

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

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



**Doctorado en Ciencias
en Nanociencias**

**Bionanorreactores con actividad glucosa oxidasa para la
terapia dirigida del cáncer de mama**

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

Presenta:

Pedro Antonio Gama López

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Pedro Antonio Gama López

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

Dra. Kanchan Chauhan

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno

Dr. Rubén Darío Cadena Nava

Dr. Ismael Bustos Jaimes



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Pedro Antonio Gama López** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Nanociencias.

Bionanorreactores con actividad glucosa oxidasa para la terapia dirigida del cáncer de mama

Resumen aprobado por:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

El cáncer de mama es el tumor maligno más común y una principal causa de mortalidad en mujeres. La evolución de la nanomedicina ha abierto la oportunidad de mejorar las terapias actuales a través del uso de nanopartículas tratamiento eficiente del cáncer y reducir los efectos secundarios. En este proyecto se realizó una preparación de nanopartículas tipo virus (VLPs) catalíticamente activas, constituidas completamente a base de proteínas, para actuar como agente antitumoral contra el cáncer de mama. Su efecto citotóxico fue estudiando *in vitro* con la línea celular de tumor de mama murino 4T1. Las VLPs catalíticas fueron preparadas mediante el autoensamble de las proteínas de la cápside del *virus del mosaico del bromo* (BMV) alrededor de la enzima glucosa oxidasa (GOx). La complementariedad de cargas electrostáticas entre la superficie de la enzima GOx y el residuo N-terminal de la CP del BMV fue fundamental para la encapsulación por autoensamblaje, el cual fue modulado variando el pH y la fuerza iónica. Las VLPs catalíticas fueron denominadas bionanorreactores enzimáticos con actividad GOx o VLP-GOx. La actividad catalítica de la enzima GOx tiene el potencial de agotar la glucosa y el oxígeno del ambiente tumoral, además de producir peróxido de hidrógeno generando citotoxicidad. Por otra parte, los bionanorreactores VLP-GOx fueron funcionalizados en su superficie externa con la proteína albúmina sérica humana (HSA) para el direccionamiento específico a células tumorales. Las propiedades catalíticas de los bionanorreactores VLP-GOx y VLP-GOx@HSA siguieron el modelo de Michaelis-Menten. Los bionanorreactores sin funcionalización y funcionalizados, mostraron un efecto citotóxico en células tumorales 4T1. No obstante, también presentaron actividad citotóxica en la línea celular 293T de riñón embrionario humano, que fue utilizada como modelo de células sanas, pero su efecto fue menor en comparación con las células tumorales. En este caso la funcionalización de los bionanorreactores VLP-GOx con HSA no mostró mejora en el efecto citotóxico. Por otra parte, fue estudiado el efecto de los bionanorreactores a nivel citológico en la línea celular triple negativo MDA-MB-231/eGFP de tumor de mama humano, en donde se observó daño en la morfología y disrupción de la membrana celular probablemente debido a la producción de peróxido de hidrógeno por la actividad GOx y la actividad antioxidante de la catalasa endógena inducida en las células tumorales. Finalmente, el potencial uso de los bionanorreactores con actividad GOx en la terapia dirigida del cáncer de mama es discutido en este trabajo.

Palabras clave: cáncer de mama, bionanorreactores, glucosa oxidasa, nanopartículas tipo virus o VLPs, efecto citotóxico.

Abstract of the thesis presented by **Pedro Antonio Gama López** as a partial requirement to obtain the Philosophical Doctor of Science degree in Nanosciences.

Bionanoreactors with glucose oxidase activity for targeted breast cancer therapy

Abstract approved by:

PhD. Rafael Vázquez Duhalt
Thesis Director

Breast cancer is the most common malignant tumor disease and the leading cause of cancer death female. The evolution of nanomaterials science opened the opportunity to improve conventional cancer therapies, enhancing therapy efficiency and reducing side effects. Currently, the antitumoral capacity of different kinds of nanoparticles is intensively studied. Herein, to have an antitumoral agent against breast cancer, protein cages conceived as enzymatic bionanoreactors were designed and produced by using virus-like nanoparticles (VLPs) from *Brome Mosaic Virus* (BMV) and containing the catalytic activity of glucose oxidase enzyme (GOx). The GOx enzyme was encapsulated into the BMV capsid (VLP-GOx), and the resulting enzymatic nanoreactors were coated with human serum albumin (VLP-GOx@HSA) for breast tumor cell targeting. The enzyme encapsulation was obtained by using the charge complementarity of the surface of the GOx enzyme and the N-terminal residue of the capsid protein (CP) of BMV VLP. The effect of the synthesized GOx bionanoreactors on breast tumor cell lines was studied *in vitro*. Both bionanoreactor preparations VLP-GOx and VLP-GOx@HSA showed to be highly cytotoxic for breast tumor cell cultures. Nevertheless, cytotoxicity for human embryonic kidney cell line 293T was also found. The monitoring of bionanoreactor treatment on MDA-MB-231/eGFP triple-negative breast cancer cells showed an evident oxygen production by the endogenous catalase antioxidant enzyme induced by the high hydrogen peroxide production from GOx activity. The bionanoreactors containing GOx activity are entirely suitable for cytotoxicity generation in tumor cells. The HSA functionalization of the VLP-GOx bionanoreactor, a strategy designed for selective cancer targeting, showed no improvement in the cytotoxic effect. The GOx containing enzymatic bionanoreactors seems to be an interesting alternative to improve the current cancer therapy. The potential use of enzymatic bionanoreactors with GOx activity for breast cancer treatment is discussed in this work.

Keywords: Breast cancer, Glucose Oxidase (GOx), bionanoreactors, Virus-like nanoparticles, BMV.

Dedicatoria

Dedico a mi madre y su amor infinito que me da fortaleza cada día.

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt.

A mis sobrinos Emilia, Santiago, Paola, Uriel, Sofía, Olivia, Jesús y Héctor Alí.

A mis hermanas.

A la comunidad Joyas del Derramadero, Pinal de Amoles, Querétaro.

Al Consejo Nacional del Fomento Educativo (CONAFE).

A mis amigos Irving Jesús Marín Gómez † y Eder Gerardo Molina † en algún lugar de este basto universo desde donde sé que me acompañan.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de posgrado y al proyecto PAPIIT IN209722-UNAM.

Agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Ensenada, Universidad Nacional Autónoma de México y todo su personal académico y administrativo.

Agradezco a mi asesor el Dr. Rafael Vázquez Duhalt por el incondicional apoyo académico y personal que siempre me brindó, la sabiduría que me compartió y por abrirme las puertas de su laboratorio.

Agradezco a los miembros del comité de tesis Dr. Rubén Darío Cadena Nava, Dra. Kanchan Chauhan, Dra. Karla Oyuki Juárez e Ismael Bustos Jaimes por sus consejos, sus palabras, su seguimiento y disposición incondicional. También agradezco a la Dra. Patricia Juárez por darme la oportunidad de realizar los ensayos celulares *in vitro* en Departamento de Innovación Biomédica, CICESE. Al Dr. Arturo Baiza y Dra. Guadalupe Hernández por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio.

