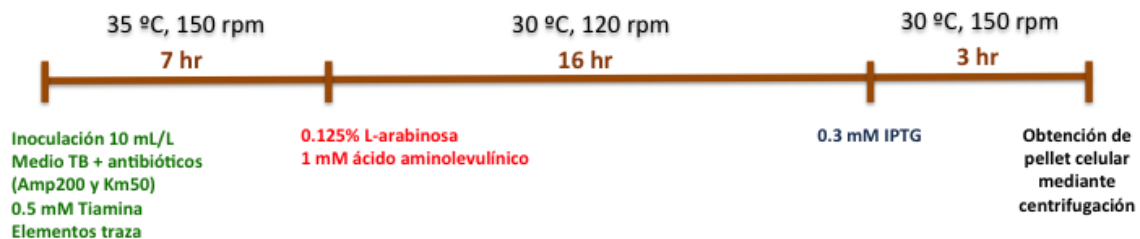


Figura 5. Esquema de inducción para la encapsulación *in vivo* CYP-SP en P22.

Una vez realizada la inoculación con el precultivo de la clona seleccionada, se expresa primero el CYP fusionado a la SP truncada (únicamente el dominio C-terminal) utilizando la arabinosa como inductor del gen y el ácido aminolevulínico necesario para la síntesis del grupo hemo. Una vez realizada la inducción del CYP-SP se procede con la expresión de la proteína de la cápside utilizando IPTG como inductor, de esta manera se espera obtener una mayor proporción de cápsides correctamente ensambladas, debido a probablemente a una relación CYP-SP/CP más adecuada, como lo señala Lorena Sánchez en un trabajo previo.

Cabe señalar que al contrario del trabajo previo en donde se dividía el litro de medio en 4 matraces de 250 mL, en esta ocasión mediante este esquema se pudo obtener una mayor cantidad del pellet celular, aproximadamente 13 g, empleando un solo matraz capaz de contener el litro de cultivo.

4.3 Purificación de VLPs P22-CYP

Una vez realizada la sonicación del pellet celular procedente de la expresión diferencial, se llevó a cabo la purificación en dos pasos. La facilidad de este método involucra ultracentrifugación y cromatografía de filtración en gel, que resulta en una alta pureza según el trabajo previo, y por consiguiente se logra una ventaja importante para la producción de las VLPs derivadas del bacteriófago P22.

En cuanto al primer paso que es la ultracentrifugación con el colchón de sacarosa, fue llevado a cabo a 215,000 x g y los pellets fueron resuspendidos en frío con PBS y en agitación constante, logrando así aproximadamente 14 mL una vez realizada una centrifugación a 12,000 x g para remover agregados. Cabe señalar que hasta este paso ya nos permite observar el grado de pureza de las VLPs con citocromo en su interior, como se puede observar mediante un gel SDS-PAGE al 12% (Fig. 6, carril 9).

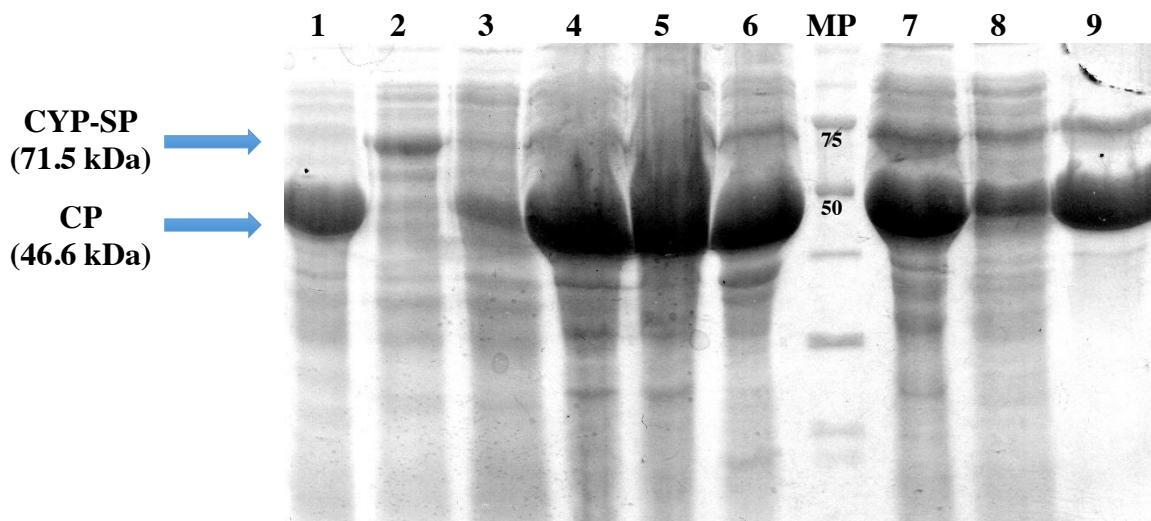


Figura 6. SDS-PAGE al 12% con muestras de expresión y primer paso de purificación. Carriles 1= Control positivo de cápside P22, 2= Control positivo de CYP-SP, 3= Control negativo sin inducción, 4= Muestra de 23 hr de expresión, 5= Muestra de 26 hr de expresión, 6= Muestra del pellet celular al término de la expresión, MP= Marcador de peso molecular (Precision Standard 250 kDa, Bio-Rad Labs), 7= Sobrenadante una vez realizada la sonicación, 8= Sobrenadante de la ultracentrifugación, 9= Pellet de la ultracentrifugación. Las muestras 1-6 son de 1 mL de extractos crudos, la muestra 7 es a partir de 15 μ L del sobrenadante, la muestra 8 de 30 μ L y la muestra 9 de 5 μ L

Como se puede observar en el carril 3 de la figura 6, existe una expresión basal de la proteína de la cápside, lo cual plantea una posible reducción mediante la adición de cloranfenicol al medio de cultivo de modo que promueva la transcripción de la lisozima (debido al plásmido pLysS de la cepa) y esta a su vez inhiba la expresión basal de la proteína de la cápside mediante el atrapamiento de la T7 RNA polimerasa. Los carriles del 1-6 son provenientes de muestras de 1 mL de extractos crudos, es por ello que se observa un barrido en el gel.

Con base en el SDS-PAGE de la figura 6, se realizó una cuantificación de las bandas mediante densitometría utilizando el software ImageJ (NIH); como control para la proteína de la cápside el carril 1, correspondiente a la inducción únicamente con IPTG; como control para la proteína CYP-SP el carril 2, correspondiente a la inducción con L-arabinosa (Fig. 7). En los carriles 4-6 pareciera que la proteína CYP-SP podría no estar siendo expresada, sin embargo esto no sucede, ya que como podemos observar en el carril 7 (correspondiente al sobrenadante después de la sonicación) la proporción de CP:CYP-SP es de 2.3:1, lo cual sugiere que el déficit en la cuantificación podría deberse al barrido observado en el gel, recordando que dichas muestras proceden de extractos crudos (Fig. 6), y no así por la inexistencia de la proteína. En cuanto al carril 9, correspondiente a la resuspensión una vez realizada la ultracentrifugación, la relación CP:CYP-SP es de 2.2:1, esto sugiere una pérdida mínima en la proporción de proteína que conforman las VLPs una vez que se inicia la purificación.

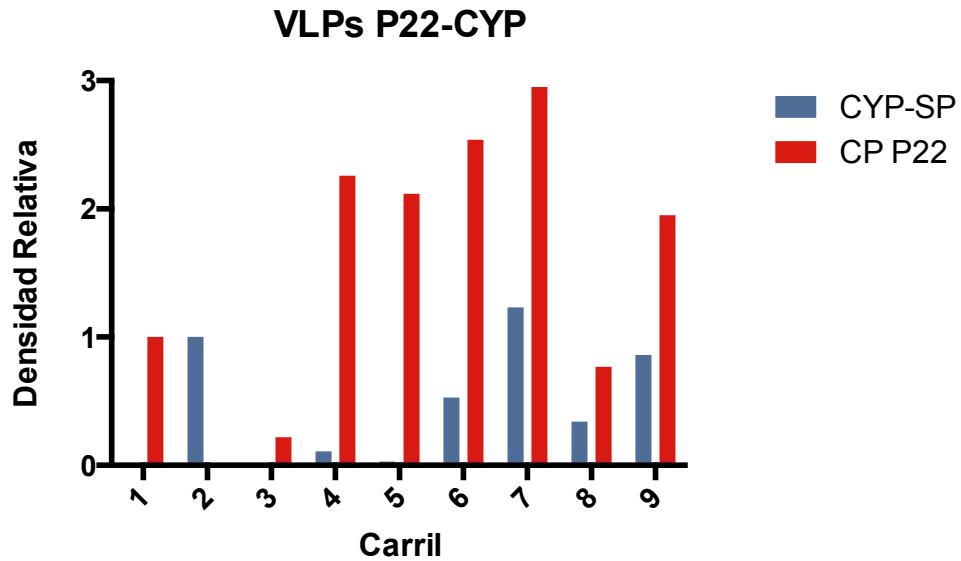


Figura 7. Gráfica que muestra la densidad relativa mediante densitometría utilizando el software ImageJ.

Una vez resuspendidos los pellets provenientes de la ultracentrifugación, se procedió al segundo paso de la purificación, el cual consiste en una cromatografía de filtración en gel. Se llevó a cabo durante un tiempo de elución promedio de 125 minutos mediante buffer PBS, inyectando 2 mL por corrida. En el trabajo previo de Lorena Sánchez ya se ha identificado que la proporción de cápsides correctamente ensambladas eluyen alrededor de los 65 min y las especies aberrantes a los 45 min, en el presente trabajo se encontró un pico máximo alrededor de los 59 min aparentemente perteneciente a cápsides correctamente ensambladas y un pico a los 48 min aparentemente de especies aberrantes (Fig. 8).

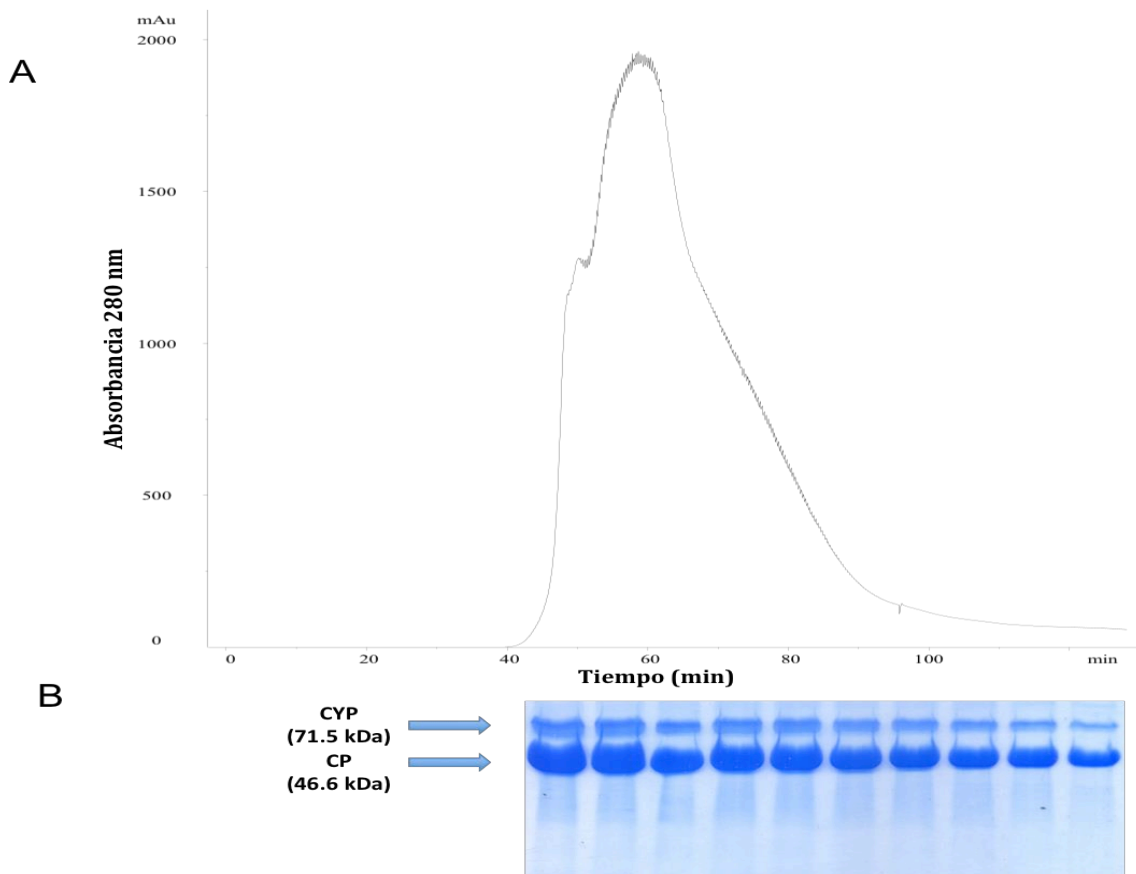


Figura 8. A. Cromatograma de filtración en gel por FPLC. Las estructuras correctamente ensambladas eluyen alrededor de los 59 min; las estructuras aberrantes eluyen alrededor de los 47 min. La elución de proteínas fue monitoreada a $\lambda=280\text{nm}$, B. Gel SDS-PAGE al 12% con muestras representativas de las fracciones colectadas mediante FPLC.

Se colectaron 3 grupos de fracciones: en el primer grupo se colectaron de la 44-50; en el segundo de la 51-66; y en el tercero del 67-89. Estos grupos de fracciones se concentraron mediante ultracentrifugación a $215,000 \times g$ a 4°C por 1 hr., y resuspendidos en frío en buffer Tris-HCl pH 8 en agitación leve y constante. Posteriormente, las muestras se analizaron por TEM para corroborar el grupo de fracciones que contenga la mayor proporción de VLPs correctamente ensambladas.

Por otro lado, cuando la temperatura de inducción para la proteína de andamiaje variaba hasta seis grados más de la requerida, se observó un incremento en la expresión basal de la proteína de la cápside. Debido a lo anterior, mediante de una cromatografía de filtración en gel se pudo observar un perfil que señalaba una mayor proporción de VLPs aberrantes bajo los mismos parámetros de purificación (Fig. 9). Estas

observaciones son semejantes a lo descrito por O'Neil *et al.* en 2013, en donde se reporta que una excesiva expresión basal de la proteína de la cápside logra ensamblarse tempranamente en corazas abiertas y aberrantes.

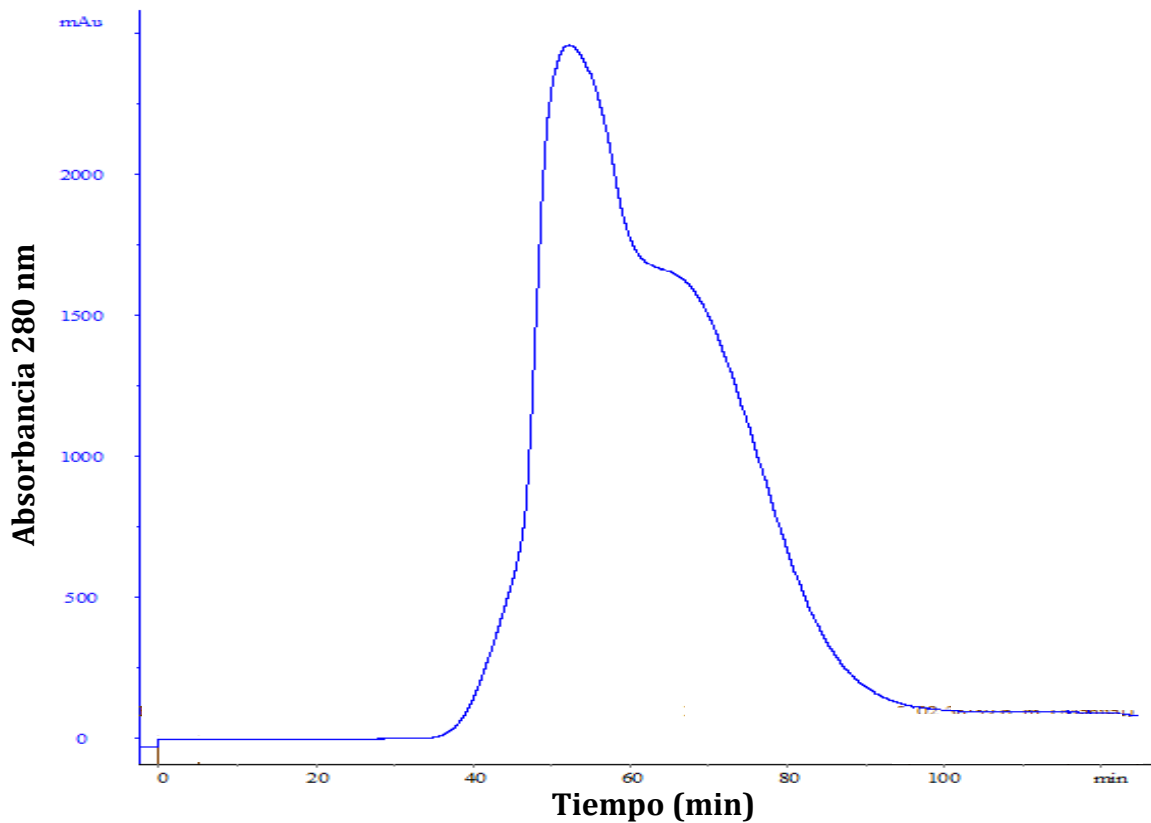


Figura 9. Cromatograma de filtración en gel por FPLC. Mayor proporción de estructuras aberrantes las cuales eluyen alrededor de los 47 min. La elución de proteínas fue monitoreada a $\lambda=280\text{nm}$.