Agradezco en especial a Dolores Sarracino por su infinito apoyo y amabilidad en el departamento de servicios escolares y a Ruth Eaton por su apoyo en la solicitud de la beca CONAHCyT. Agradezco también a la Dra. Denise Re, a MPCC Laura Rosales y Citlali Romero por su amabilidad y apoyo en los trámites administrativos, a la Dra. Elizabeth Avilés y L.I. Nadua Dajlala por su apoyo en biblioteca.

Agradezco a mi familia por su apoyo infinito. En especial a mi madre Félix López Honorato, a mi hermana mayor Edith Gama, a mi abuela Luisa Honorato y a nuestra amiga Isabel Nava Delgado.

Agradezco a la Dra. Josefina Cortés Eslava, Dra. Clara Esquivel Huesca, Sra. Egaí Hernández Zamora, M. en C. Ana Rosa Flores, Prof. Elías Domínguez Trejo, Enf. Leticia Manzano, Psic. Gustavo Palestina†, Dr. Federico Aguilar, Dra. Elizabeth Chávez, Sec. Rosario de Anda, Dr. Emilio Bucio, a todos ellos por su infinito apoyo y siempre creer en mí. Agradezco el apoyo incondicional que me ofrecieron mis amigos de posgrado: Kora Lu Rojas, Jorge Ontiveros, Luis López, Ivonne Julieta, Jordán Molina, Carolina Bojórquez y Stefania Brandao y a todos los compañeros del posgrado que me brindaron su apoyo. Agradezco a Christian Jasso por mostrarme el camino del temazcal, y Manuel Cardona en la oratoria.

A mis amigos del alma por siempre estar ahí para escucharme Reyna Bahena, Cesar H Sotelo, Danae Atlizu Becerra, Gloria Pech y fam., Alán Dzul, Carlos Camino, Marbella Hernández y Teresita de Jesús.

Agradezco a Francisco Ruiz Medina (Panchito) por su amable disposición y apoyo técnico en el servicio de microscopía electrónica TEM. Agradezco a Javier Pérez por su apoyo técnico en el laboratorio.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1.1 El cáncer de mama	1
1.1.2 Terapia sistémica convencional	2
1.1.3 Nanovehículos para la entrega controlada de fármacos	3
1.1.4 Cápsides virales o nanopartículas tipo virus (VLP)	3
1.1.5 Bionanorreactores enzimáticos a base de VLPs.....	5
1.1.6 Actividad glucosa oxidasa.....	5
1.1.7 Albúmina sérica humana.....	7
1.2 Antecedentes	9
1.2.1 La glucosa oxidasa como agente antitumoral.....	9
1.2.2 La albúmina sérica humana para el direccionamiento selectivo	10
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos	11
1.4.1 Objetivo general.....	11
1.4.2 Objetivos específicos.....	12
Capítulo 2. Metodología.....	13
2.1 Materiales	13
2.2 Diseño de bionanorreactores BMV-GOx.....	13

2.3	Propiedades electrostáticas de GOx y la proteína CP	14
2.4	Producción de viriones BMV y aislamiento de la proteína CP	15
2.5	Ensamble de bionanorreactores VLP-GOx	18
2.6	Funcionalización de la superficie de los bionanorreactores VLP-GOx	20
2.7	Caracterización de bionanorreactores	21
2.8	Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i>	23
2.9	Estudio de microscopia de fluorescencia	24
2.10	Análisis estadístico	25
Capítulo 3.	Resultados	26
3.1	Complementariedad de cargas electrostáticas	26
3.2	Ensamble de bionanorreactores con actividad GOx	27
3.3	Purificación de los bionanorreactores	28
3.4	Funcionalización	29
3.5	Diámetro hidrodinámico de los bionanorreactores	30
3.6	Composición molecular de los bionanorreactores	31
3.7	Actividad catalítica de los bionanorreactores	31
3.8	Morfología de los bionanorreactores	33
3.9	Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de los bionanorreactores	34
3.10	Efecto citológico de los bionanorreactores	38
Capítulo 4.	Discusión	40
Capítulo 5.	Conclusiones	46
	Literatura citada	47
	Anexos	57

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Incidencia o casos nuevos (barras azules) y muertes (barras rojas) por tipo de cáncer en mujeres de cualquier edad a nivel mundial durante 2020 registrado por el Observatorio Global de Cáncer, AIIC de la OMS.....	1
Figura 2. Estructura tridimensional de la enzima glucosa oxidasa (GOx) de <i>Aspergillus niger</i> . Subunidad proteica o momero (rosa), cofactor flavín adenín dinucleotido (FAD, amarillo), grupos glucoprianosa (verde). Archivo pdb 1Cf3 (Wohlfahrt, et al., 1999) visualizado en UCSF Chimera®.	6
Figura 3. Estructura tridimensional de la albúmina sérica humana (HSA). La ilustración muestra la estructura terciaria de la HSA y los dominios son mostrados en diferentes colores. Las barras de color amarillo muestran la posición de los puentes disulfuro de cisteínas en la HSA y las esferas amarillas la posición de la cisteína 34 en el dominio IA. Imagen tomada de Larsen y col., archivo pdb 1E7E (Bhattacharya, et al., 2000).	7
Figura 4. Esquema de la arquitectura de los bionanorreactores VLP-GOx y VLP-GOx@HSA.	13
Figura 5. Extracción y purificación del virus BMV. A) y B) Hojas de cebada infectadas con el virus BMV. C) Macerado de las hojas infectadas. D y E) Mezcla del filtrado de virus y cloroformo antes y después de ser homogenizada, respectivamente. F) Separación de fases de la mezcla, superior: extracto de virus (flecha amarilla), inferior: cloroformo con residuos de fibra. G) Colchón de sacarosa (flecha roja).	16
Figura 6. Gradiente de Sacarosa. En la imagen se aprecia la banda o fase azul (flecha blanca) correspondiente a la fase que contiene los viriones del BMV dentro del tubo de ultracentrífuga.	17
Figura 7. Ensamble de los bionanorreactores VLP-GOx. A) Diálisis en condiciones de autoensamblaje para la síntesis de bionanorreactores (enzima GOx más proteína de cápside del BMV dentro de la membrana de diálisis). B) Precipitado de bionanorreactores VLP-GOx (flecha amarilla) en el fondo del tubo de ultracentrífuga.	18
Figura 8. Estructura tridimensional de la VLP del BMV. A) Sitios cisteína (etiquetas rojas) en la superficie de la VLP. B) Capsómero del BMV con cisteína 107 (etiquetas rojas) por cada CP. Archivo.pdb 1js9 (Lucas, et al., 2002) visualizado en UCSF Chimera®.	20
Figura 9. Reacción de actividad GOx acoplada a la enzima peroxidasa.....	22
Figura 10. Representación de la distribución de cargas electrostáticas en la superficie interna de los capsómeros de la VLP del BMV (pentámero y hexámero) y la enzima GOx mediante un mapa de colores en la estructura tridimensional. Escala de color: rojo (cargas negativas) y azul (cargas positivas). Archivos pbd analizados con el software Maestro Schrödinger®.	26
Figura 11. Perfil de potencial Z de A) la enzima GOX y B) la proteína CP desensamblada. Datos experimentales (puntos verdes). Punto isoeléctrico estimado (punto rojo). Barra amarilla en pH 5.1 (condiciones de autoensamblaje).	27

- Figura 12. Ensamble y funcionalización de bionanorreactores tipo VLP del BMV con actividad GOx. 28
- Figura 13. Purificación de bionanorreactores tipo VLP por cromatografía de exclusión de tamaño molecular. A) Cromatogramas sobrelapados donde se aprecian las diferencias en el tiempo de retención de las nanopartículas del BMV (azul), la enzima GOx (verde), y la proteína CP (púrpura), respectivamente. B) Cromatograma correspondiente al tiempo de retención de los bionanorreactores VLP-GOx (1:3 relación molar). 30
- Figura 14. Composición en proteína de los bionanorreactores con actividad GOx por SDS-PAGE. Carril 1: estándar de peso molecular. Carril 2: bionanorreactores VLP-GOx. Carril 3: bionanorreactores VLP-GOx a una doble concentración (2X VLP-GOx). Carril 4: Bionanorreactores funcionalizados con la HSA (VLP-GOx@HSA). Carril 5: VLPs del BMV. Carril 6 GOx. Carril 7: HSA. 32
- Figura 15. Morfología o estructura geométrica de los bionanorreactores GOx. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. A) y B) bionanorreactores sin funcionalización VLP-GOx. C) y D) Bionanorreactores funcionalizados VLP-GOx@HSA. 33
- Figura 16. Actividad citotóxica *in vitro* de los bionanorreactores (VLP-GOx y VLP-GOx@HSA) y preparaciones con VLP sin actividad catalítica (VLPs y VLP@HSA) sobre A) la línea celular 4T1 de tumor de mama murino y B) la línea 293T de riñón embrionario humano, determinada por la tasa de viabilidad celular. Análisis estadístico ANOVA de dos vías ($p < 0.001$). ***Diferencias significativas entre las preparaciones a la misma concentración (proteína total) en el cultivo. ‡ Diferencias significativas con respecto al control sin tratamiento (0 $\mu\text{g/mL}$). Prueba de comparación múltiple de Tukey. 34
- Figura 17. Actividad citotóxica *in vitro* de los bionanorreactores VLP-GOx determinada mediante la tasa de viabilidad celular. Cultivos con línea 4T1 de tumor de mama murino (barras rosas) y línea 293T de riñón embrionario humano (barras azules) expuestos a diferentes concentraciones de bionanorreactores VLP-GOx. Análisis estadístico ANOVA de dos vías ($p < 0.001$). ***Diferencias significativas en la viabilidad a la misma concentración en el cultivo de cada línea celular. Prueba de comparación múltiple de Sidak. 36
- Figura 18. Viabilidad celular de la línea 4T1 de mama murino expuesta ante los bionanorreactores con actividad GOx. Porcentaje de viabilidad celular de la línea 4T1 expuesta ante los bionanorreactores en función de A) la concentración de proteína GOx y B) las unidades de actividad enzimática GOx por cada mililitro de medio de cultivo. 37
- Figura 19. Viabilidad celular de los cultivos de la línea 293T expuestos ante los bionanorreactores con actividad GOx en función de A) la concentración de proteína GOx y B) las unidades de actividad enzimática GOx por mL de cultivo. 38
- Figura 20. Efecto *in vitro* a nivel celular de los bionanorreactores sobre la línea de tumor de mama humano triple negativo MDA-MB-231/ la cual expresa constitutivamente la proteína GFP. Micrografías obtenidas por contraste de fases y microscopía de fluorescencia con filtro de luz verde. Todas las micrografías mostradas corresponden con las mismas coordenadas en el cultivo, pero cada renglón corresponde a un mismo instante. 39
- Figura 21. Cinética enzimática de los bionanorreactores tipo VLP del BMV con actividad GOx y parámetros catalíticos, obtenidos mediante la regresión no lineal de Michaelis-Menten. 57

Figura 22. A) Esquema del experimento control negativo de encapsulación. B) Cromatograma del experimento control negativo, la fracción con pico máximo en 5.8 min corresponde a VLP no catalíticas..... 58

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Diámetro hidrodinámico determinado por dispersión dinámica de luz y constantes catalíticas de los bionanorreactores sintetizados a diferente relación molar. Las cinéticas catalíticas fueron calculadas mediante una regresión no lineal de Michaelis-Menten usando el software CurveExpert Pro®. Los valores de la $V_{\max}$ fueron estimados con base en la proteína total de la preparación.	29
Tabla 2. Composición molecular de los bionanorreactores enzimáticos. Proporción de la enzima GOx, la proteína CP y HSA con base a la composición de proteína y al número de moles en cada preparación de bionanorreactores, respectivamente. Estos valores fueron usados para estimar el número de GOx por cada VLP y los parámetros catalíticos de la cinética enzimática con base al contenido en gramos de GOx.....	32

Capítulo 1. Introducción

1.1.1 El cáncer de mama

El cáncer de mama es el tumor maligno más común y una principal causa de mortalidad en mujeres a nivel mundial (Arnold, et al., 2022; Azamjah, et al., 2019) (**Fig. 1**). El padecimiento de cáncer de mama se caracteriza por la aparición de un adenocarcinoma o tumor maligno en las glándulas mamarias (Corben, 2013). En esta histopatología el tejido afectado sufre alteraciones morfológicas debidas a la proliferación descontrolada de células cancerosas, produciendo tumores y eventualmente metástasis (Blackadar, 2016; Hassanpour & Dehghani, 2017). La incidencia y mortalidad de este padecimiento ha venido en aumento, en 2020 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (AIIC) mediante el Observatorio Global del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS) registró 684,996 muertes por cáncer de mama y 2,261,419 casos nuevos (OMS, 2020).

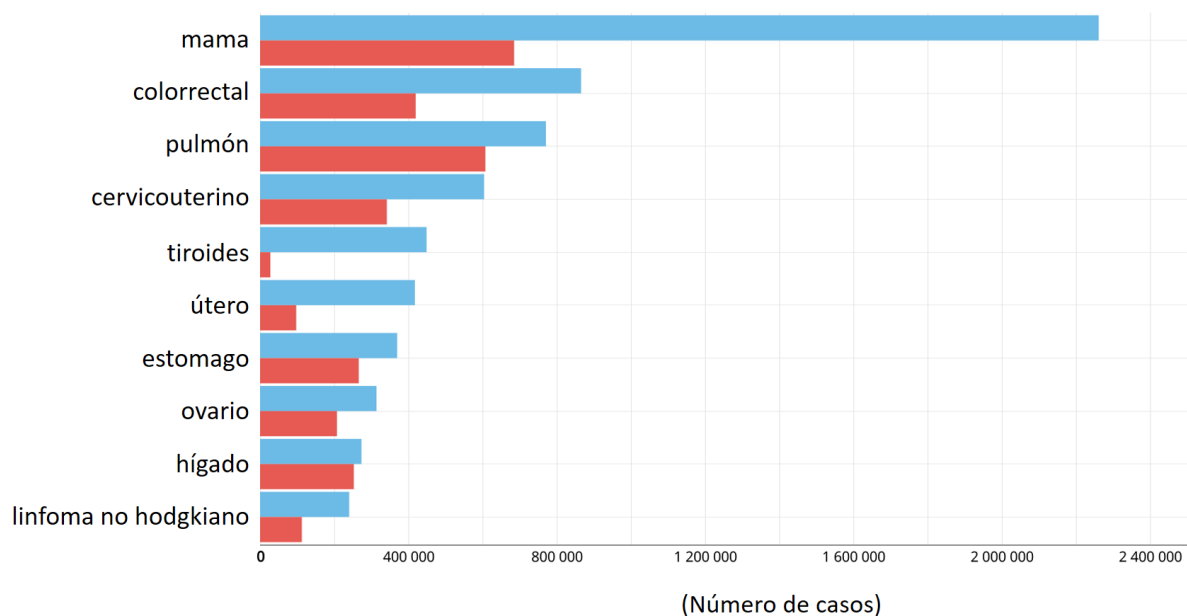


Figura 1. Incidencia o casos nuevos (barras azules) y muertes (barras rojas) por tipo de cáncer en mujeres de cualquier edad a nivel mundial durante 2020 registrado por el Observatorio Global de Cáncer, AIIC de la OMS.