4.3.1 Perfil de desensamble de VLPs P22-CYP

Una vez concentradas las VLPs se procedió a realizar un perfil de desensamble para determinar su correcta formación. Utilizando el protocolo modificado de Glasgow *et al* (2012), se observó mediante un gel de agarosa al 1% que las muestras con dicho tratamiento permanecen en el carril sin movimiento electroforético alguno (Fig. 10; carriles 2, 4 y 6), y no así para las muestras sin tratamiento (Fig. 10; carriles 1, 3 y 5). Como se puede observar en la muestra control de VLPs correctamente formadas (carril

5), se presenta una migración definida sin un aparente barrido. Por otro lado, las muestras concentradas una vez realizada la purificación (carriles 1 y 3) presentan un barrido definido lo cual podría indicar que existen poblaciones diferentes de VLPs.

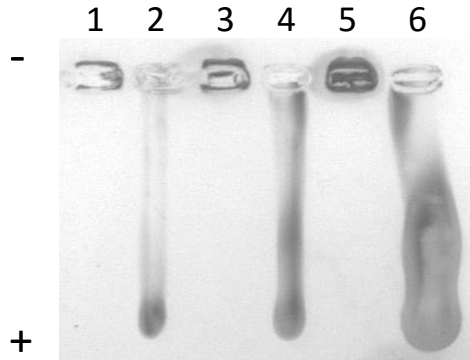


Figura 10. Perfil de desensamble en gel de agarosa al 1%. 1) VLPs control dilución 1:10 con tratamiento y 2) sin tratamiento; 3) VLPs dilución 1:20 con tratamiento y 4) sin tratamiento; 5) VLPs dilución 1:10 con tratamiento y 6) sin tratamiento. El gel de electroforesis se realizó utilizando una corriente de 40V a 4 °C durante dos horas teñido con Instant Blue.

Con base en lo observado en los perfiles de desensamble, se procedió a discriminar las VLPs correctamente formadas mediante geles de electroforesis una vez obtenidas las fracciones por FPLC. Se corrieron diversas muestras pertenecientes a las fracciones en un gel de agarosa al 1%, una vez que se logró la separación se seleccionaron las fracciones 67 a 100 debido a las observaciones antes descritas, finalmente se procedió a su concentración por ultracentrifugación (Fig. 11).

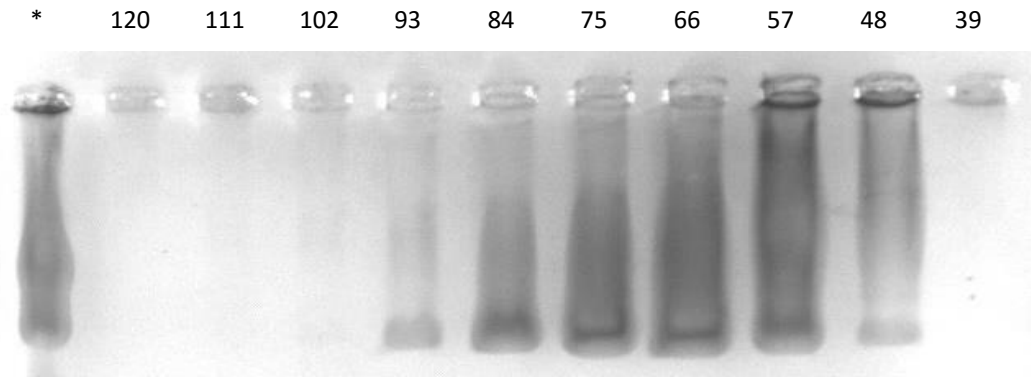


Figura 11. Gel de agarosa al 1% para la determinación de VLPs correctamente ensambladas. Los números corresponden al número de fracción obtenida mediante FPLC. La muestra (*) corresponde a un control negativo perteneciente a una fracción del sobrenadante una vez realizada la purificación por ultracentrifugación. El gel de electroforesis se realizó utilizando una corriente de 40V a 4 °C durante dos horas teñido con Instant Blue.

Una vez concentradas las fracciones, se procedió a realizar un gel SDS-PAGE al 12% para observar la presencia de las proteínas que conforman las VLPs y de esta forma confirmar el éxito de la purificación. Las muestras que se cargaron en el gel fueron el producto de diversas diluciones, desde 1:20 hasta 1:50 mostrando una alta proporción de las proteínas tanto de la cápside (CP = 46.6 kDa) como del citocromo (CYP-SP = 71.5 kDa) (Fig. 12).

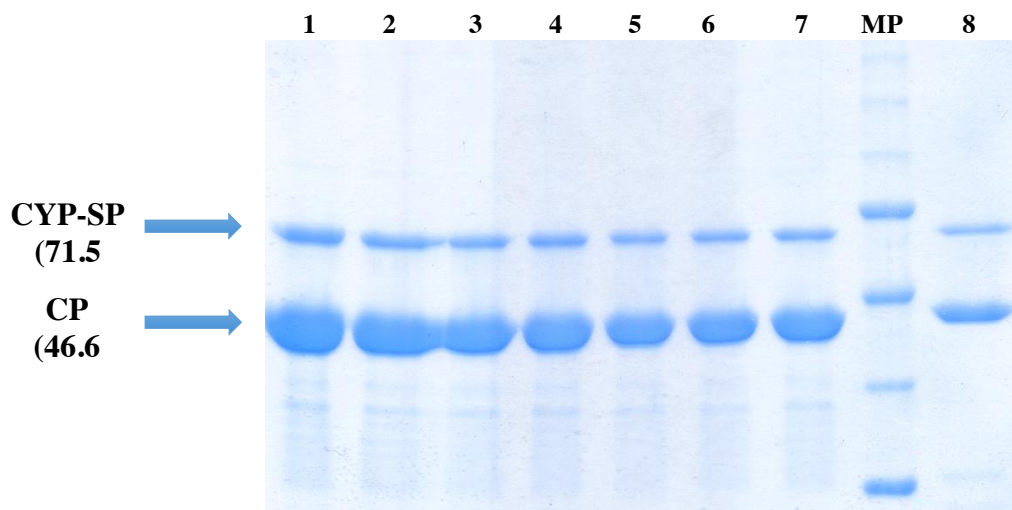


Figura 12. Gel SDS-PAGE al 12% que muestra las proteínas que conforman las VLPs una vez concentradas. Los carriles 1 al 7 son diluciones 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 y 1:50; MP = marcador de peso molecular; carril 8: el control positivo de VLPs.

Para el análisis cuantitativo de la concentración de las VLPs P22-CYP, se evaluó por densitometría tomando como referencia mediciones de absorbancia a 280 nm de la proteína total con NanoDrop 2000c (Thermo Scientific Inc., USA), bajo el supuesto de que en cada una de las diluciones la proporción de proteína de la cápside y la del citocromo fusionada a la de andamiaje siempre es igual en una misma población o lote de purificación. La concentración se estimó en 44.77 mg/mL de proteína total; donde 7.19 mg/mL ó 99.88 μ M corresponden al citocromo fusionado a la proteína de andamiaje; y 37.57 mg/mL u 806.43 μ M es la concentración correspondiente a la proteína de la cápside.

4.3.2 Análisis de las VLPs por medio de TEM

Utilizando la tinción negativa con acetato de uranilo, las muestras colectadas fueron analizadas mediante microscopia electrónica de transmisión. Mediante esta técnica de tinción, caracterizada por una distribución preferencialmente de contorno de las VLPs P22-CYP, permitió observar con buen detalle su morfología icosaédrica casi esférica propia de las partículas tipo virus. De igual forma, pudo observarse como efectivamente están totalmente llenas con las moléculas de citocromos P450 en su interior. Las dimensiones de las partículas y las imágenes respectivas se obtuvieron mediante el software ImageJ (U.S. National Institutes of Health), de esta forma se determinó el diámetro promedio de las VLPs P22-CYP, calculado como la media geométrica de dos mediciones ortogonales. Estos nanobiorreactores cuentan con un tamaño parcialmente homogéneo, igualmente observados en el perfil de desensamble, con un diámetro de 53.8 ($\pm$ 5) nm (Fig. 13).

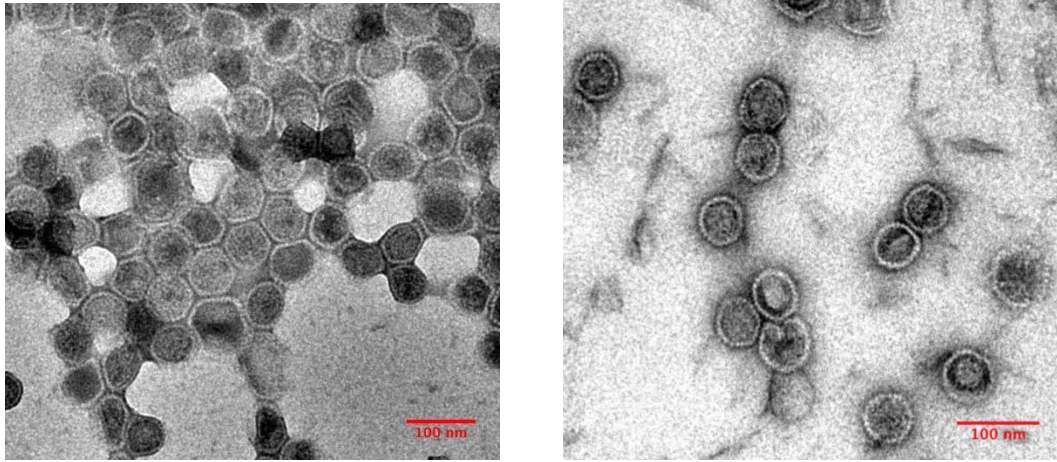


Figura 13. Nanobiorreactores P22-CYP vistos al TEM (200,000 V, 15,000X). Tinción negativa con acetato de uranilo. Diámetro promedio de 53.8 (± 5) nm. Barra de escala = 100 nm.

4.4 Determinación de la concentración y actividad CYP450 de VLPs P22-CYP

A pesar de que bajo el esquema de expresión diferencial se obtiene una gran cantidad de VLPs, existe una alta proporción de estructuras aberrantes, que como se explicó anteriormente esto se ha debido a la fuga en la expresión de la proteína de la cápside, la cual sucede en una fase prematura al autoensamble. Sin embargo, la proporción de citocromo activo dentro de las VLPs, obtenido por la relación de la concentración mediante el ensayo de CO entre la encontrada por el ensayo de densitometría, es del 32% (Tabla 1), lo cual es consistente con lo reportado por Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014.

Tabla 1. Concentraciones de CYP encapsuladas en VLPs P22.

Concentración de CYP por densitometría-Abs ₂₈₀ (μ M)	Concentración de CYP por ensayo de CO (μ M)	Relación de la concentración CO/densitometría-Abs ₂₈₀
99.88	31.99	0.32

Una vez determinada la proporción de citocromo activo dentro de las VLPs, se midió la actividad del mismo. Con base en los parámetros cinéticos utilizando el 2,6-DMF y H₂O₂, 500 μ M y 5 mM respectivamente, como sustratos reportados por Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014, lecturas tomadas a 468 nm a temperatura ambiente utilizando el

espectrofotómetro PerkinElmer. Se comprobó que las VLPs P22-CYP son catalíticamente activas.

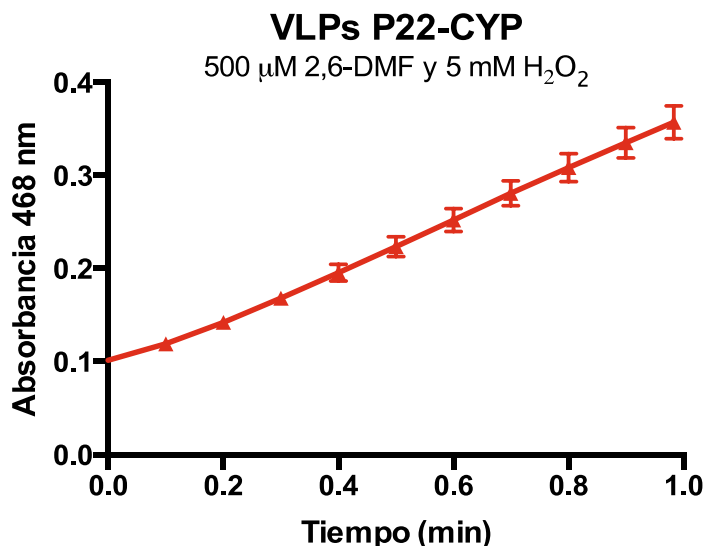


Figura 14. Gráfica de actividad de VLPs P22-CYP. En base a los parámetros cinéticos reportado por Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014 para el sustrato 2,6-DMF con 5mM H_2O_2 monitoreada a 468 nm.

La actividad de los nanobiorreactores es de 0.0194 ($\pm$ 0.001) U/mL bajo las condiciones previamente determinadas, tomando en cuenta la cantidad de VLPs P22-CYP que se utilizaron para el ensayo, esto equivale a 1,746 ($\pm$ 93) moléculas de sustrato transformadas por minuto por nanobiorreactor.

4.5 Lipofección de VLPs P22-CYP en células HeLa y evaluación de actividad citocromo P450

La lipofección es un método comúnmente utilizado para la transfección de material genético a células, en donde la forma de conocer que ha sido exitosa la inserción es mediante métodos de selección basados en antibióticos, expresión de proteínas fluorescentes, etc. Sin embargo, para evaluar el éxito de la lipofección de las VLPs P22-CYP en células HeLa se optó por realizar un ensayo de actividad citocromo P450

mediante el uso del BFC como sustrato para el citocromo contenido en el interior de las VLPs.

El BFC es oxidado por el CYP450 utilizando el peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones produciendo el HFC que es un compuesto fluorescente. Las muestras de células HeLa control y lipofectadas (3.14×10^{11} VLPs P22-CYP) fueron analizadas por microscopia de fluorescencia utilizando un microscopio confocal invertido Olympus FluoView FV1000 (Olympus, Japan); ajustado con un láser de ion de argón con un filtro para GFP, a longitudes de onda de 488 nm de excitación y a 510-550 nm de emisión; un láser de diodo 405 con un filtro para DAPI a 330-385 nm de excitación y 420 nm de emisión, con el objetivo de observar una diferencia en la fluorescencia debido a la presencia del HFC.

Ambas muestras fueron teñidas con DAPI para identificar el núcleo celular, el cual es marcado con “n” (Fig. 15A y D). En las células control, al no haber sido lipofectadas con las VLPs, la fluorescencia observada es explicada por la actividad de los citocromos endógenos, señalado con flechas se encuentra localizada la presencia del HFC en la región citoplásmica de las células (Fig. 15B); de igual forma se puede apreciar en la superposición de ambas fluorescencias (Fig. 15C). En células HeLa lipofectadas con VLPs P22-CYP se observa un incremento en la fluorescencia en comparación con el control, esto puede ser explicado por la suma de la actividad citocromo endógena más la actividad CYP450 proporcionada por las VLPs (Fig. 15E). Es evidente la delimitación del núcleo en la imagen superpuesta de ambas fluorescencias así como la notoria presencia del HFC en la región citoplásmica (Fig. 15F).