Las principales causas que aumentan el riesgo de padecer cáncer son la exposición a agentes genotóxicos, algunos xenobióticos, radiación, hormonas exógenas, estilo de vida, el consumo de tabaco y alcohol.

También se puede derivar de infecciones con agentes patógenos como microorganismos y virus, entre otras (Blackadar, 2016; Corben, 2013). El cáncer es asociado a una gran diversidad de factores, pero todos ellos derivan en desordenes genéticos o epigenéticos, los cuales alteran el ciclo celular y promueven la proliferación de las células y finalmente la generación de tumores. Cuando las células malignas migran de un tejido canceroso a otro sano y lo invaden generando tumores secundarios ocurre un fenómeno denominado metástasis.

El objetivo principal en la terapia del cáncer de mama es erradicar el tumor del seno y prevenir la metástasis. En la terapia convencional, el tratamiento consiste en la resección quirúrgica del tumor y de los nódulos linfáticos axilares, sin embargo, es altamente invasiva, con consideraciones de administración de radiación postoperatoria. Además, las pacientes con cáncer de mama son tratadas con terapia sistémica, como la quimioterapia, que puede ser preoperatoria (neoadyuvante), postoperatoria (adyuvante) o ambas (Waks & Winer, 2019). No obstante, está reportado que los tratamientos quimiofarmacológicos no específicos inducen efectos secundarios drásticos en las pacientes (Pearce, et al., 2017; Altun, et al., 2018).

El cáncer de mama está clasificado en tres principales subtipos según la presencia o ausencia de marcadores moleculares estándar de receptores hormonales (estrógeno o progesterona) y del factor de crecimiento epidérmico humano dos (ERBB2). Los subtipos son: cáncer de mama positivo a receptor hormonal (HR+) con una frecuencia del 70%; positivo a ERBB2 (ERBB2+) con una frecuencia del 15 al 20%; y triple negativo (tumores que carecen de marcadores moleculares estándar) con una frecuencia de 15% (Waks y Winer, 2019).

1.1.2 Terapia sistémica convencional

De acuerdo con el subtipo de cáncer de mama la terapia sistémica administrada puede ser endocrina y/o quimioterapia. La terapia endocrina se usa en el subtipo cáncer positivo a receptores hormonales y tiene como objetivo contrarrestar el crecimiento tumoral promovido por el estrógeno que es responsable de activar vías oncogénicas en el seno. La terapia endocrina estándar consiste en el suministro de antiestrógenos orales como el tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa como anastrozol, exemestano y letrozol (Waks y Winer, 2019). El tamoxifeno es un pro-fármaco clásico que involucra la activación metabólica por acción de las enzimas de la familia citocromo P450 (CYP).

El tamoxifeno ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de cáncer de mama dependiente de hormonas porque es un modulador selectivo del receptor de estrógenos (ER) que inhibe competitivamente la unión del estrógeno al ER y es efectivo en mujeres tanto pre como posmenopáusicas. No obstante, se ha reportado la aparición de efectos colaterales bajo la administración de tamoxifeno como: enfermedades hepáticas, tromboembolias, sofocos e incremento del riesgo de cáncer uterino (Davies et al., 2011; Waks y Winer, 2019).

1.1.3 Nanovehículos para la entrega controlada de fármacos

Recientemente, un gran número de nanopartículas han sido sugeridas para una diversidad de usos biomédicos. Gracias al desarrollo en la nanomedicina, terapias innovadoras han sido propuestas para incrementar la eficiencia del tratamiento convencional contra el cáncer de mama (Chahuan, et al., 2020; Fu, et al., 2020; Tagde, et al., 2022). Las nanoformulaciones han demostrado ser sistemas altamente eficientes y seguros para aplicaciones clínicas en el cuerpo humano. El direccionamiento específico de nanopartículas son un campo emergente para la entrega controlada de fármacos con actividad antitumoral.

La entrega controlada de medicamentos antitumorales basados en nanopartículas incrementa la efectividad y reduce los efectos secundarios de los tratamientos actuales (Brigger, et al., 2012). Una gran diversidad de nanosistemas ha sido propuesta para aplicaciones biomédicas como nanopartículas poliméricas, a base de proteína, metálicas, orgánicas e inorgánicas (Ding, et al., 2018). Las cápsides virales o nanopartículas tipo virus (VLP) son un sistema seguro y cada vez más frecuentemente investigado para el tratamiento del cáncer.

1.1.4 Cápsides virales o nanopartículas tipo virus (VLP)

Las cápsides virales o VLPs son partículas que mimetizan la estructura de un virus natural (Ding et al., 2018). Son básicamente cápsides virales huecas, sin material genético, es decir, sin potencial infeccioso (Tapia Moreno, 2015). Presentan arquitecturas altamente ordenadas de dimensiones nanométricas que tienen la capacidad de autoensamblarse (Sánchez Sánchez, 2014). La cápside o VLP está constituida por proteínas estructurales que interactúan entre sí para formar subunidades proteicas llamadas capsómeros que se unen para conformar la cápside (Hernández Meza, 2017). Las VLPs más comunes tienen simetría

icosaédrica (cuasi-esférica) o helicoidal (Schoonen & Van Hest, 2014), algunas presentan polimorfismo estructural dependiendo de las condiciones de pH, fuerza iónica y concentración de iones divalentes en las que se encuentran (Sánchez Sánchez, 2014; Ruszkowski, et al. 2022).

Las VLPs tiene una gran capacidad para contener diferentes moléculas cargos, tales como ácidos nucleicos, proteínas y otras moléculas pequeñas como algunos fármacos. La capacidad de las VLPs para albergar gran diversidad de moléculas esta revolucionado el cargo, acarreo y liberación controlada de compuestos de interés en la nanomedicina (Ding, et al., 2018). La estructura de las VLPs puede ser aprovechada para contener moléculas en su interior hueco o ancladas a su superficie interna o externa (Douglas & Young, 2006). Las cápsides virales VLPs o jaulas de proteína, son un interesante nanosistema que ha sido propuesto como nanoacariador para la entrega controlada de agentes anticancerígenos específicamente a células tumorales (Koellhoffer & Steinmetz, 2022; Nkanga & Steinmetz, 2021).

La tecnología de las VLPs es ampliamente usada en las vacunas y recientemente las VLPs han sido propuestas como nanoplataformas en el acarreo de diferentes fármacos para su uso en terapias biomédicas (González-Davis, et al., 2023; Mejía-Méndez, et al., 2022; Nooraei, et al., 2021; Yu, et al., 2022). Las VLPs pueden derivar del virus nativo o ser obtenidas mediante tecnología recombinante. En el primer caso, el material genético es removido por desensamble del virus, para posteriormente obtener las proteínas que forman la cápside (Cadena et al., 2012). Después, bajo ciertas condiciones las proteínas son reensambladas alrededor de la molécula de interés y formar VLPs. Una de las características que hacen a las VLPs idóneas para su uso en la medicina es que han demostrado ser estables en fluidos biológicos. Además, por autoensamblaje de las VLPs se producen partículas de simetría y tamaño homogéneo (Douglas & Young, 2006).

Las VLPs se han propuesto para el envío y liberación controlada de moléculas cargo, además, por su carácter proteico, son biocompatibles, biodegradables y presentan baja toxicidad (Schoonen & Van Hest, 2014; Yan, et al., 2015). Más aun, la superficie de las VLPs puede ser modificada y funcionalizada con una diversidad de moléculas (ligandos) para ser dirigidas específicamente hacia un tipo de célula o tejido (Schoonen & Van Hest, 2014; Kraj, et al., 2021). Con lo cual las VLPs pueden revolucionar las terapias actuales. El principal mecanismo de entrega de moléculas de interés utilizando las VLPs en las células es el de endocitosis mediada por receptores. Durante este proceso, la célula engulle macromoléculas a través de la membrana plasmática, junto con el fluido extracelular y lo invagina en vesículas que circulan dentro de la célula. Las VLPs pueden liberarse de estas vesículas antes de que sean degradadas en lisosomas y como carecen de material genético, no hay riesgo de una infección viral (Sánchez-Sánchez, et al., 2015).

1.1.5 Bionanorreactores enzimáticos a base de VLPs

Cuando las VLPs contienen enzimas activas en su interior como molécula cargo, se le ha denominado nanorreactor o bionanorreactor enzimático (Comellas-Aragonès et al., 2007; González-Davis, et al., 2023). Incluso, se han descrito mejoras en las propiedades catalíticas de las enzimas encapsuladas en las VLPs (Jordan et al., 2016; Chakraborti, et al., 2020; Das et al., 2020). Las VLPs pueden albergar los sitios catalíticos activos y controlar el acceso de reactivos y productos, lo que representa, reacciones catalíticas mucho más estables (Jordan et al., 2016; Das et al., 2020). La estructura de la jaula proteica de las VLPs protege a la molécula catalítica de la degradación de la proteasa y disminuye el reconocimiento por parte del sistema inmune, lo que confiere un mejor rendimiento terapéutico (Schwarz, et al., 2017; Inoue, et al., 2008; O'Neil, et al., 2013). Además, la estructura porosa intrínseca de los bionanorreactores basados en VLP puede permitir que los sustratos y los productos fluyan a través del sistema semi-cerrado de la nanojaula proteica (Selivanovitch, et al., 2021; Gama, et al., 2021; Vervoort, et al., 2021). Anteriormente se han propuesto nanorreactores enzimáticos basados en VLP que contienen actividad de citocromo P450 para la activación de profármacos en la terapia contra el cáncer de mama (Sánchez-Sánchez, et al., 2015; Tapia-Moreno, et al., 2017; Chauhan, et al., 2018).

1.1.6 Actividad glucosa oxidasa

La enzima glucosa oxidasa (GOx por sus siglas en inglés) es una flavoproteína con actividad oxido-reductasa ampliamente estudiada y usada en la industria. La forma activa de la enzima GOx es un homodímero de 80 kDa por monómero cuyo peso molecular depende del grado de glicosilación (Zoldak, et al., 2004). Debido a modificaciones postraduccionales la enzima GOx puede estar glicosilada principalmente con manopiranosas y glucopiranosas; como consecuencia el peso molecular de la enzima es mayor (Zoldak, et al., 2004; Hecht, et al., 1993). La GOx cataliza eficientemente la oxidación de glucosa con oxígeno molecular para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y gluconolactona. La actividad catalítica de la enzima GOx está intrínsecamente relacionada a su unión no covalente con el cofactor flavín adenín dinucleótido (FAD) en cada monómero y es indispensable para la reacción oxido-reducción de la actividad GOx (Fu, et al., 2018).

En particular, la enzima GOx del hongo filamentoso *Aspergillus niger* (**Fig. 2**) es una enzima extracelular y ampliamente usada en la determinación de glucosa en la industria de la fermentación, fabricación de biosensores y además se han reportado propiedades antimicrobianas (Wong, et al., 2008; Mano, 2019).

La actividad enzimática GOx ha sido propuesta recientemente para aplicaciones en la nanomedicina contra el cáncer (Huo, et al., 2017; Zhang, et al., 2018; Feng, et al., 2018). Son y col. en 2009 reportaron la primera exploración de la actividad GOx en el tratamiento del cáncer (Son, et al., 2009, a & b).



Figura 2. Estructura tridimensional de la enzima glucosa oxidasa (GOx) de *Aspergillus niger*. Subunidad proteica o monomero (rosa), cofactor flavín adenín dinucleotido (FAD, amarillo), grupos glucopiranosos (verde). Archivo pdb 1Cf3 (Wohlfahrt, et al., 1999) visualizado en UCSF Chimera®.

La actividad catalítica de la GOx genera peróxido de hidrógeno continuamente y puede causar daño al material genético o DNA, y en consecuencia la muerte de las células tumorales (Son, et al., 2009, a). Además, la actividad catalítica de la GOx produce estrés oxidativo por la generación de peróxido, promoviendo un efecto citotóxico en el ambiente tumoral. Adicionalmente, la actividad GOx reduce la concentración disponible de glucosa y de oxígeno molecular, compuestos esenciales para el metabolismo celular, lo que ocasiona inanición celular e hipoxia en el ambiente tumoral (Fu, et al., 2018). Más aún, la GOx se puede combinar con otras enzimas, pro-fármacos o fotosensibilizadores, entre otros reactivos para generar terapias sinérgicas multimodales en el tratamiento del cáncer (Fu, et al., 2018; Fu, et al., 2019). Recientemente, diferentes sistemas basados en la actividad catalítica de la enzima GOx han sido

desarrollados para la terapia del cáncer, incluyendo vesículas mono y multimodales, nanopartículas poliméricas y magnéticas (Dinda, et al., 2018; Feng, et al., 2018; Chang, et al., 2017), entre otros.

1.1.7 Albúmina sérica humana

La albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés) (**Fig. 3**) es una proteína plasmática y funciona como transportador natural de un gran número de compuestos endógenos y exógenos en el torrente sanguíneo (Kragh-Hansen, 1981). Tiene una larga vida media de 19 días en circulación y es la proteína más abundante (60%) a una concentración de 40 mg/mL en el plasma sanguíneo y su peso molecular es de 67 kDa (Hoogenboezem & Duvall, 2018; Sleep, et. al, 2013; Carter & Ho, 1994). La albúmina sérica humana o HSA contiene 35 residuos cisteína, de los cuales 34 forman puentes disulfuro y solo cuenta con un grupo sulfidril libre localizado en la cisteína 34 (Cys 34) de la cadena polipeptídica (**Fig. 3**) (Nakashima, et al., 2018).