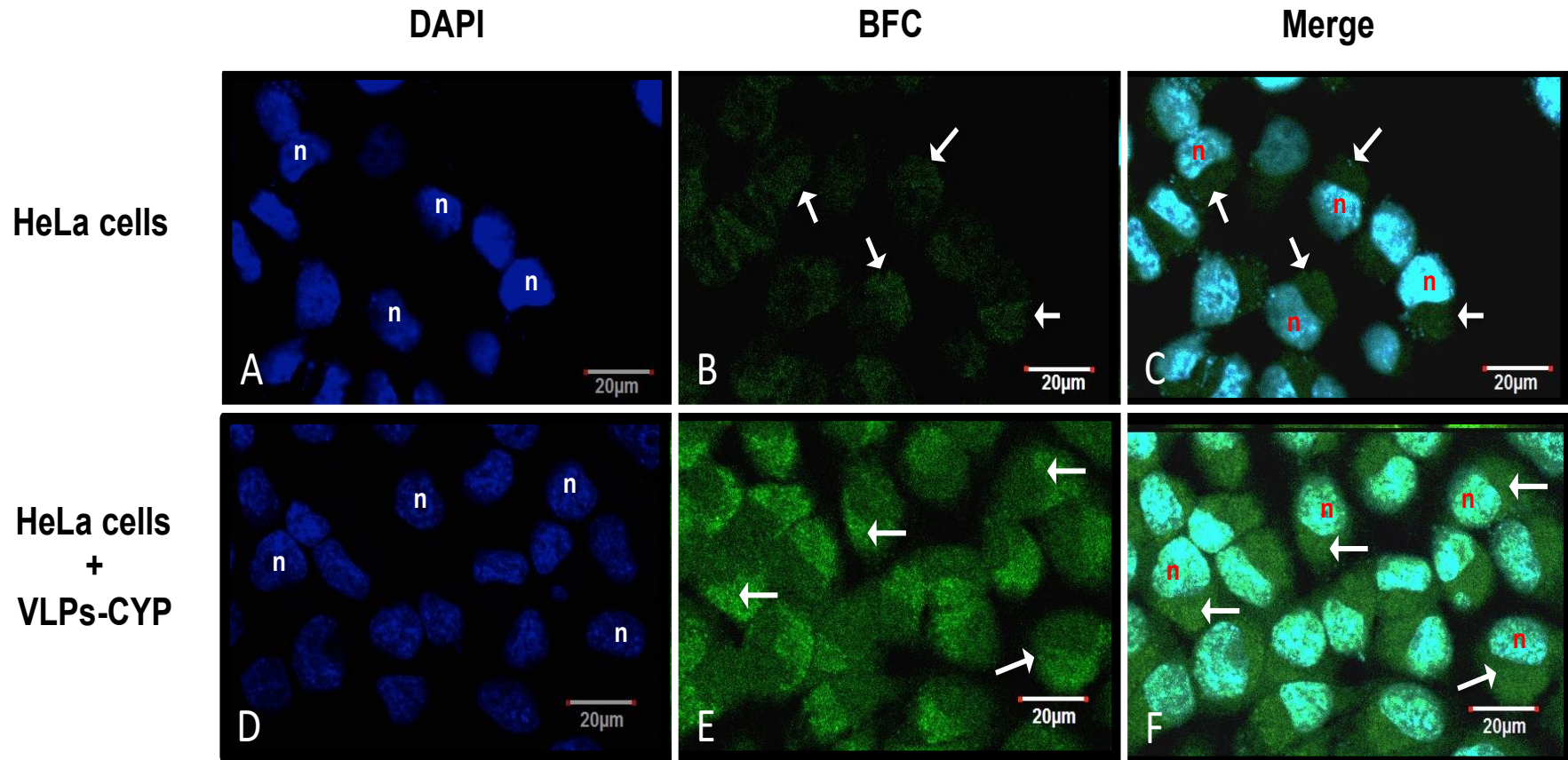


Figura 15. Ensayo de actividad citocromo P450 en la línea celular de carcinoma de cérvix humano (HeLa). Teñidos con DAPI y señalados con “n” se muestran los núcleos de las células HeLa. en paneles A y D. La actividad CYP endógena sobre el sustrato BFC es visualizada en las células HeLa como se observa en el panel B. El incremento en la actividad CYP de las VLPs P22-CYP lipofectadas en las células HeLa es mostrado en el panel E. La oxidación del BFC que da como producto el reactivo fluorescente HFC, es localizado en la región citoplasmática de la célula (flechas). El traslape del DAPI y el HFC claramente muestran la actividad CYP en el citoplasma de las células HeLa (flechas), paneles C y F. La barra de la escala representa 20 μm . Las células fueron visualizadas con un objetivo plan apocromático de inmersión en aceite 63x (DIC), 1.4 N.A. (Tomado de Sánchez-Sánchez *et al.*, 2015).

Las evidencias señalan que es posible introducir VLPs del bacteriófago P22 con actividad citocromo P450 en células HeLa mediante lipofección. Es importante realizar estas pruebas en líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 bajo la misma metodología, recordando que es uno de los objetivos de este trabajo y tomando en cuenta que se ha reportado una disminución en la expresión de citocromos en este tipo de cáncer, se esperaría una menor respuesta endógena en el ensayo de actividad con el BFC.

4.6 Pegilación de VLPs P22-CYP

La pegilación de las cápsides se llevó a cabo mediante la utilización de un polietilenglicol funcionalizado con ácido fólico por uno de sus extremos (Ácido fólico-PEG5000-NHS) el cual fue obtenido de Nanocs Inc. (New York, NY). De forma general, el PEG funcionalizado se hizo reaccionar con grupos amino libres presentes en la superficie externa de la cápside, para esto se procedió a contabilizar las lisinas presentes en los capsómeros del bacteriófago P22. La estructura del capsómero se obtuvo del Banco de Datos de Proteínas (PDB: 3IYI) y se visualizó mediante el software PyMOL (ver Anexo 2), de esta forma se pudieron contabilizar 2,556 lisinas en la cara externa de la superficie la cápside.

Inicialmente fue necesario aplicarle a la muestra un cambio de buffer mediante diálisis con PBS, debido a que se encontraba en un buffer Tris y este último puede ocasionar conjugados con el polietilenglicol resultando en una baja eficiencia de funcionalización de las VLPs. Una vez realizado el cambio de buffer, la reacción se efectuó utilizando una muestra de VLPs a una concentración de 17.3 mg/ml que contenía un total aproximado de 6.73×10^{13} cápsides, tomando en cuenta un exceso del PEG₅₀₀₀ funcionalizado de 5 en base molar al número de lisinas previamente calculadas, 7.15 mg se hicieron reaccionar con la solución de VLPs en buffer de fosfatos, pH 8. La reacción se realizó a temperatura ambiente con agitación durante 2 h.

La pegilación se monitoreó en una cromatografía de permeación en gel (Fig. 16). Los cromatogramas muestran que antes de la pegilación se obtiene un pico correspondiente a partículas de un solo peso molecular. Después de la modificación

de la superficie de las cápsides con PEG se obtiene partículas con mayor peso molecular, indicando una modificación efectiva.

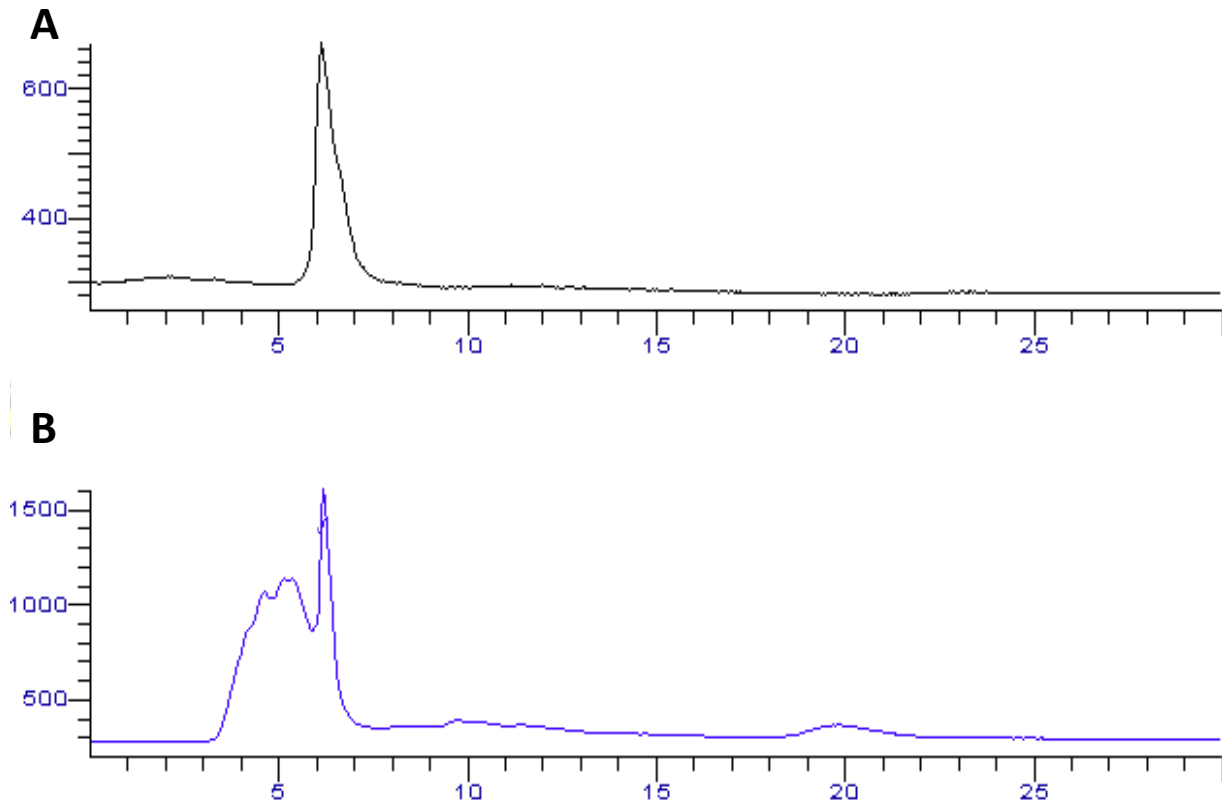


Figura 16. Cromatograma de exclusión molecular para determinación de VLPs P22-CYP pegiladas y funcionalizadas. A. VLPs P22-CYP no pegiladas, presentan un tiempo de retención 6.2 minutos. B. VLPs P22-CYP pegiladas y funcionalizadas con ácido fólico, presentan un tiempo de retención de 3.5 minutos, observándose diversas poblaciones, incluyendo el pico a los 6.2 min que indica la presencia de cápsides no pegiladas. Columna Zorbax G-250 a un flujo de 0.5 ml/min utilizando agua como fase móvil.

4.6.1 Evaluación de la actividad de VLPs P22-CYP PEG-AF

Se evaluó la capacidad catalítica de las VLPs P22-CYP una vez realizada la pegilación (Fig. 17). A pesar de que sí se encontró catalíticamente activo el citocromo al interior de las cápsides una vez realizada la pegilación, se observa una disminución de la misma en comparación de las VLPs no pegiladas y el CYPBM3 “21B3” libre. La disminución observada podría ser debido a que el recubrimiento ocasionado por las cadenas de

polietilenglicol sobre la superficie de la cápside impiden o hacen más complicado la difusión del sustrato hacia el interior del nanobiorreactor, lo cual aparentemente ya es observado este efecto en las VLPs no pegiladas.

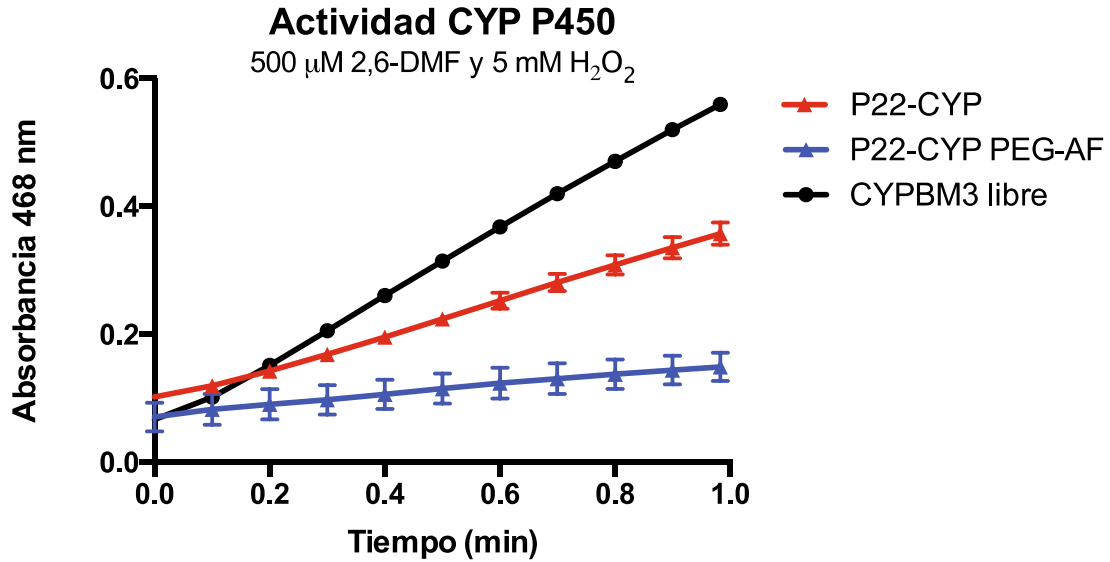


Figura 17. Gráfica de actividad CYP P450. Mediciones en base a los parámetros cinéticos reportado por Sánchez-Sánchez et al., 2014 para el sustrato 2,6-DMF con 5 mM H_2O_2 monitoreada a 468 nm.

La actividad se midió de la forma descrita anteriormente, para las lecturas se tomó una cantidad similar en base a la cantidad de citocromo, y disminuye cuando el citocromo se encuentra en el interior de las VLPs, más aún cuando las cápsides son pegiladas (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad CYP P450 para enzima libre y encapsulada en VLPs P22 pegiladas y no pegiladas.

Muestra	$\Delta Abs_{468}/min$	Actividad específica (U/mg)	Actividad (moléculas de sustrato transformado/min ⁺ cápside)
CYPBM3 "21B3" libre	0.546 ($\pm$ 0.002)	0.0133 ($\pm$ 0.001)	-
VLPs P22-CYP	0.286 ($\pm$ 0.015)	0.007 ($\pm$ 1×10^{-5})	1,746 ($\pm$ 93)
VLPs P22-CYP PEG-AF	0.206 ($\pm$ 0.024)	0.005 ($\pm$ 1×10^{-5})	1,292 ($\pm$ 149)

4.6.2 Análisis de las VLPs pegiladas por medio de TEM

Las muestras colectadas fueron analizadas mediante microscopia electrónica de transmisión mediante la técnica de tinción negativa con acetato de uranilo, la cual se describió anteriormente (Fig. 18). Mediante esta técnica de tinción fue posible observar como el acetato de uranilo difunde con mayor facilidad dentro de las VLPs P22-CYP no pegiladas (Fig. 18B) ya que existe un menor impedimento a través de los poros de la cápside logrando con esto una proyección más oscura al interior de los nanobiorreactores, no así para las VLPs pegiladas y funcionalizadas donde puede verse como el acetato de uranilo no difunde con facilidad y por tanto el interior de las cápsides pegiladas resulta de un color mayormente claro (Fig. 18A).

A pesar que bajo la resolución de las imágenes tomadas del TEM no es fácil distinguir las cadenas de polietilenglicol en la superficie de las cápsides, se puede interpretar que todas estas cadenas envolviendo la superficie casi en su totalidad afectan el flujo de moléculas a través de los poros del nanobiorreactor, de igual forma como es explicada la disminución en la actividad de las VLPs pegiladas. Las dimensiones de las partículas y las imágenes respectivas se obtuvieron mediante el software ImageJ (U.S. National Institutes of Health), así se determinó el diámetro promedio de ambas VLPs, calculado como la media geométrica de dos mediciones ortogonales. Estos nanobiorreactores cuentan con un tamaño parcialmente homogéneo para ambos con un diámetro de 54 nm (± 4.4) (Fig. 18).

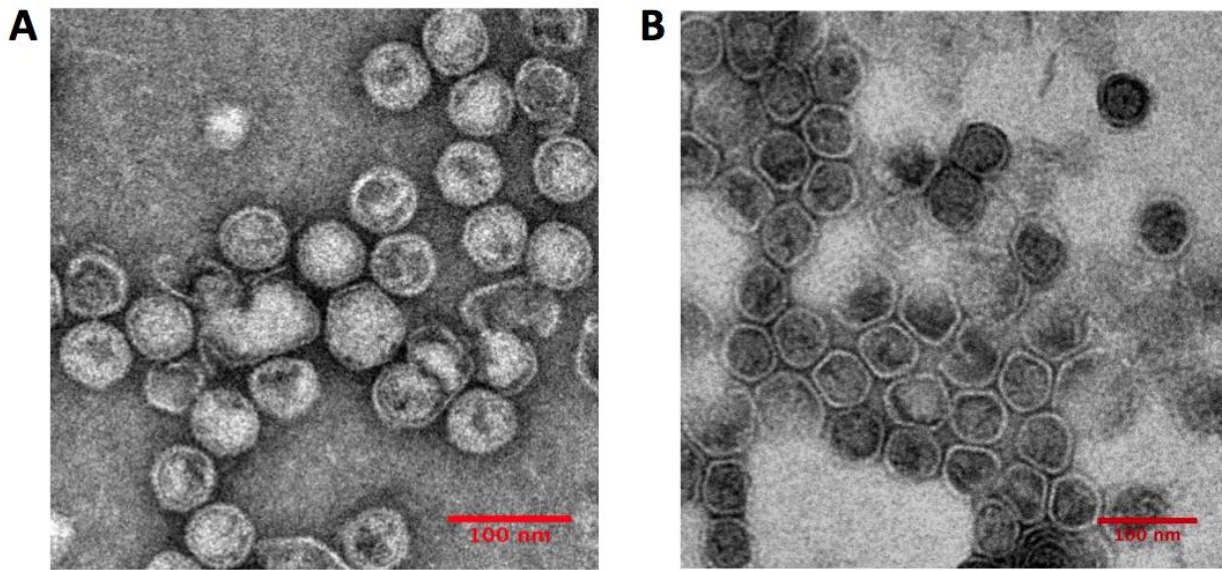


Figura 18. Nanobiorreactores P22-CYP vistos al TEM (200,000 V, 15,000X). A. VLPs P22-CYP PEG-AF. B. VLPs P22-CYP. Tinción negativa con acetato de uranilo. Diámetro promedio de 54 nm. Barra de escala = 100 nm.

4.7 Ensayo de citotoxicidad en células HeLa

Células tumorales HeLa fueron transfectadas por medio de lipofección con las cápsides biocatalíticas. Una vez transfectadas se evaluó la sensibilidad de las células HeLa a diferentes concentraciones de tamoxifen (Fig. 19). Este profármaco es activado por las VLPs. En las células control en presencia de tamoxifen a concentraciones de 15 μM se observa una supervivencia del 100% mientras que a concentraciones por arriba de 31 μM se presenta una muerte celular del 53%. Para el caso de las VLPs P22-CYP que fueron lipofectadas se observa claramente una mayor inhibición en la proliferación celular en comparación a las células control; sin embargo, estos resultados son similares para el caso de las células que fueron tratadas únicamente con lipofectamina. Lo anterior comprueba el grado de toxicidad que presenta la lipofectamina para las células, lo cual ya se ha reportado en diferentes trabajos (Zhong, 2008; Jones, 2013). Es por esto que la muerte celular observada en la muestra lipofectada con VLPs P22-CYP está relacionada al efecto tóxico ocasionado por la lipofectamina y no propiamente por el hecho de las VLPs. Estos resultados son una prueba de que el uso de la lipofectamina para la transfección celular (al menos en células HeLa) no es una estrategia eficiente, esta

estrategia causa un daño celular y por tanto no es una metodología viable al menos para su uso en la transfección de VLPs P22-CYP.

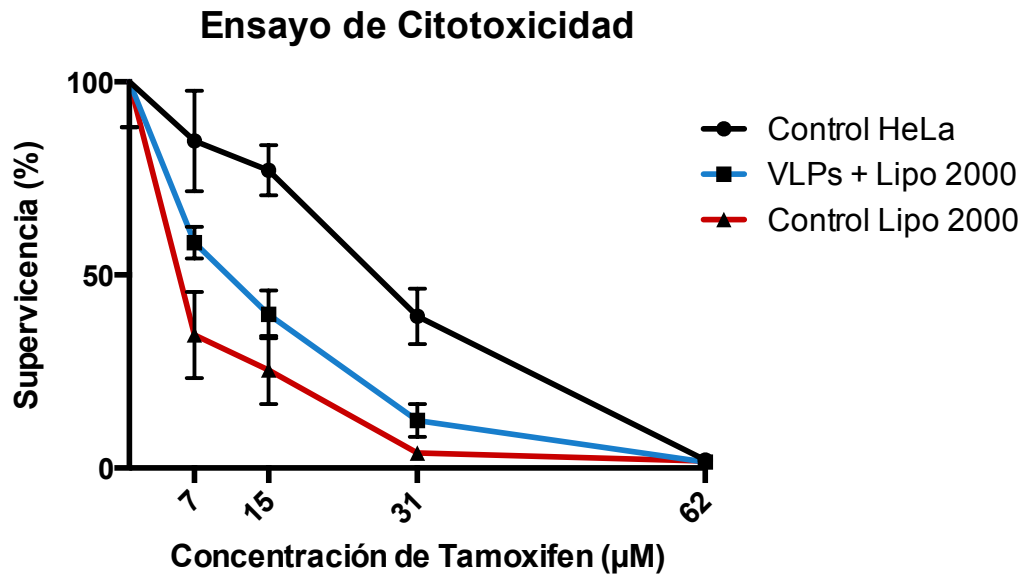


Figura 19. Ensayo de citotoxicidad mediante la activación de tamoxifen utilizando VLPs P22-CYP lipofectadas en células HeLa.

Para eliminar el efecto de la lipofección, capsides biocatalíticas funcionalizadas con ácido fólico fueron usadas para la transfección de las células tumorales (Fig. 20). El ácido fólico es reconocido por receptores específicos que inducen a la internalización de las cápsides (REF). En este se observa una supervivencia del 29% a la concentración de tamoxifen más baja del ensayo, a 7 μM . Esto nos indica que el direccionamiento de las VLPs hacia los receptores de folato presentes en las células es exitoso. Para estos nanobiorreactores funcionalizados, a concentraciones por debajo de 31 μM de tamoxifen la inhibición de proliferación celular es prácticamente del 0%, en comparación con el control que es del 53%.

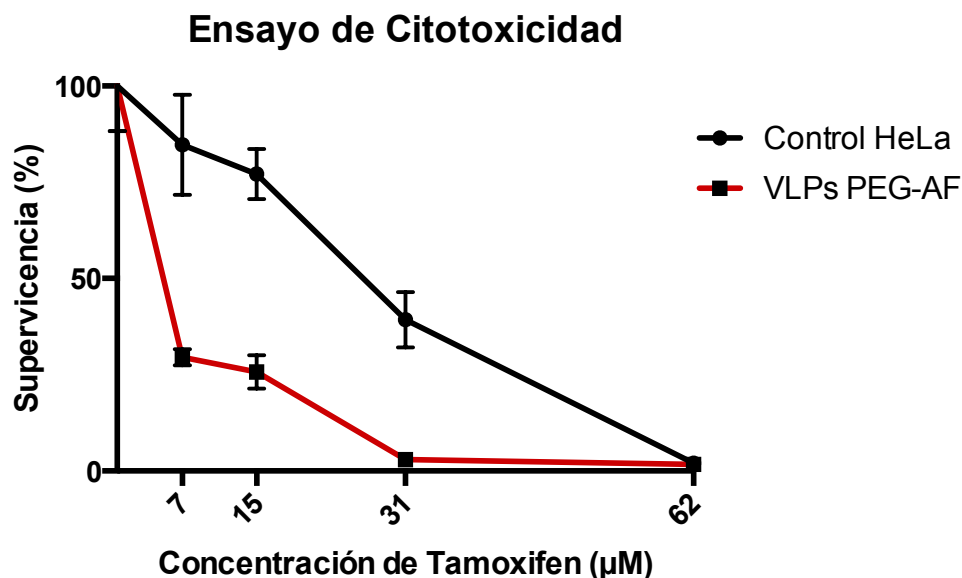


Figura 20. Ensayo de citotoxicidad mediante la activación de tamoxifen utilizando VLPs P22-CYP PEG-AF.

Los resultados señalan dos aspectos importantes: primero, el uso de lipofectamina como herramienta para la entrega de VLPs no es viable como estrategia de activación de prófarmacos, ya que a pesar de que si se logra llevar la actividad enzimática a las células lipofectadas el costo en el daño celular es alto (al menos para células HeLa), por otro lado cabe recordar que esta estrategia no es selectiva. El segundo aspecto importante es que la funcionalización de VLPs P22-CYP es una estrategia prometedora para su uso en terapias de activación de profármacos, aunque para este trabajo el direccionamiento de las VLPs fue parcialmente selectivo, esto debido a que los receptores de folato están presentes en todas las células pero sobreexpresados en células tumorales, como es el caso de células HeLa (Weitman *et al.*, 1992; Toffoli *et al.*, 1997; Sudimack & Lee, 2000; Saul *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2009), la evidencia señala que es posible el direccionamiento de nanobiorreactores catalíticamente activos a células tumorales. Más allá de lo observado en este trabajo, es conveniente realizar pruebas en células tumorales de mama, donde se ha visto una menor expresión de actividad citocromo P450, así como también ensayos de inmunogenicidad de los nanobiorreactores funcionalizados.

4.8 Evaluación de estabilidad frente a proteasas

Si bien es cierto que anteriormente la caracterización de la estabilidad de las VLPs P22-CYP incluía la degradación por proteasas ya fue realizada por Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014, en esta ocasión el ensayo contemplaría las VLPs pegiladas, con esto determinaríamos si la pegilación confería aún más el grado de protección que anteriormente ya se ha reportado para estas VLPs P22-CYP, o por otro lado, haría más susceptible su degradación.

Es bien conocida la capacidad que tienen los virus para resguardar el material que almacenan en su interior, y en particular la facultad del P22 para retener la actividad del citocromo frente a la tripsina. En este ensayo se optó por prolongar el tratamiento con tripsina hasta 148 horas y a 37°C. Se midió la actividad al inicio del tiempo de incubación; al cabo de 148 horas la enzima encapsulada en las VLPs tanto pegiladas como no pegiladas retiene toda la actividad (100%); mientras que el CYP libre únicamente mantiene el 31% de su capacidad para transformar el sustrato (Fig. 21). Con esto se confirma que la protección que confiere la cápside del bacteriófago P22 es una ventaja para el uso práctico de las VLPs como nanobiorreactores, de esta manera se prolongaría el tiempo de vida media en el cuerpo en terapias de activación de profármacos.

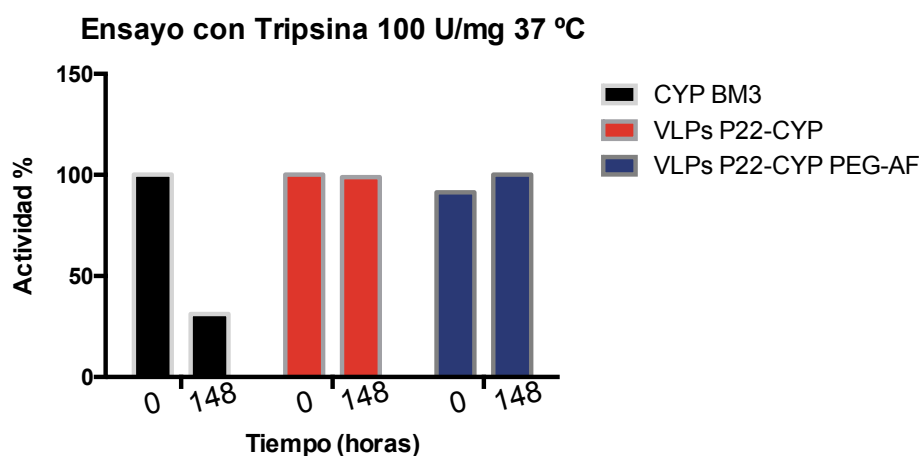


Figura 21. Estabilidad del CYP BM3 libre y encapsulado en P22 (VLPs sin modificar y VLPs PEG-AF) en presencia de tripsina (100U). La actividad CYP fue medida con el sustrato 2,6-DMF y 5 mM de H₂O₂.

Pensando en esto último, resulta de vital importancia dicha protección especialmente en terapias contra cáncer, debido a que se sabe de la sobreexpresión de proteasas extracelulares en microambientes tumorales, como es el caso de las metaloproteasas de la matriz extracelular (Klein & Buschoff, 2011). Estas proteasas en particular, promueven el crecimiento de las células cancerosas, la invasión de tejidos, angiogénesis y migración, entre otros (Coussens & Werb, 2002; Borgono *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2012)).

Capítulo 5. Conclusiones

La producción de partículas tipo virus del bacteriófago P22 que llevan como cargo el CYPBM3 “21B3” fue exitosa mediante el esquema de expresión diferencial, logrando rendimientos de aproximadamente 150 mg de VLPs. Se confirmó la alta capacidad de carga en comparación a la utilización del virus CCMV según el trabajo previo (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014) una mayor estabilidad ante la de gradación por proteasas, inclusive aquellas VLPs pegiladas y funcionalizadas, así como también la retención de la actividad catalítica; estas características son evidencias importantes para la aplicación potencial de los nanobiorreactores como agentes terapéuticos.

Estructuralmente, las VLPs pegiladas y funcionalizadas no presentan cambios dramáticos, sin embargo es posible indentificar aquellas VLPs modificadas mediante TEM. Por otro lado, las VLPs modificadas presentaron una menor actividad catalítica que las no modificadas, esto puede inferirse porque las cadenas de polietilenglicol se pliegan de manera que no permiten con facilidad el acceso del sustrato a través de los poros de la cápside.

Si bien es cierto que la lipofectamina resulta ser tóxica para las células, se pudo observar que es posible lipofectar los nanobiorreactores con actividad citocromo P450 a células tumorales. Sin embargo, la funcionalización de los nanobiorreactores resulta ser una mejor alternativa, por lo que se pudo comprobar que es posible dirigir los nanobiorreactores a los receptores de folato presentes en células HeLa, manteniéndose la actividad a pesar de la modificación de las cápsides logrando así la muerte celular a bajas dosis del profármaco tamoxifen.

Las evidencias señalan que la funcionalización es un paso fundamental para el direccionamiento y suministro de actividad enzimática a células tumorales, esto marca un gran logro y un paso adelante en lo referente a las terapias de activación de profármacos para el tratamiento de cáncer.

Capítulo 6. Perspectivas

En un futuro se podría intentar obtener una nueva clona capaz de retener el plásmido pLysS, el cual otorgaría un mayor control en la expresión basal de la proteína de la cápside y al mismo tiempo lograr altos rendimientos de VLPs al final de la purificación. Por otro lado, el uso del peróxido de hidrógeno como sustrato resulta tóxico para las células incluso a concentraciones bajas, por tanto, pensando en desarrollar una terapia para la activación de profármacos *in situ*, es fundamental diseñar una estrategia capaz de proveer dicho sustrato en las concentraciones mínimas requeridas y dentro del mismo nanobiorreactor, creado así un sistema autosuficiente dentro de la célula tumoral, esto podría lograrse al encapsidar a la glucosa oxidasa dentro de las VLPs P22-CYP de tal forma que al metabolizar la glucosa, dicha enzima produzca el peróxido de hidrógeno necesario para la activación del citocromo.

Por último sería conveniente extender los estudios a otros tipos de células tumorales, como es el caso de células de cáncer de mama. Actualmente la pegilación es un método ampliamente utilizado debido a las ventajas que confiere respecto a la reducción de la inmunogenicidad, sin embargo, es conveniente realizar estudios que comprueben que esto es igualmente válido para la pegilación de los nanobiorreactores.

Lista de referencias bibliográficas

- Abbing A, Blaschke U, Grein S, Kretschmar M, Stark CMB, Thies MJW, Walter J, Weigand M, Woith DC, Hess J, Reiser COA. (2004). Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles. *J. Biol. Chem.*, 279(26), 27410-27421.
- Akhtar J., Mallareddy V., Dandapat J., Maiti P., Sahoo S.K., Singh S. (2012). PEGylation of an osteoclast inhibitory peptide: Suitable candidate for the treatment of osteoporosis. *Int. J. Pharm.*, 434(1), 429-436.
- Al-Lazikani B, Banerji U, Workman P. (2012). Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature Biotechnol.*, 30(7), 679-692.
- An Q., Lei Y., Jia N., Zhang X., Bai Y., Yi J., Chen R., Xia A., Yang J., Wei S., Cheng X., Fan A., Mu S., Xu Z. (2007). Effect of site-directed PEGylation of trichosanthin on its biological activity, immunogenicity, and pharmacokinetics. *Biomol. Eng.*, 24(6), 643-649.
- Borgono C.A., Michael I.P., Diamandis E.P. (2004). Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol. Cancer Res.*, 2(5), 257-280.
- Cai W., Shin D.W., Chen K., Gheysens O., Cao Q., Wang S.X., Gambhir S.S., Chen X. (2006). Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Lett.*, 6(4), 669-676.
- Cancer Research UK (2012). World Cancer Factsheet. International Agency for Research on Cancer. Recuperado el 8 de agosto de 2014 de: www.iarc.fr.
- Choi K.Y., Swierczewska M., Lee S., Chen X. (2012). Protease-activated drug development. *Theranostics*, 2(2), 156-178.
- Choudhary D., Jansson I, Schenkman J.B., Sarfarazi M., Stoilov I. (2003). Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, 414(1), 91-100.
- Cirino P.C. & Arnold F.H. (2003). A self-sufficient peroxide-driven hydroxylation biocatalyst. *Angew. Chem.*, 115(28), 3421-3423.
- Cornelissen J.J. (2012). Chemical virology: Packing polymers in protein cages. *Nat Chem.*, 4(10), 775-7.
- Coussens L.M. & Werb Z. (2001). Inflammatory Cells and Cancer Think Different!. *J. Exp. Med.*, 193(6), F23-F26.
- Dachs GU, Tupper J, Tozer GM. (2005). From bench to bedside for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Anticancer Drugs*, 16(4), 349-359.