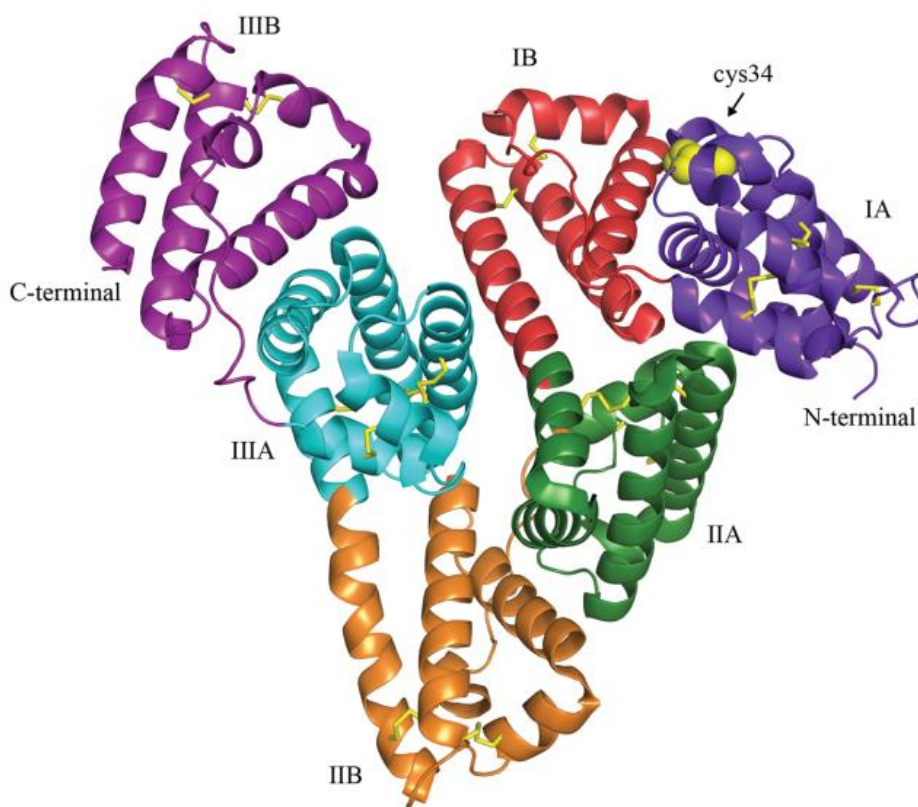


Figura 3. Estructura tridimensional de la albúmina sérica humana (HSA). La ilustración muestra la estructura terciaria de la HSA y los dominios son mostrados en diferentes colores. Las barras de color amarillo muestran la posición de los puentes disulfuro de cisteínas en la HSA y las esferas amarillas la posición de la cisteína 34 en el dominio IA. Imagen tomada de Larsen y col., archivo pdb 1E7E (Bhattacharya, et al., 2000).

La HSA realiza un proceso natural de transcitosis a través del endotelio vascular al espacio intersticial (Larsen, et. al 2016). Este proceso se atribuye a la unión de la HSA con el receptor gp60 (albodina) en la superficie de las células endoteliales (McIntosh, et. al, 2002). La unión gp60-HSA se asocia con la caveolina-1 (Cav-1) en la superficie de las células endoteliales y esto promueve la invaginación de la membrana celular seguido de la internalización de la HSA mediante la formación de vesículas o caveolas. A través de la célula, las caveolas con la HSA son transportadas y se fusionan con la membrana a basolateral para completar la transcitosis de la HSA al medio intersticial (McIntosh, et. al, 2002; Sleep, et. al, 2013). Dentro de la célula, la HSA se une con el receptor intracelular FcRn (Fc neonatal), quien se encarga de rescatar a la albúmina de la degradación, desviándola de la vía lisosomal que es altamente degradativa. Luego, el FcRn y la HSA se exocitan al espacio extracelular donde la HSA se libera a condiciones de pH fisiológico y a esto se le atribuye la notable larga vida media de la HSA en el torrente sanguíneo (Sleep, et. al 2013; Larsen, et. al 2016).

Además de la interacción con la gp60, la captación celular de la albúmina también se relaciona con la unión a SPARC (proteína ácida secretada rica en cisteína) (Schnitzer & Oh, 1992; Merlot, et al., 2014). Está confirmado que tanto gp60 como SPARC se sobreexpresan en varios tipos de células cancerosas que constituyen el tumor y endotelio tumoral, lo que promueve la acumulación de HSA en el tumor a diferencia de los tejidos normales (Zhou, et al., 2019; Desai, et al., 2009; Lin, et al., 2016). Estos dos mecanismos de transporte activo atraen a la HSA selectivamente al interior del tumor (Matsumura & Maeda, 1986; Chatterjee, et al., 2017). No obstante, también se reconoce un mecanismo de transporte pasivo de la HSA al medio tumoral. Esto se debe a que la HSA está a una mayor concentración en el torrente sanguíneo (40 mg/mL) en comparación con la concentración del medio intersticial ~14 mg/mL, lo que impulsa su transporte por difusión (Evans, 2002; Larsen, et. al, 2016).

La alta actividad angiogénica en el ambiente tumoral provoca la formación rápida de nuevos vasos sanguíneos en el tumor y como consecuencia, estos vasos sanguíneos presentan irregularidades como fenestraciones más grandes de lo normal en el endotelio (Matsumura & Maeda, 1986; Sleep, et. al, 2013; Spada, et al., 2021). Además, los tumores también tienen interrupciones en el sistema linfático. Se considera a estas irregularidades morfológicas en el sistema vascular y en el linfático como responsables de la permeación y acumulación preferencial de nanoestructuras y macromoléculas en el tumor, fenómeno conocido como efecto de retención y permeabilidad mejorada (EPR) (Matsumura & Maeda, 1986; Sleep, et. al, 2013; Hoogenboezem & Duvall, 2018). Se ha encontrado que la HSA tiene una alta capacidad de acumularse en células tumorales en proliferación como consecuencia del efecto EPR (Matsumura & Maeda, 1986; Sleep, et. al, 2013; Spada, et al., 2021).