- Destito G., Schneemann A., Manchester M. (2009). Biomedical Nanotechnology Using Virus-Based Nanoparticles. En *Viruses and Nanotechnology* (pp. 95-122). Springer Berlin Heidelberg.
- Donato M.T., Jiménez N. Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. (2004) Fluorescence-based assay for screening nine cytochrome P450 activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab. Disp.*, 32(7), 600-706.
- Douglas T. & Young M. (2006). Viruses: Making friends with old foes. *Science*, 312(5775), 873-875.
- Francis RJ, Sharma SK, Springer C, Green AJ, Hope-Stone LD, Sena L, Martin J, Adamson KL, Robbins A, Gumbrell L, O'Malley D, Tsiompanou E, Shahbakhti H, Webley S, Hochhauser D, Hilson AJ, Blakey D, Begent RH. (2002). A phase I trial of antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) in patients with advanced colorectal carcinoma or other CEA producing tumours. *Brit. J. Cancer*, 87(6), 600-607.
- Glasgow JE, Capehart SL, Francis MB, Tullman-Ercek D. (2012). Osmolyte-Mediated Encapsulation of Proteins inside MS2 Viral Capsids. *ACS Nano*, 6(10), 8658-8664.
- Guengerich FP., Martin MV., Sohl CD., Cheng Q. (2009). Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nat Protoc.* 4(9), 1245-1251.
- Hetch J. & Waxman D. (2000). Selection of Cytochrome P450 Genes for Use in Prodrug Activation-Based Cancer Gene Therapy. *Meth. Mol. Med.*, 35, 77-83.
- Huang R., Ke W., Han L., Li J., Liu S., Jiang C. (2011). Targeted delivery of chlorotoxin-modified DNA-loaded nanoparticles to glioma via intravenous administration. *Biomaterials*, 32(9), 2399-2406.
- Huttunen, K. M., N. Mahonen, et al. (2008). Cytochrome P450-activated prodrugs: targeted drug delivery. *Curr. Med. Chem.*, 15(23), 2346-2365.
- Inoue T, Kawano MA, Takahashi RU, Tsukamoto H, Enomoto T, Imai T, Kataoka K, Handa H. (2008). Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with the minor capsid proteins VP2/3. *J. Biotechnol.*, 134(1), 181-192.
- Jones C.H., Chen C.K., Ravikrishnan A., Rane S., Pfeifer B.A. (2013). Overcoming nonviral gene delivery barriers: perspective and future. *Mol. Pharmaceutics*, 10(11), 4082-4098.
- Klein T., & Bischoff R. (2011). Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino acids*, 41(2), 271-290.
- Kreppel F. & Kochanek S. (2008). Modification of adenovirus gene transfer vectors with synthetic polymers: a scientific review and technical guide. *Mol. Ther.*, 16(1): 16-29.

- Lee A, Z Niu, Wang Q. (2009). Viruses and Virus-Like Protein Assemblies—Chemically Programmable Nanoscale Building Blocks. *Nano Res.*, 2(5), 349-364.
- Manchester M., & Steinmetz N. F. (2009). Viruses and nanotechnology (p. 147). Berlin: Springer.
- Minten IJ, Nolte RJ, Cornelissen JJ. (2010). Complex assembly behavior during the encapsulation of green fluorescent protein analogs in virus derived protein capsules. *Macromol. Biosci.*, 10(5), 539–545.
- Niculescu-Duvaz I. & Springer CJ. (1997). Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 26(2), 151-172.
- O'Neil A, Prevelige PE, Basu G, Douglas T. (2012). Coconfinement of fluorescent proteins: spatially enforced communication of GFP and mCherry encapsulated within the P22 capsid. *Biomacromolecules*, 13(12), 3902-3907.
- O'Neil A, Prevelige PE, Douglas T. (2013). Stabilizing viral nano-reactors for nerve-agent degradation. *Biomaterials Sci.*, 1(8), 881-886.
- Parent KN, Khayat R, Tu LH, Suhanovsky MM, Cortines JR, Teschke CM, Johnson JE, Baker TS. (2010). P22 coat protein structures reveal a novel mechanism for capsid maturation: stability without auxiliary proteins or chemical crosslinks. *Structure*, 18(3), 390-401.
- Patterson DP, Schwarz B, Waters RS, Gedeon T, Douglas T. (2013). Encapsulation of an Enzyme Cascade within the Bacteriophage P22 Virus-Like Particle. *ACS Chem. Biol.*, 9(2), 359-365.
- Roldao A., Mellado M. C. M., Castilho L. R., Carrondo M. J. T., Alves P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 9(10), 1149–1176.
- Sánchez-Sánchez L., Cadena R.D., Palomares L.A., Ruiz-Garcia J., Koay M.S.T., Cornelissen J.J.M.T. and Vazquez-Duhalt R. (2014) Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450. *Enzyme Microb. Technol.*, 60, 24-31.
- Sánchez-Sánchez L., Tapia-Moreno A., Juarez-Moreno K., Patterson D.P., Cadena-Nava R.D., Douglas T., and Vazquez-Duhalt R. (2015) Design of a VLP-nanovehicle for CYP450 enzymatic activity delivery. *J. Nanobiotechnol.*, 13(1), 66.
- Saul J. M., Annapragada A., Natarajan J. V., Bellamkonda, R. V. (2003). Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor *in vitro*. *J. Control. Release*, 92(1), 49-67.
- Schmidt U, Günther C, Rudolph R, Böhm G. (2001). Protein and peptide delivery via engineered polyomavirus-like particles. *FASEB J.*, 15(9), 1646-1648.

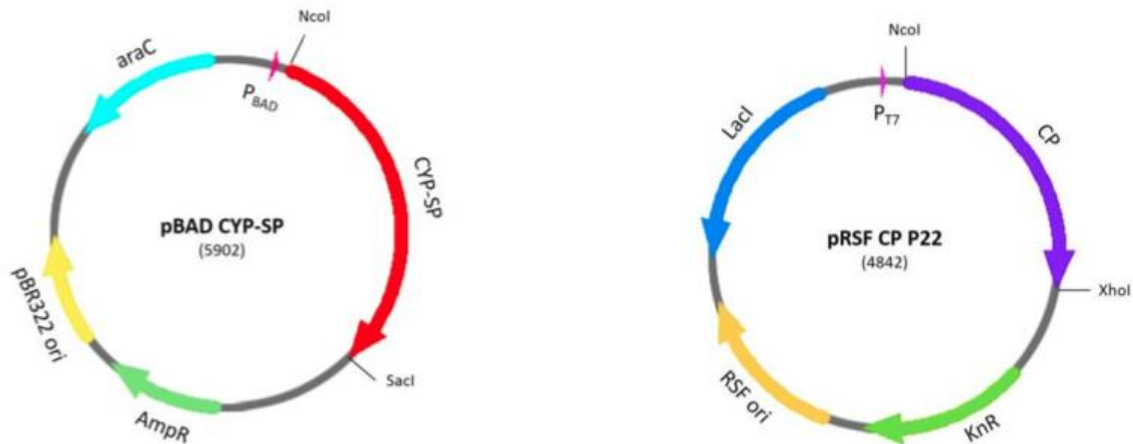
- da Silva Freitas, D., Mero, A., Pasut, G. (2013). Chemical and Enzymatic Site Specific PEGylation of hGH. *Bioconjug. Chem.*, 24(3), 456-463.
- Strable E., & Finn M. G. (2009). Chemical Modification of Viruses and Virus-Like Particles. En *Viruses and Nanotechnology* (pp. 1–21). Springer Berlin Heidelberg.
- Suhanovsky M.M., Parent K.N., Dunn S.E., Baker T.S., Teschke C.M. (2010). Determinants of bacteriophage P22 polyhead formation: the role of coat protein flexibility in conformational switching. *Mol. Microb.*, 77(6), 1568-1582.
- Sudimack J. & Lee R.J. (2000). Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 41(2), 147-162.
- Teschke C. & Parent K. (2010). 'Let the phage do the work': Using the phage P22 coat protein structures as a framework to understand its folding and assembly mutants. *Virology*, 401(2), 119-130.
- Thuman-Commike PA, Greene B, Jakana J, Prasad BV, King J, Prevelige PE Jr, Chiu W. (1996). Three-dimensional structure of scaffolding-containing phage p22 procapsids by electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.*, 260(1), 85-98.
- Toffoli G., Cernigoi C., Russo A., Gallo A., Bagnoli M., Biocchi M. (1997). Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers. *Int. J. Cancer*, 74(2), 193-198.
- Uchida M., Klem M.T., Allen M., Suci P., Flenniken M., Gillitzer E., Varpness Z., Liepold L.O., Young M., Douglas T. (2007). Biological Containers: Protein Cages as Multifunctional Nanoplatfroms. *Adv. Mater.*, 19(8), 1025-1042.
- Verma I. & Weitzma M. (2005). Gene therapy: Twenty-first century medicine. *Ann. Rev. Biochem.*, 74, 711-738.
- Vidal-Limón, A., Águila, S., Ayala, M., Batista, C.V., Vazquez-Duhalt, R. (2013). Peroxidase activity stabilization of cytochrome P450BM3 by rational analysis of intramolecular electron transfer. *J. Inorg. Biochem.*, 122, 18-26.
- Weitman S.D., Lark R.H., Coney L.R., Fort D.W., Frasca V., Zurawski V. (1992). Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer research*, 52(12), 3396-3401.
- Wild C.P. (2012) The role of cancer research in noncommunicable disease control JNCI *J. Natl. Cancer Inst.*, 104(14), 1051-1058.
- Xu G. & McLeod H. (2001). Strategies for Enzyme/Prodrug Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.*, 7, 3314-3324.
- Yang C., Ding N., Xu Y., Qu X., Zhang J., Zhao C., Xiang G. (2009). Folate receptor-targeted quantum dot liposomes as fluorescence probes. *J. Drug Target.*, 17(7), 502-511.
- Zhao, Y.N., Zhang, W., Chen, Y-C., Fang, X-Q. and Hide, L (2012). Relative imbalances in the expression of catechol-O-methyltransferase and cytochrome P450 in breast

cancer tissue and their association with breast carcinoma. *Maturitas*, 72(2), 139–145.

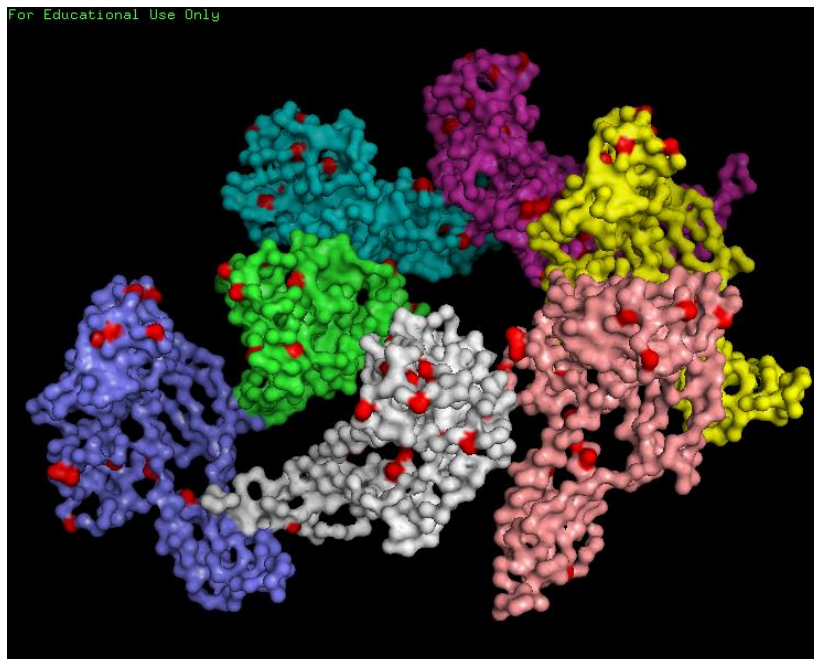
Zhong Y.Q., Wei J., Fu Y.R., Shao J., Liang Y.W., Lin Y.H., Zhu Z.H. (2008). Toxicity of cationic liposome Lipofectamine 2000 in human pancreatic cancer Capan-2 cells. *J South Med Univ.*, 28(11), 1981-1984.

Anexos

1. Plásmidos utilizados



2. Estructura del capsómero P22 visualizado mediante el software PyMOL señalando en puntos rojos las lisinas presentes (PDB: 3IYI)



3. Publicación

RESEARCH

Open Access



Design of a VLP-nanovehicle for CYP450 enzymatic activity delivery

Lorena Sánchez-Sánchez¹, Alejandro Tapia-Moreno², Karla Juárez-Moreno^{2,3}, Dustin P. Patterson⁴, Ruben D. Cadena-Nava², Trevor Douglas⁵ and Rafael Vazquez-Duhalt^{2*}

Abstract

Background: The intracellular delivery of enzymes for therapeutic use has a promising future for the treatment of several diseases such as genetic disorders and cancer. Virus-like particles offer an interesting platform for enzymatic delivery to targeted cells because of their great cargo capacity and the enhancement of the biocatalyst stability towards several factors important in the practical application of these nanoparticles.

Results: We have designed a nano-bioreactor based on the encapsulation of a cytochrome P450 (CYP) inside the capsid derived from the bacteriophage P22. An enhanced peroxigenase, CYPBM3, was selected as a model enzyme because of its potential in enzyme prodrug therapy. A total of 109 enzymes per capsid were encapsulated with a 70 % retention of activity for cytochromes with the correct incorporation of the heme cofactor. Upon encapsulation, the stability of the enzyme towards protease degradation and acidic pH was increased. Cytochrome P450 activity was delivered into Human cervix carcinoma cells via transfecting P22-CYP nanoparticles with lipofectamine.

Conclusion: This work provides a clear demonstration of the potential of biocatalytic virus-like particles as medical relevant enzymatic delivery vehicles for clinical applications.

Keywords: Enzymatic delivery, Cytochrome P450, Virus-like particles, Nanobioreactor, Enzyme prodrug therapy

Background

The therapeutic use of enzymes is a fast growing field that is the focus of extensive research from several groups and pharmaceutical companies worldwide. The interest in this class of biopharmaceuticals has dramatically increased and it is changing the way several diseases will be treated, since their mode of action involves highly specific and efficient catalysts. Therapeutic enzymes have been proposed to treat several illnesses including genetic diseases, infectious diseases and cancer [1–3]. A great proportion of the enzymes that are already in use work extracellularly; nevertheless to efficiently treat the above mentioned diseases, in particular genetic disorders and cancer, enzymes have to be internalized within the cell to reach their therapeutic target. Two significant

therapeutic approaches based on enzymes have been proposed. In Enzyme Replacement Therapy (ERT) [4–6] an enzyme is exogenously provided to replace a missing enzyme, while in Enzyme Prodrug Therapy (EPT) [7–9] an enzyme capable of activating a pro-drug into its active metabolites is delivered. In both of these therapies there is a need for suitable vehicles to deliver these therapeutic enzymes intracellularly to targeted cells, while avoiding rapid inactivation and elimination from the body [10].

Virus-like particles (VLPs) offer an interesting platform as potential therapeutic agents for such intracellular delivery of enzymatic activity for several reasons including their ability to load and transport significant quantities of enzymes, their intrinsic capacity to protect their cargo and the ease with which they can be chemically and genetically modified [11]. Until now the encapsulation of enzymes inside VLPs has been useful to study biocatalysis in confined environments. Sequestration of enzymes within these vehicles can lead to high internal concentrations of cargo, in the mM range, difficult to reach with

*Correspondence: rvd@cnyun.unam.mx

² Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Km 107 carretera Tijuana-Ensenada, 22860 Ensenada, Baja California, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article

enzymes free in solution. Additionally, with the confinement of enzymes inside these viral nanoparticles, new features are generated in the resulting nanoreactor, such as improvements in stability towards temperature or protease degradation [12–18].

One of the most well studied VLPs is the one derived from the bacteriophage P22. It is a 58 nm icosahedral capsid composed of 420 coat proteins (CP) that assembles with the aid of 60–300 scaffold proteins (SP) [19]. It has been used to encapsulate several enzymes with high cargo density [15–18]. The strategy used to incorporate the enzymes into the interior of the P22 capsid requires genetically fusing the desired enzyme to the N-terminus of a truncated form of the scaffold protein, which is still capable of interacting non-covalently with the interior of CP and directing capsid assembly [20].

The aim of the work presented here was to encapsulate a cytochrome P450 (CYP), which belongs to a family of medically and industrially important enzymes, to create a nanovehicle with high catalytic activity. The variant “21B3” of CYPBM3 from *Bacillus megaterium*, with improved peroxigenase activity [21], was used as a model of this family of enzymes since it is stable and soluble in aqueous media, and it can be produced in large quantities, in contrast to human CYPs. Moreover, several mutants of this CYPBM3 have been generated which facilitate the enzymatic transformation of non-natural substrates such as pesticides [22], polycyclic aromatic hydrocarbons [23], and drugs [24], suggesting potential environmental and pharmaceutical applications. Interestingly, in a previous report we found that CYPBM3 “21B3” was able to transform the potential prodrug resveratrol as well as the anti-carcinogenic prodrug tamoxifen, one of the most commonly used drugs to treat breast cancer, into their clinically active metabolites [25].

Results and discussion

The P22 coat protein (CP) and the CYPBM3-scaffold fusion protein (CYP-SP) were heterologously expressed

in *E. coli*. Two different strategies for the in vivo assembly of the VLPs with encapsulated enzyme were used; simultaneous expression of the coat protein and CYP-SP, and differential expression of the enzyme and CP. In the latter, a two-vector approach exploited the use of different inducers to drive first the expression of CYP-SP, allowing maturation of the enzyme, and then initiation of encapsulation by inducing expression of the CP. Correctly sized capsids with cargo were produced using both approaches; however, the proportion of active cytochrome was much higher when the genes were differentially expressed (Table 1). We were able to quantify the concentration of active enzyme inside the capsids estimating the amount of CYP able to form the carbon monoxide-heme Fe^{II} complex, which produces an absorbance spectrum with a maximum wavelength at 450 nm [26]. On the other hand, the total protein was estimated from the absorbance at 280 nm and multiangle light scattering data (see below). By these means we were able to distinguish between catalytically active CYP and non-active enzyme. The maximum theoretical number of encapsulated CYPs (3.3 nm hydrodynamic radius) per P22 particle, based on volume, is around 180 enzymes. Co-expression showed the highest CYP loading, near this maximum number, but with a lower percentage of active enzyme. The fast interaction of the CYP polypeptide chain with the CP could be affecting the integrity of the enzyme as showed by the large proportion of inactive enzyme (93 %).

Differential expression was performed using two different strategies. In the first case, 0.2 % L-arabinose was used to induce expression from the CYP-SP gene and 0.5 mM IPTG to induce the CP gene expression. In the second case, 0.125 % L-arabinose was used to induce expression of the CYP-SP gene and 0.3 mM IPTG to induce the CP gene. By lowering the concentration of inducers we were able to increase the percentage of active CYP without significantly affecting the amount of encapsulated enzyme per capsid (Table 1). Thus, in the differential expression strategy the number of active enzymes per capsid could

Table 1 Comparison between expression systems for the encapsulation of CYPBM3 inside P22

Expression system (plasmids)	CYP/capsid ^a	Total CYP ^b Abs ₂₈₀ (μM)	Active CYP CO assay ^c (μM)	% active CYP ^d (CO/Abs ₂₈₀)
Co-expression (pETDuet)	156.0 (±0.4)	123.5	9.2	7
Differential expression 1 (pBAD + pRSF)	129.5 (±0.1)	135.3	31.8	23
Differential expression 2 (pBAD + pRSF)	109.7 (±2.8)	123.7	42.9	35

^a Determined by Eq. 1

^b Total CYP determined using an extinction coefficient at 280 nm assuming a molar extinction coefficient $\epsilon_{280} = 44,920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for coat protein and $\epsilon_{280} = 52,830 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for CYP-SP (theoretically calculated using ProtParam, Gasteiger, 2005). The concentration of protein was calculated using the Lambert–Beer equation, $\text{Abs}_T = C_{\text{CP}} \cdot \epsilon_{\text{CP}} + C_{\text{CYP-SP}} \cdot \epsilon_{\text{CYP-SP}}$ as described previously [15]

^c Active CYP determined by the formation of CO-CYP complex in reducing medium with a extinction coefficient of $\epsilon_{450} = 0.091 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [26]

^d Active/total CYP ratio expressed in percentage

be improved by tuning expression parameters, such as induction time and concentration of inducers.

In order to determine if all CYP molecules were expressed as holoenzymes, and explain the significant difference in concentration values encountered by absorbance at 280 and the CO assay, the iron concentration present in encapsulated CYPs was determined by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). Samples from the second differential expression strategy showed a complete incorporation of iron-heme cofactor (CYP:Fe molar proportion of 1:1) in all encapsulated CYPs, in which only 35 % were observed to be active by the carbon monoxide binding assay. This suggests that the other two-thirds of encapsulated enzyme could be trapped as misfolded intermediates where the iron of the heme group is bound, but in an incorrect coordination state [27]. This could be due to the fast interaction of CYP-SP with the CP, disrupting the CYP folding before the correct incorporation of the heme prosthetic group, as supported by the low proportion of active CYP found in the co-expression strategy (Table 1).

The biocatalytic VLP preparations, with the highest proportion of active CYP, corresponding to the second strategy (differential expression) were further characterized structurally and kinetically. VLPs were produced in high yields of 120 mg of P22-CYP VLPs per liter of culture, and were easily purified. Highly monodisperse VLP preparations were obtained, with an average VLP diameter of 53.6 ± 0.2 nm as determined by HPLC-MALS-RI. The amount of encapsulated CYP per capsid was 109.7 ± 2.8 CYP molecules per particle as determined by HPLC-size exclusion chromatography coupled to in-line multi-angle laser light scattering (MALS) and refractive

index (RI) detectors (Fig. 1a). As confirmed by TEM, the nanoparticles are quasi-spherical and well structured, suggesting that the packaging of the enzyme did not have any repercussions on the assembly of the P22 capsid (Fig. 1b).

Compared to other recently designed nanovehicles for enzyme intracellular delivery, P22-CYP VLPs showed a higher enzyme content of 40 % (w/w) of the total nanoparticle weight, demonstrating a higher payload capacity, compared to 16.7 % in a superoxide dismutase-mesoporous silica nanoparticle system [28] and 15 % in a nanoparticle formed by the conjugation of β -galactosidase with enhanced green fluorescent protein [29].

The catalytic constants for the encapsulated and free CYPBM3 were determined (Table 2). For both preparations, only the catalytically active enzyme was considered for the k_{cat} and K_M calculations. The catalytic constants are apparent since we could not reach the saturation concentration of peroxide. The enzyme was rapidly inactivated in the presence of high concentrations of hydrogen peroxide (>60 mM), as previously reported [21]. In addition, at such high peroxide concentrations, substrate oxidation seems to be affected by a possible Fenton-like reaction (data not shown).

Encapsulated CYP showed a 70 % catalytic rate (k_{cat}) compared to that found with the free enzyme, while its affinity constant (K_M) for hydrogen peroxide was slightly higher when compared to the free enzyme. Thus, the catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) found for the encapsulated enzyme is around half of the free enzyme. The diffusion coefficients of P22-CYP VLPs and free CYP were calculated according to [30] using a hydrodynamic radius of 26.8 nm and 3.3 nm, respectively. The resulting diffusion

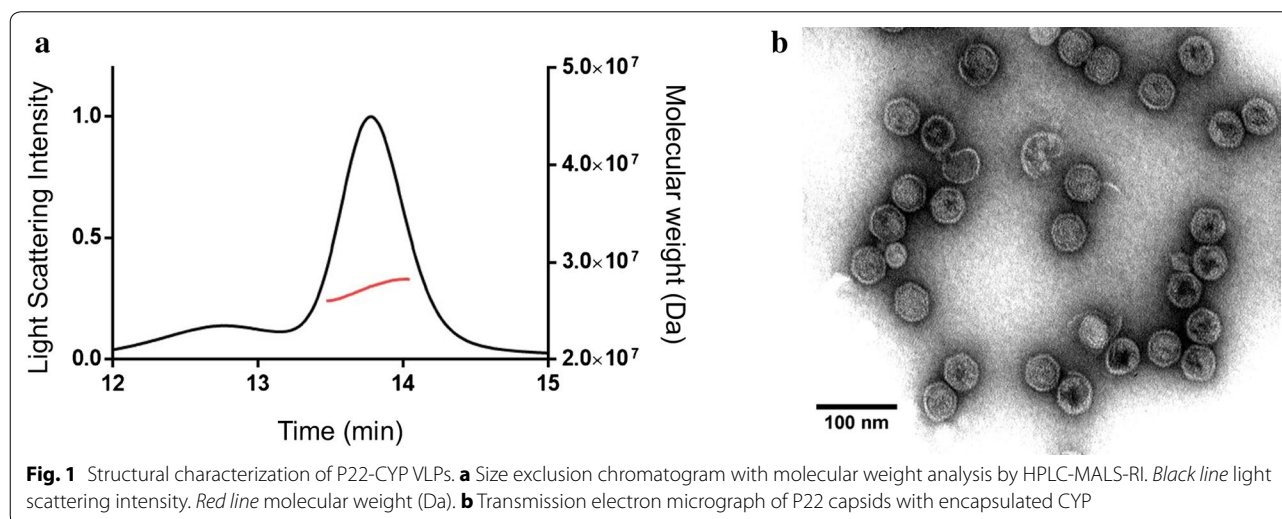


Table 2 Apparent catalytic constants for free and encapsulated CYPBM3

	k_{cat}^a (min^{-1})	K_M (H_2O_2) (mM)	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
P22-CYP	507.9 (± 37.1)	25.2 (± 4.2)	20.1
Free CYP	720.5 (± 27.8)	18.5 (± 1.8)	38.9

^a The reaction mixture contained a catalytic saturating concentration of 500 μM 2,6-DMP

coefficients were $8.06 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for P22-CYP and $6.55 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for the free enzyme.

The decrease in catalytic activity of encapsulated enzymes has been reported for other VLP-enzyme systems [13, 15, 17, 31], and has been mainly attributed to diffusional problems and to a decrease in the structural flexibility of enzymes as a result of a highly crowded space. The diffusion rate of substrates through VLP pores could affect their transformation rates. It depends on several factors such as the hydrodynamic radius of the substrates, the pore diameter and the electrostatic environment around the capsid pores, as well as the degree of obstruction of the pores by the cargo enzyme. Comellas-Aragones et al. [12] showed a diffusion time increase of almost three orders of magnitude for rhodamine when it had to pass through the 2 nm pores present in CCMV capsids, when compared to the substrate diffusion time in distilled water. Another limiting factor related to mass transfer phenomena is the decrease, by one order of magnitude, of the diffusion coefficient of P22-CYP compared to the free enzyme. This likely affects the rate of collisions between enzyme and substrate molecules influencing the kinetics.

On the other hand, the high degree of confinement found inside the capsids, in our case $M_{\text{conf}} = 3.14 \text{ mM}$

(capsid internal volume of $5.8 \times 10^{-20} \text{ L}$), could restrict the conformational changes needed to perform catalysis. It is well known for this particular CYP that the F and G helices undergo important structural motion while executing catalysis [32] that could be impaired by the high degree of confinement. A decrease in activity using other immobilization materials, such as sol-gel matrices and DEAE resins, has also been reported for the heme domain of CYPBM3 as well for the whole protein [33, 34] suggesting that this enzyme is sensitive to motion impairment. The fact that CYPBM3 was expressed as a fusion protein with a fragment of the P22 scaffold protein could also have affected its kinetic behavior. Further evaluation of the structural dynamics of this CYP inside the P22 capsid are needed to better understand and explain the particular changes observed in the catalytic parameters. Moreover, given the importance that diffusion may impose in the system for relevant therapeutic treatments this issue should be assessed.

Due to their confinement, it could be expected that enzyme stability against therapeutically important factors could increase. Enzyme stability towards protease degradation and to pH were assayed (Fig. 2). CYPBM3 encapsulation inside P22 capsid confers protection of the cargo enzyme against proteases. After 1-h incubation in the presence of trypsin, the residual activity of the encapsulated CYP was 90.3 % while the free enzyme retained only 59.5 % of its original activity. After 20 h of incubation with the protease, the retention of activity for the P22-CYP was 36.1 %, while the free enzyme retained only 18.2 % (Fig. 2a). This intrinsic capacity of viruses to protect their cargo from proteolytic degradation can be exploited in the use of these VLPs as enzyme delivery vehicles for therapeutic purposes,

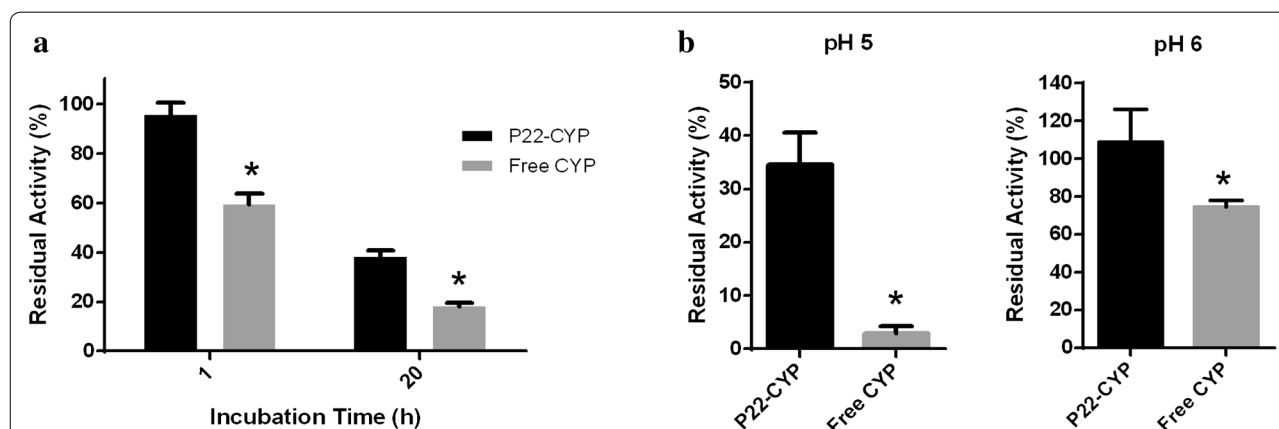


Fig. 2 Comparison between free and encapsulated CYP against protection from protease inactivation and acidic pH stability. **a** Residual CYP activity after incubation of P22-CYP and free CYP with 10 U of trypsin per mg of protein during 1 and 20 h. **b** Residual CYP activity after incubation of P22-CYP and free CYP in pH 5 and pH 6 for 1 h. CYP activity was measured at 100 mM Tris-HCl pH 8 buffer using 2,6-DMP as a substrate and 5 mM of H_2O_2 to initiate the reaction. Treatments were analyzed by one-way ANOVA and multiple comparisons between mean values using Turkey's test. All values showed to be statistical different (* $p < 0.01$)

ensuring a higher lifetime of cargo *in vivo*. Moreover, this increase in the proteolytic stability is particularly important in cancer therapy. It is well known that there is an overexpression of extracellular matrix metalloproteinases (MMPs) in the tumor microenvironment. The MMPs are involved in cell growth, tissue invasion and metastasis, angiogenesis and migration, among others processes, and they role is to cleavage a variety of extracellular matrix components (adhesion molecules), growth-factor-binding proteins, growth-factor precursors, receptor tyrosine kinases, cell-adhesion molecules and other proteases [35]. The proteolytic stability of VLPs has been reported [36, 37] and could be originated by less accessible hydrolysis sites due to new bond formation in the compact VLP structure. It is important to point out that for further *in vivo* experiments, the VLPs will be covalently covered with PEG that, in addition to render them less immunogenic, it could be envisaged a higher proteolytic stability.