1.2 Antecedentes

1.2.1 La glucosa oxidasa como agente antitumoral

El efecto antitumoral de la actividad GOx ha sido propuesto como monoterapia cuando el tratamiento depende exclusivamente de la actividad GOx, o terapia multimodal cuando el tratamiento con la enzima se combina con otros agentes antitumorales. En la monoterapia o terapia monomodal, el efecto se debe al agotamiento de la glucosa y el oxígeno molecular en el medio tumoral y la producción continua de peróxido de hidrógeno por la actividad GOx, actuando como terapia de inanición y de estrés oxidativo en células tumorales (Fu, et al., 2018; Fu, et al., 2019). En la terapia multimodal el efecto de la enzima se combina con otras terapias como la quimioterapia, terapia fotodinámica y terapia fototérmica, entre otras. Huo y col. en 2017 desarrollaron una monoterapia basada en la enzima GOx cargada dentro de una nanopartícula dendrítica mesoporosa hecha de sílice y cargada también con óxido ferroso a la cual denominaron GOD-Fe₃O₄@DMSN. Encontraron *in vitro* un efecto citotóxico dependiente de la concentración GOD-Fe₃O₄@DMSN en la línea tumoral 4T1 debido a la actividad de la enzima GOx. Además, observaron *in vivo* la eficiente reducción de tumores 4T1 injertados en ratones tratados con GOD-Fe₃O₄@DMSN vía intravenosa e intratumoral (Huo, et al., 2017). Zhao y col. en 2017 demostraron que la enzima GOx cargada en nanogeles del copolímero FBMA-co-OEGMA tiene un efecto antitumoral como terapia de inanición y estrés oxidativo en melanoma utilizando un modelo murino. Los nanogeles cargados con GOx (GNs), reportaron una alta actividad citotóxica en la línea C8161 de células de melanoma. Además, encontraron *in vivo* mediante un modelo murino que los nanogeles cargados con GOx tienen un efecto anti-melanoma dependiente de la dosis y su aplicación mejora significativamente la inhibición del tumor y la extensión de la tasa de supervivencia cuando son suministrados a una dosis de 100 mU de actividad GOx (Zhao, et al., 2017).

Zhang y col. describieron un sistema multimodal de terapia antitumoral combinando la actividad de la enzima GOx con el pro-fármaco antineoplásico benoxantrona. Ambos agentes fueron encapsulados en nanoacarreadores liposomales de manera independiente. La estrategia terapéutica se basa en la combinación sinérgica de la terapia por inanición de la actividad GOx y la activación del pro-fármaco benoxantrona a su forma terapéutica por las condiciones de hipoxia. Por una parte, el efecto citotóxico dependiente de la concentración de liposomas cargados con GOx fue demostrado *in vitro* en la línea celular 4T1 de tumor de mama murino; así como el efecto citotóxico de los liposomas cargados con benoxantrona en condiciones de hipoxia en la misma línea celular. Además, en un modelo murino observaron, *in vivo*,

un efecto sinérgico antitumoral de la terapia combinada de los liposomas cargados con GOx y con benoxantrona, respectivamente (Zhang, et al., 2018).

Feng y col. en 2018 desarrollaron un sistema de terapia multimodal antitumoral a base de la actividad glucosa oxidasa y potencializada con la terapia fototérmica activada con luz infrarroja cercana (NIC). El diseño de la preparación consistió en la conjugación de la enzima GOx con nanopartículas magnéticas de óxido ferroso modificadas con polipirrol como agente de terapia fototérmica. Los resultados *in vitro* mostraron que la conjugación denominada $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PPy}@GOD$ tiene un efecto citotóxico en la línea celular 4T1 de tumor de mama murino, sobre todo cuando los cultivos son irradiados con luz infrarroja de 808 y 1064 nm de longitud de onda, respectivamente. En un modelo murino mostraron que las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PPy}@GOD$ ejercen la supresión de tumores 4T1 implantados en ratones y este efecto altamente reforzado cuando las nanopartículas suministradas son localizadas *in situ* por imagenología y el tumor es irradiado con una longitud de onda de 808 y 1064 nm (Feng, et al., 2018).

1.2.2 La albúmina sérica humana para el direccionamiento selectivo

Las preparaciones terapéuticas conjugadas con albúmina sérica humana (HSA) muestran una alta eficiencia de captación celular y citotoxicidad *in vitro*, una alta vida media en circulación y acumulación en tumores mucho mayor que los compuestos terapéuticos libres de HSA (Zhou, et al., 2019; Chen, et al., 2014; Choi, et al., 2015). Mediante el método de hidratación de película delgada, Zhou y col. reportaron la conjugación de la proteína HSA con el compuesto antitumoral pirorrubicina (THP), al complejo resultante lo denominaron HSA-THP. Ellos demostraron que la conjugación del agente antitumoral THP con la proteína HSA mejora significativamente la captación celular y el efecto citotóxico *in vitro* en células tumorales de mama murino 4T1. Además, mostraron *in vivo*, en un modelo murino, que THP conjugado con la HSA exhibe una alta acumulación y penetración en el tumor vía gp60 y SPARC y tiene una larga vida media. También, la preparación a base de HSA mostró alta eficacia antimetástasis en ratones con tumores de células MDA-MB-231-Luc de tumor de mama humano (Zhou, et al., 2019).

Por otro lado, Chen y col. desarrollaron una nanoformulación multimodal a base de HSA, con el colorante IR825 y gadolinio como terapia fototérmica antimetastásica monitoreada por imagenología. Los autores encontraron por microscopia confocal de fluorescencia que la preparación, a la cual denominaron HSA-Gd-IR825, mostró *in vitro* una alta captación celular en la línea 4T1. Además, reportaron un alto efecto antimetastático de la preparación HSA-Gd-IR825 en ratones con tumores 4T1 secundarios inducidos y

después de la remoción del tumor principal, expuestos a radiación con láser de 808 nm (Chen, et al., 2014). Adicionalmente, Choi y col fabricaron nanopartículas inhalables a base de HSA conjugada con el agente antitumoral doxorubicina y la proteína apoptótica TRAIL para la terapia del cáncer de pulmón. Encontraron mediante un ensayo MTT un efecto citotóxico significativo y actividad apoptótica de la preparación denominada TRIAL/Dox HSA-NP en células de cáncer de pulmón H226 en comparación con el tratamiento control sin la HSA. Por microscopia confocal detectaron *in vitro* en la línea H226 mayor captación celular cuando la preparación es conjugada con la HSA. La eficacia antitumoral aumentó al suministrar la preparación vía aerosol en ratones con tumores de pulmón H226 inducidos, reduciendo los efectos de la metástasis (Choi, et al., 2015).

Basado en la capacidad de las cápsides del BMV para contener moléculas cargo en su interior hueco y la actividad catalítica de la GOx, en este proyecto se diseñó un bionanorreactor enzimático para la terapia dirigida contra el cáncer de mama, mediante el encapsulamiento de la GOx en las VLPs del bromovirus BMV. Además, se realizó la funcionalización de los bionanorreactores anclando la proteína HSA en su superficie externa para el direccionamiento hacia células tumorales de cáncer de mama. Posteriormente, las propiedades catalíticas, estructura y estabilidad de los bionanorreactores fueron caracterizadas. Finalmente, se evaluó el efecto de los bionanorreactores en líneas celulares de cáncer de mama.

1.3 Hipótesis

La enzima GOx encapsulada en las VLPS del BMV podrá ejercer un efecto citotóxico en células de cáncer de mama, y el recubrimiento de la VLP resultante, con la proteína HSA, mejorará dicho efecto citotóxico.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Diseñar y producir bionanorreactores enzimáticos basados en nanopartículas tipo virus (VLPs) del BMV. con actividad glucosa oxidasa y funcionalizados con HSA para la entrega dirigida y con actividad citotóxica en células tumorales de mama.

1.4.2 Objetivos específicos

Diseñar bionanorreactores basados en nanopartículas tipo virus (VLPs) del BMV que contengan como cargo la enzima glucosa oxidasa.

Funcionalizar la superficie externa de los bionanorreactores con la proteína albúmina sérica humana (HSA).