Another advantage of CYPBM3 confinement inside the P22 viral cage is an increase in stability towards acidic pH, where the free CYP precipitates. The encapsulation of the enzyme prevents its precipitation at pH 5 and retains, after 1-h incubation, 33.3 % of its original activity, while the free soluble CYP retains only 2.9 % of activity. After 1-h incubation at pH 6, the encapsulated CYP retains full activity, while the free preparation loses 25 % of its original activity (Fig. 2b). The isoelectric point of the free CYPBM3-His Tag was 5.4 (experimentally calculated; data not shown), while the CYP-SP had a pI = 6.1 (theoretically calculated using ProtParam), this shift in

pI could help to prevent the precipitation of the encapsulated enzyme. Also, the encapsulation of the enzyme within the capsid avoids bulk precipitation and subsequent aggregation of the CYPBM3, therefore retaining a higher proportion of activity. This increased stability towards acidic pH is of particular importance from a therapeutic point of view, since the majority of nanoparticles are internalized by cells through an endocytic pathway, with early endosomes having a pH in the range of 6–6.5 and late lysosomes having a pH between 4.5 and 5.5 [38]. Moreover, the extracellular environments of tumors are known to be acidic (6.5–6.9) due to the increase in fermentative metabolism [39]. Thus, the effect of acidic pH on CYP can be relieved by its encapsulation inside the P22 capsid.

To evaluate whether P22-CYP VLPs were suitable vehicles for the intracellular delivery of cytochrome P450 activity, HeLa cells were transfected with the biocatalytic nanoparticles, which were then tested for enzymatic activity using 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin (BFC) as a substrate. When BFC is metabolized into 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin (HFC) it produces an easily detectable fluorescent product (Fig. 3). The fluorescence intensity of cells treated with P22-CYP was significantly higher when compared to those observed from endogenous CYP activity in untreated HeLa cells. BFC processing into the fluorescent HFC reagent was clearly localized in the cytoplasmic region as expected, since lipofectamine was used for nanoparticle internalization given the lack of P22 surface functionalization for mammalian cell uptake.

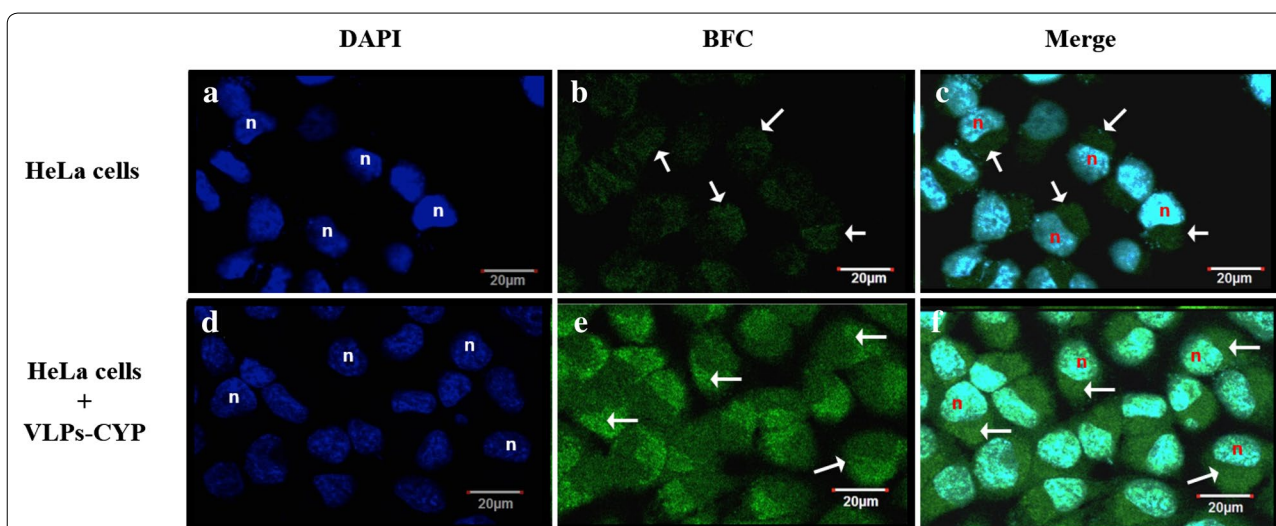


Fig. 3 Cytochrome P450 activity assay in human cervix carcinoma cell line (HeLa). Staining with DAPI show nuclei of HeLa cells labeled as “n”, panels **a** and **d**. Endogenous CYP activity over BFC reagent was visualized in HeLa cells as observed in panel **b**. CYP activity of transfected VLPs-CYP nanoparticles in HeLa cells is shown in panel **e**. Overlay of DAPI and BFC localize the CYP activity in the cytoplasm of HeLa cells (white arrows), panels **c** and **f**. Scale bar represents 20 μ m. Cells were visualized with a $\times 63$ (DIC), 1.4 N.A. planapochromatic oil immersion objective

In addition, CYP activity was quantitatively determined as fluorescence intensity. BFC is a specific substrate for CYP and it is transformed to 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin (HFC) that produces an intense fluorescence at 510 nm. As expected, the control cells showed a basal endogenous CYP activity (110 ± 14 a.u.) while the P22-CYP transfected cells showed 10-times higher CYP activity (1136 ± 244 a.u.) (Fig. 4). Experiments with free CYP in the same reaction conditions showed a linear correlation between fluorescence of HFC and CYP activity. This result demonstrates the capacity of VLPs to deliver enzymatic activity to cells. With the increase of CYP activity in tumor cells, it is expected a better pro-drug activation in the target tissue and thus a more effective chemotherapy. This is important because the drug dose could be diminished, reducing the drastic side effects of treatment. Tamoxifen is metabolized to endoxifen, which has high affinity for estrogen receptor with the desired chemotherapeutic effect, but norendoxifen does not have the desired effect with extreme side effects. Approximately 20 % of the population has low CYP2D6 activity that renders tamoxifen less effective. The cellular uptake of tamoxifen by MCF-7 breast cancer cells is known [40] and because the estrogen receptors are located in the periphery of the nuclear membrane, these nanoparticles could provide increased therapeutic benefit by transforming tamoxifen to the active drug inside cells and binding to ER receptors.

Future studies on these biocatalytic P22 VLPs will be required to functionalize the outer surface of the capsid with specific ligands to target specific cells and trigger

internalization as well as to bypass the immune system. Fortunately, there are abundant strategies being developed to target nanoparticles to specific cell linages [41–43] that are compatible with VLP functionalization.

Conclusions

The P22 viral nanostructures are remarkable protein containers, as demonstrated in this study, where biocatalytic VLPs were generated based on the directed encapsulation of CYPBM3 “21B3”. This nanobioreactor contains a considerable amount of CYP per capsid. The CYP cargo retains 70 % of the catalytic activity, and showed a slightly higher K_M as compared to the free enzyme. New unique properties, including protease resistance and stability in acidic pH, were generated through the encapsulation of the CYP inside the P22 capsid. These two improved characteristics of the biocatalytic VLP over the free enzyme, along with a great payload capacity and the successful proof of concept of cytochrome P450 enzymatic delivery in mammalian cells, are attractive for the potential use of these nanoreactors as enzymatic delivery systems for future therapeutic applications.

This potent CYP nanobioreactor can be exploited for enzyme prodrug therapy, particularly to activate anticarcinogenic drugs into its active metabolites since it outperforms the generally low activities of human CYP. The P22-CYP nanobioreactor also provides a unique model for the study of kinetics in highly constrained environments, such as the one found inside the VLP.

Methods

Materials

DNA primers and DNA sequencing were obtained from Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL). *E. coli* BL21(DE3) and 10G electrocompetent *E. coli* cells were purchased from Lucigen (Middleton, WI). Pfu Ultra DNA polymerase was obtained from Agilent Technologies (Santa Clara, CA). T4 DNA ligase and restriction enzymes NcoI, BamHI and SacI were purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA). MiniElute Reaction Cleanup Kit, QIAquick Gel Extraction Kit and QIAprep Spin Miniprep kit were acquired from Qiagen (Valencia, CA). Hydrogen peroxide, 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) and 7-benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin (BFC) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Trypsin from bovine pancreas (Type I, ~10,000 BAEE units/mg protein) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Expression and purification of free CYPBM3 “21B3”

The plasmid pCWori encoding the heme domain of the CYPBM3 “21B3” was a kind gift from Prof. France Arnold from the California Institute of Technology

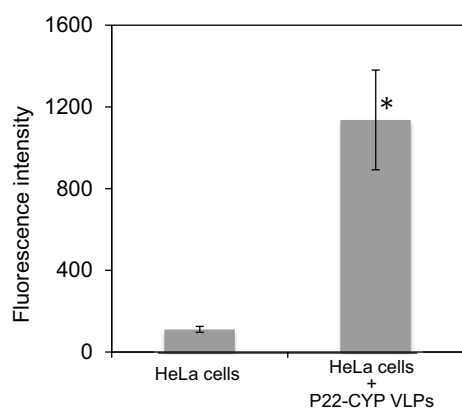


Fig. 4 Cytochrome P450 enzymatic activity of transfected HeLa cells. The activity of endogenous CYP and lipofected P22-CYP VLP in HeLa cells was measured by the transformation of BFC reagent into the fluorescent HFC compound. Intensity in fluorescence was obtained in both cases from a 200,000 cells suspension with an excitation/emission spectra at 254/510 nm. Statistical significance was analyzed by the Student's t test (* $p < 0.01$)

(Caltech). The CYPBM3 mutant 21B3 was expressed in *E. coli* using the β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible pCWori vector as previously described [21]. CYPBM3 “21B3” purification was performed by chromatography in an EconoSystem from Bio-Rad equipped with a 5 mL Ni-pre-charged HisTrap HP column (Amersham Biosciences). The equilibration buffer consisted in 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl and 10 mM imidazole, pH 8. The protein mixture was loaded at 1.5 mL min^{-1} . The CYP protein was eluted in a buffer containing 300 mM imidazole at 3 mL/min for 10 min. The colored fractions were collected, concentrated by ultrafiltration and stored at -20°C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, containing 10 % glycerol. CYP protein concentration was determined by using the CO assay [26].

Plasmid constructs

The CYPBM3 “21B3” gene was amplified by PCR from the plasmid pCWori CYBM3 using the forward primer, 5'-AAAAATCATGCCATGGCAATTAAAGAAATGCCT-3' and reverse primer, 5'-AAAAAAGCGGGATCCAGTGCTAGGTGAAGGAA-3'.

The amplified gene product was digested with NcoI and BamHI (underlined in primer sequences, respectively) and ligated into the previously linearized pETDuet-1 assembler vector containing the truncated scaffold protein SP₁₄₁₋₃₀₃ and the P22 coat protein [16]. The ligation reaction was transformed into 10G electrocompetent cells and colonies were screened by colony PCR and restriction enzyme digestion. Hits were sequenced (Huntsville, AL) to confirm the correct DNA sequence. Once the correct sequence was verified, the pETDuet CYP-SP+CP_{P22} plasmid (Amp^R) was transformed into BL21(DE3) for the simultaneous expression strategy. The fusion CYPBM3 “21B3”—scaffold protein (CYP-SP) gene was subcloned from the pETDuet CYP-SP + P22 into the pBAD plasmid. The pETDuet CYP-SP + P22 plasmid and pBAD vector were both digested with NcoI and SacI. The digested products were ligated and transformed into 10G electrocompetent cells. Colonies were screened by colony PCR and restriction enzyme digestion. Hits were sequenced (Huntsville, AL) to corroborate for the right DNA sequence. Once the correct sequence was verified, the pETDuet CYP-SP + CP_{P22} plasmid (Amp^R) and the pRSF P22 plasmid (Km^R) were transformed into BL21(DE3) for the differential expression strategy.

Simultaneous protein expression strategy

E. coli BL21(DE3) cells harboring the expression plasmid pETDuet CYP-SP+CP_{P22} were grown on Terrific Broth (TB) medium, supplemented with 0.5 mM thiamine and trace elements, at 37°C and 180 rpm in the presence of ampicillin to maintain selection for the plasmid

until reaching and $\text{OD}_{600} = 0.8$. At this point, 0.5 mM of isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and 1 mM δ -aminolevulinic acid were added. Cell cultures were grown for additional 5 h at 30°C and 135 rpm, then cells were harvested by centrifugation and the pellets stored at -20°C overnight until purification.

Differential protein expression strategy

E. coli BL21(DE3) cells harboring the expression plasmids pBAD CYP-SP and pRSF P22 were grown on TB medium, supplemented with 0.5 mM thiamine and trace elements, at 35°C and 150 rpm for 7 h in the presence of ampicillin and kanamycin to maintain selection for both plasmids. At this point, two different induction schemes were followed: (1) The CYP-SP gene was induced first with 0.2 % of L-arabinose and the culture was supplemented 1 mM δ -aminolevulinic acid. The cell culture was grown for 16 h. After this period of time, the CP_{P22} gene was induced with 0.5 mM of IPTG and the cultures were grown for 3 additional hours at 30°C and 150 rpm, then cells were harvested by centrifugation and the pellets stored at -20°C . (2) The differential expression was performed as stated above but the expression of the CYP-SP gene was induced with 0.125 % of L-arabinose and the P22 with 0.3 mM IPTG.

P22-CYP VLP purification

Cell pellets were resuspended in lysis buffer (50 mM sodium phosphate, 100 mM sodium chloride, pH 7.6) and lysed by sonication. Cell debris were removed by centrifugation at $12,000\times g$ for 45 min at 4°C . P22 VLPs were purified from the supernatant by ultracentrifugation over a 35 % (w/v) sucrose cushion and spun at $215,041\times g$ on a Sorvall WX Ultra 80 ultracentrifuge (Thermo Scientific) for 50 min at 4°C . The resulting P22 VLP pellet was resuspended in PBS (50 mM sodium phosphate, 25 mM sodium chloride, pH 7.0) and then purified over a $60 \times 1.6 \text{ cm}$ HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 size exclusion column (GE Healthcare) using an AKTA Pharmacia FPLC. Flow rate for SEC purification was 1 mL min^{-1} of PBS. Fractions taken from SEC containing P22 VLPs were concentrated by ultracentrifugation at $215,041g$ for 50 min at 4°C and the resulting capsid containing pellet was resuspended in 100 mM Tris-HCl pH 8 buffer. The purity of VLPs has been verified by gel electrophoresis and transmission electron microscopy (TEM). P22 VLPs concentration was determined by UV absorption at 280 nm using a molar extinction coefficients of $\epsilon_{280} = 44,920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for coat protein and $\epsilon_{280} = 52,830 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for CYP-SP (theoretically calculated using ProtParam, [44]). The total concentration of protein in the P22 capsid with encapsulated CYP-SP (P22-CYP VLPs) was calculated using the Lambert-Beer

equation, $Abs_T = C_{CP} \cdot \epsilon_{CP} \cdot l + C_{CYP-SP} \cdot \epsilon_{CYP-SP} \cdot l$ as described previously [15]. Abs_T is the total absorbance of the sample measured at 280 nm.

Size exclusion chromatography with multiangle light scattering and refractive index detection (HPLC-MALS-RI)

Samples were separated through a WTC-100S5 (Wyatt Technologies) size exclusion column utilizing an Agilent 1200 HPLC. Elution was performed at flow rate of 0.7 mL min^{-1} , for a total run time of 25 min using 50 mM phosphate pH 7.2 buffer containing 100 mM sodium chloride and 200 ppm sodium azide. Samples of 25 μL (1 mg mL^{-1} concentration) were loaded into the column and the total run time was 30 min. Samples were detected using a UV-Vis detector (Agilent), a Wyatt HELEOS Multi Angle Laser Light Scattering (MALS) detector, and an Optilab rEX differential refractometer (Wyatt Technology Corporation). The molecular weight of the P22-CYP VLPs, the polydispersity of the sample as well as the hydrodynamic radius of the particle was calculated with Astra 5.3.14 software (Wyatt Technology Corporation).

The number of enzymes encapsulated within a P22 VLP was calculated using the following formula

$$CYP - SP_{percapsid} = \frac{M_{(P22capsid+CYP-SP)} - M_{(capsid)}}{M_{(CYP-SP)}} \quad (1)$$

where $M_{(P22capsid+CYP-SP)}$ is the molecular weight of the capsid with the encapsulated CYP-SP (determined experimentally with HPLC-MALS-RI), M_{capsid} is 19,572 kDa ($46.6 \text{ kDa} \times 420 \text{ subunits}$) and M_{CYP-SP} is 71.5 kDa (calculated with Serial Clones 2.6, Franck Perez, Serial Basics).

Transmission electron microscopy

VLPs ($10 \mu\text{L}$, 0.1 mg mL^{-1}) were applied to carbon-formvar coated grids and incubated for 1 min, excess sample was removed with Whatman filter paper. Grids were then washed with $10 \mu\text{L}$ of distilled water, removing away liquid shortly after addition with filter paper and stained with $5 \mu\text{L}$ 1 % uranyl acetate for 1 min. Excess stain was removed by blotting with filter paper. Samples were analyzed with a LEO 912AB transmission electron microscope operated at 100 kV.

Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS)

A P22-CYP VLP sample (21.6 mg) was incubated in concentrated nitric acid (HNO_3) for 16 h at 70°C . After sample mineralization, it was diluted with water to a final HNO_3 concentration of 5 % in a final volume of 50 mL. Samples were sent to Energy Laboratories, Inc (Billings, MT, USA) to be analyzed. Sulfur was used as internal

reference (8401 sulfur atoms per P22-CYP capsid) for determining the ratio of iron to protein.

Free CYP and P22-CYP kinetic assays

The CYP enzymatic activity was determined by the transformation of 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) and spectrometrically monitored at 468 nm ($\epsilon_{468} = 14,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) using an Agilent 8453 UV-Vis spectrophotometer. All reactions were performed in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8) at room temperature in a final volume of 0.1 mL. For the determination of catalytic parameters the concentration of 2,6-DMP was fixed at 500 μM . The reaction was initiated by adding H_2O_2 in a range between 1 and 60 mM. Catalytic constant values were obtained by fitting the data to a Michaelis-Menten equation (GraphPad Prism 6, GraphPad Software, Inc.).

P22-CYP VLPs stability against acidic pH

The residual activity of free CYP and P22-CYP was measured at pH 5 (100 mM sodium acetate buffer) and pH 6 (100 mM potassium phosphate buffer), incubating the samples for 1 h in each buffer. Before determining enzymatic activity, samples were centrifuged for 3 min at 16,000g. The residual activity was measured in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8) at room temperature using 500 μM 2,6-DMP as a substrate and 5 mM H_2O_2 to initiate the reaction.

P22-CYP VLPs protection against protease degradation

The encapsulated and free CYP were treated with 10 U of trypsin per 1 mg of enzyme and incubated for 1 and 20 h at room temperature in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8). After incubation, the residual activity was determined as stated above.

Cell line and cell culture

Human cervix carcinoma cells (HeLa cells) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum (FBS, Benchmark, Gemini Bio Products), 1 % Penicillin streptomycin (Sigma-Aldrich), 1 % L-glutamine and 1.5 g/l sodium bicarbonate. Cells were propagated in growth medium and maintained at 37°C and 5 % CO_2 .

P22-CYP VLPs transfection

Cell culture Petri dishes coated with Poly-D-lysine (Mat-Tek P35GC1.5-10C) were used to seed 250,000 HeLa cells in DMEM media and incubated overnight at 37°C and 5 % CO_2 . Transfection of P22-CYP nanoparticles was achieved using Lipofectamine 2000 reagent (Life technologies), according to [45] with few modifications to the manufacture's protocol. Briefly, 3 μL of Lipofectamine

2000 was diluted in 100 μ l of DMEM media without antibiotic and FBS (DMEM-SF) and 3.14×10^{11} P22-CYP nanoparticles were mixed with 100 μ l of DMEM-SF media, both preparations were pre-incubated for 15 min at room temperature (RT). Afterwards, both samples were mixed for 30 min at RT. Prior to the addition of this transfection mixture to HeLa cell culture; cells were rinsed twice with sterile PBS buffer. The transfection mixture was added slowly on the top of the cell culture and let stand for 30 min at RT, then 1.8 ml of DMEM-SF media was added into HeLa cells culture and incubated for 4 h at 37 °C and 5 % CO₂. After incubation, cell media was removed and the culture was rinsed once with PBS and 2 ml of complete DMEM media was added. HeLa cells transfected with VLP-CYP nanoparticles were incubated overnight at 37 °C and 5 % CO₂.

P22-CYP VLP enzyme activity in vitro assay

CYP enzyme activity was assayed in HeLa cells (endogenous CYP activity) and in HeLa cells transfected with P22-CYP VLPs. The CYP activity was estimated by the transformation of 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin (BFC) in the fluorescent product 7-hydroxy-4-[trifluoromethyl]-coumarin (HFC) according to [46] with some modifications. Briefly, cell culture media was discarded and 15 μ l of 20 mM BFC diluted in 150 μ l of complete DMEM media was added to each culture plate and incubated in darkness for 10 min at RT. Complete DMEM media was added up to 1.5 ml to each plate and further incubated for 30 min at 37 °C and 5 % CO₂. Then, 4.5 μ l of 1 mM of hydrogen peroxide was added to each culture and incubated for 10 min at 37 °C and 5 % CO₂. Cell culture plates were rinsed three times with PBS before the addition of 2 mL of complete DMEM media was added to each plate and incubated for 2 h at 37 °C and 5 % CO₂ for further imaging analysis.

Confocal microscopy cell imaging

HeLa cell cultures treated with BFC reagent were fixed with 4 % formaldehyde-PBS solution at 4 °C for 15 min. After fixation, cells were permeabilized with 0.5 % Triton X/PBS for 15 min at 4 °C. Nuclear staining was achieved by incubated the cells with DAPI at 0.5 ng/ml in darkness for 10 min at RT, followed by five washes with PBS. Nuclear staining with DAPI was also visualized with an inverted laser-scanning microscope Olympus FluoView FV1000 (Japan) using an argon ion laser for excitation at 405 nm wavelength and filters for emission of DAPI. BFC transformation into the fluorescent reagent HFC was detected using the GFP filter channel (excitation at 488 nm and emission at 515–530 nm). Cells were visualized with a 63 $\times$ (DIC), 1.4 N.A. planapochromatic oil immersion objective. The imaging parameters used

produced no detectable background signal from any source other than from BFC and DAPI. Confocal images were captured using MetaMorph software for Olympus.

CYP activity quantification in HeLa cells transfected with P22-CYP VLPs

The enzymatic activity of CYP in non-transfected and transfected HeLa cells with P22-CYP VLPs was measured spectrofluorimetrically. The fluorescence intensity originated by CYP-catalyzed transformation of BFC into HFC was monitored. After transfection, media from P22-CYP transfected cells and non-transfected HeLa cells (control cells) was replaced by 1.5 ml of complete DMEM media containing 15 μ l of 20 mM BFC and incubated under darkness for 30 min at 37 °C and 5 % CO₂. Then, cell culture plates were rinsed three times with PBS before the addition of 4.5 μ l of 1 M of hydrogen peroxide and incubated for 10 min at 37 °C and 5 % CO₂. After incubation, cells were rinsed with PBS and harvested with trypsin/EDTA treatment. Pelleted cells were counted and diluted in PBS to obtain 200,000 cells. Fluorescence intensity from transfected and non-transfected HeLa cells was measured in a fluorescence spectrophotometer (Hitachi F-7000), using an excitation source at 254 nm and emission measurement at 510 nm.

Abbreviations

BFC: 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin; CCMV: cowpea chlorotic mottle virus; CP: virus coat protein; CYP: cytochrome P450; CYP-SP: fusion protein cytochrome P450-scaffold protein; HFC: 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin; HPLC-MALS-RI: high-performance liquid chromatography equipped with multi-angle laser light scattering (MALS) and refractive index (RI) detectors; IPTG: isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside; P22-CYP: capsid nanoparticle containing cytochrome P450; SP: virus scaffold protein; VLP: virus-like particle.

Authors' contributions

LSS performed most of experiments except tumor cell transfection. ATM and KJM carried out the cell transfection experiments. RDCN contributed to the design of encapsulation strategy. DPP and TD contributed on the design of the fusion protein and P22 capsid. RVD designed the study and is the PhD supervisor of LSS. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

An important part of this work has been performed under the direction of Dr. Trevor Douglas. The authors consider him as co-corresponding author.

Author details

¹ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico. ² Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Km 107 carretera Tijuana-Ensenada, 22860 Ensenada, Baja California, Mexico. ³ Cátedras CONA-CyT affiliated to CNYN-UNAM, Ensenada, Mexico. ⁴ Department of Chemistry and Biochemistry, University of Texas at Tyler, Tyler 75799, TX, USA. ⁵ Department of Chemistry, Indiana University, Bloomington, IN 47405, USA.

Acknowledgements

This work has been founded by the National Council of Science and Technology of Mexico (LSS scholarship and research stay), SEP-CONACYT (165633), PAPIIT-UNAM (IN200814) and supported in part by a grant from the National Science Foundation (NSF-BMAT DMR-1435460). We thank Dr. Katrin Quester

for her technical assistance. Dr. Juárez-Moreno is member of the International Network in Bionanotechnology (CONACyT), Mexico.

Competing interests

The authors declared that they have no competing interests.

Received: 10 July 2015 Accepted: 24 September 2015

Published online: 09 October 2015

References

- Vellard M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Curr Opin Biotechnol*. 2003;14:444–50.
- Kang TS, Stevens RC. Structural aspects of therapeutic enzymes to treat metabolic disorders. *Hum Mutat*. 2009;30:1591–610.
- Maximov V, Reukov V, Vertegel AA. Targeted delivery of therapeutic enzymes. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2009;19:311–20.
- Beutler E. Enzyme replacement therapy. *Trends Biochem Sci*. 1981;6:95–7.
- Lachmann RH. Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Curr Opin Pediatr*. 2011;23:588–93.
- Kishnani PS, Beckemeyer AA. New therapeutic approaches for Pompe disease: enzyme replacement therapy and beyond. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2014;12(Suppl 1):114–24.
- Satchi R, Connors TA, Duncan R. PDEPT: polymer-directed enzyme prodrug therapy. *Brit J Cancer*. 2001;85:1070–6.
- Bagshawe KD. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006;6:1421–31.
- Schellmann N, Deckert PM, Bachran D, Fuchs H, Bachran C. Targeted enzyme prodrug therapies. *Mini Rev Med Chem*. 2010;10:887–904.
- Torchilin V. Intracellular delivery of protein and peptides therapeutics. *Drug Discov Today Technol*. 2008;5:e95–103.
- Pokorski JK, Steinmetz NF. The art of engineering viral nanoparticles. *Mol Pharm*. 2011;8:29–43.
- Comellas-Aragones M, Engelkamp H, Claessen VI, Sommerdijk NA, Rowan AE, Christianen PC, Maan JC, Verduin BJ, Cornelissen JJ, Nolte RJ. A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nat Nanotechnol*. 2007;2:635–9.
- Fiedler J, Brown S, Brown SD, Lau JL, Finn MG. RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angew Chem Int Ed*. 2010;49:9648–51.
- Minten IJ, Claessen V, Blank K, Rowan AE, Nolte RJ, Cornelissen JJ. Catalytic capsids: the art of confinement. *Chem Sci*. 2011;2:358–62.
- Patterson D, Prevelige PE, Douglas T. Nanoreactors by programmed enzyme encapsulation inside the capsid of the bacteriophage P22. *ACS Nano*. 2012;6:5000–9.
- Patterson D, Shwarz B, El-Boubbou K, Oost J, Prevelige PE, Douglas T. Virus-like particle nanoreactors: programmed encapsulation of the thermostable CelB glycosidase inside the P22 capsid. *Soft Matter*. 2012;8:10158–66.
- O'Neil A, Prevelige PE Jr, Douglas T. Stabilizing viral nano-reactors for nerve-agent degradation. *Biomater Sci*. 2013;1:881–6.
- Patterson DP, Schwarz B, Waters RS, Gedeon T, Douglas T. Encapsulation of an enzyme cascade within the bacteriophage P22 virus-like particle. *ACS Chem Biol*. 2014;9:359–65.
- Teschke C, Parent K. 'Let the phage do the work': using the phage P22 coat protein structures as a framework to understand its folding and assembly mutants. *Virology*. 2010;401:119–30.
- O'Neil A, Reichhardt C, Johnson B, Prevelige PE Jr, Douglas T. Genetically programmed in vivo packaging of protein cargo and its controlled release from bacteriophage P22. *Angew Chem Int Ed*. 2011;50:7425–8.
- Cirino PC, Arnold FH. A Self-sufficient peroxide-driven hydroxylation biocatalyst. *Angew Chem Int Ed*. 2003;42:3299–301.
- Sánchez-Sánchez L, Roman R, Vázquez-Duhalt R. Pesticide transformation by a variant of CYPBM3 with improved peroxxygenase activity. *Pestic Biochem Physiol*. 2012;102:169–74.
- Carmichael AB, Wong LL. Protein engineering of *Bacillus megaterium* CYP102. The oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Eur J Biochem*. 2001;268:3117–25.
- Di Nardo G, Fantuzzi A, Sideri A, Panico P, Sassone C, Giunta C, Gilardi G. Wild-type CYP102A1 as a biocatalyst: turnover of drugs usually metabolised by human liver enzymes. *J Biol Inorg Chem*. 2007;12:313–23.
- Sánchez-Sánchez L, Cadena-Nava RD, Palomares LA, Ruiz-García J, Koay MST, Cornelissen JJMT, Vázquez-Duhalt R. Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450. *Enzyme Microb Tech*. 2014;60:24–31.
- Guengerich FP, Martin MV, Sohl CD, Cheng Q. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nat Protoc*. 2009;4:1245–51.
- Egawa T, Hishiki T, Ichikawa Y, Kanamori Y, Shimada H, Takahashi S, Kitagawa T, Ishimura Y. Refolding processes of cytochrome P450cam from ferric and ferrous acid forms to the native conformation. *J Biol Chem*. 2004;279:32008–17.
- Chen YP, Chen CT, Hung Y, Chou CM, Liu TP, Liang MR, Chen CT, Mou CY. A new strategy for intracellular delivery of enzyme using mesoporous silica nanoparticles: superoxide dismutase. *J Am Chem Soc*. 2013;135:1516–23.
- Estrada LH, Chu S, Champion JA. Protein nanoparticles for intracellular delivery of therapeutic enzymes. *Pharm Nanotechnol*. 2014;103:1863–71.
- Cho EC, Zhang Q, Xia Y. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. *Nat Nanotechnol*. 2011;6:385–91.
- Inoue T, Kawano MA, Takahashi RU, Tsukamoto H, Enomoto T, Imai T, Kataoka K, Handa H. Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with the minor capsid proteins VP2/3. *J Biotechnol*. 2008;134:181–92.
- Li HY, Poulos TL. Fatty acid metabolism, conformational change, and electron transfer in cytochrome P-450BM-3. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1441:141–9.
- Maurer SC, Schulze H, Schmid RD, Urlacher V. Immobilisation of P450BM-3 and an NADP(+) cofactor recycling system: towards a technical application of heme-containing monooxygenases in fine chemical synthesis. *Adv Synth Catal*. 2003;345:802–10.
- Zhao L, Gueven G, Li Y, Schwaneberg U. First steps towards a Zn/Co(III) sep-driven P450 BM3 reactor. *App Microbiol Biot*. 2011;91:989–99.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:161–74.
- Simon C, Schaepe S, Breunig K, Lillie H. Production of polyomavirus-like particles in a Klgal80 knockout strain of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Prep Biochem Biotechnol*. 2013;43:217–35.
- Simon C, Klose T, Herbst S, Han BG, Sinz A, Glaeser RM, Stubbs MT, Lillie H. Disulfide linkage and structure of highly stable yeast-derived virus-like particles of murine polyomavirus. *J Biol Chem*. 2014;289:10411–8.
- Sorkin A, Zastrow M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:600–14.
- Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornnell HH, Ibrahim-Hashim A, Bailey K, Balagurunathan Y, Rothberg JM, Sloane BF, et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res*. 2013;73:1524–35.
- Jugminder S, Chawla JV, Amij MM. Cellular uptake and concentrations of tamoxifen upon administration in poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles. *AAPS PharmSci*. 2003;5:28–34.
- Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci*. 2013;48:416–27.
- Wanga M, Thanoua M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res*. 2010;62:90–9.
- Ruoslahti E. Peptides as targeting elements and tissue penetration devices for nanoparticles. *Adv Mater*. 2012;24:3747–56.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM, editor. *The Proteomics Protocol Handbook*. New Jersey: Humana Press; 2005. p. 571–607.
- Azizgolshani O, Garmann RF, Cadena-Nava RD, Knobler CM, Gelbart WM. Reconstituted plant viral capsids can release genes to mammalian cells. *Virology*. 2013;441:12–7.
- Arora V, Cate ML, Ghosh C, Iversen PL. Phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers inhibit expression of human cytochrome P450 3A4 and alter selected drug metabolism. *Drug Metab Dispos*. 2002;30:757–62.