Caracterizar las propiedades catalíticas, diámetro hidrodinámico y morfología de los bionanorreactores producidos.

Estudiar *in vitro* el efecto citotóxico de los bionanorreactores en líneas celulares de cáncer de mama.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Materiales

La enzima comercial GOx tipo VII (*Aspergillus niger*), la proteína albúmina sérica humana (HSA), glucosa (dextrosa 99.5 %), peróxido de hidrógeno (30%), guayacol (99%), L-glutación reducido (98%), y solventes fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Las sales usadas para la preparación de soluciones amortiguadores fueron adquiridas en Fermont (Monterrey, MX) y Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). En el análisis por microscopia electrónica de transmisión se utilizaron rejillas de cobre (400-mesh), cubiertas con una capa de formvar/carbono (No. 01824, Ted-Pella, EUA). Todos los reactivos químicos empleados fueron del más alto grado de pureza disponible comercialmente. Las líneas celulares 4T1 y 293T fueron adquiridas en ATCC (EUA) y la línea MDA-MB 231/GPF en Cell Biolabs Inc. (Ref. AKR-201, San Diego, CA). La proteína de cápside (CP) del virus BMV empleada para los bionanorreactores tipo VLP se obtuvo a partir de la producción del virus nativo BMV en un invernadero (Cadena-Nava, et al., 2012).

2.2 Diseño de bionanorreactores BMV-GOx

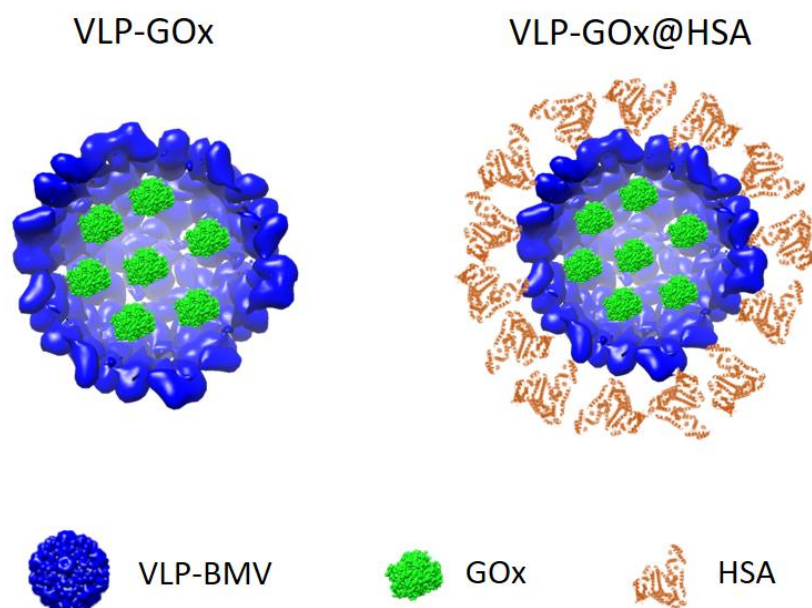


Figura 4. Esquema de la arquitectura de los bionanorreactores VLP-GOx y VLP-GOx@HSA.

El diseño de los bionanorreactores con actividad GOx se basó en las propiedades catalíticas de la enzima GOx, y la capacidad de autoensamblaje de la proteína CP del BMV. La arquitectura de los bionanorreactores construidos consistió en la encapsulación de la enzima GOx en una jaula proteica conformada por las proteínas de cápsides del BMV (**Fig. 4**). Además, las VLPs resultantes, a las cuales denominamos bionanorreactores VLP-GOx, fueron funcionalizadas en su superficie externa con la proteína HSA para el direccionamiento específico hacia células tumorales de cáncer de mama, denominados VLP-GOx@HSA. La encapsulación de la GOx estuvo mediada principalmente por interacciones electrostáticas entre la superficie de la enzima GOx y la región N-terminal de la proteína de la cápside del BMV. El anclaje de la proteína HSA sobre la superficie de los bionanorreactores fue realizado por medio de enlaces disulfuro entre la proteína HSA y la proteína de cápside del BMV.

2.3 Propiedades electrostáticas de GOx y la proteína CP

La complementariedad de cargas electrostáticas entre la enzima GOx y los residuos N-terminal de la proteína de cápside del BMV fue fundamental para la encapsulación de la enzima y la formación de los bionanorreactores VLP-GOx por autoensamblaje. Las propiedades electrostáticas de la enzima GOx y de las proteínas de cápside (CP) del BMV fueron estudiadas *in silico* para analizar la probabilidad del confinamiento. Primero, se descargaron los archivos .pdb de la VLP del BMV (ID: 3J7L) y de la enzima GOx (ID: 1CF3) desde el Protein Data Bank. Los archivos .pdb contienen las coordenadas tridimensionales de la estructura de las proteínas. Estos archivos fueron procesados con el software Maestro Schrödinger®. La distribución superficial de cargas electrostáticas en la estructura tridimensional de la enzima GOx y los capsómeros del BMV fue analizada con el método del potencial de Poisson-Boltzmann y representada mediante un mapa de colores.

Posteriormente, la carga eléctrica efectiva en solución de la enzima GOx y la proteína CP del BMV fueron estudiadas experimentalmente mediante una determinación del potencial Z a diferentes valores de pH 4 a 7 (100 mM fosfato de sodio, pH ajustado con HCl). El potencial Z fue obtenido mediante la técnica de dispersión de luz electroforética utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern®. El valor del potencial Z en función del pH fue directamente relacionado con la carga electrostática en solución de la enzima GOx, la proteína CP desensamblada y el virus BMV, respectivamente. Considerando, el comportamiento del potencial Z en función del pH y los estudios *in silico* se establecieron las condiciones óptimas para la reacción de autoensamblaje y la formación de los bionanorreactores VLP-GOx.

2.4 Producción de viriones BMV y aislamiento de la proteína CP

Las proteínas de cápside del BMV utilizadas para la producción de los bionanorreactores fueron obtenidas a partir de virus BMV amplificado en plantas de cebada mediante la infección con el virus nativo y de acuerdo con el protocolo descrito por Cadena-Nava y col. en 2012. Primeramente, plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) fueron crecidas en condiciones controladas en un invernadero y cuando las primeras hojas alcanzaron la longitud de 10-15 cm fueron infectadas con el virus. Para la infección se erosionó suavemente la superficie adaxial de la hoja e inmediatamente sobre la herida se depositaron 20 μ L a 0.2 mg/mL de virus BMV en solución amortiguadora de inoculación (fosfato de potasio 100 mM, pH 7, ajustado con HCl). Posteriormente, entre 10 a 15 días después de la inoculación con el virus, las hojas mostraron el patrón de infección que corresponde a la aparición de manchas amarillas o clorosis (**Fig. 5 A**). Las hojas infectadas fueron cosechadas (**Fig. 5 B**) y almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento.

Las hojas infectadas con el virus BMV fueron trituradas en una licuadora (Osterizer®) (**Fig. 5 C**) para la obtención de los viriones usando una solución amortiguadora de extracción de virus (acetato de sodio 0.5 M, acetato de magnesio 80 mM, pH 4.5 ajustado con ácido acético glacial). El macerado resultante de la trituración fue filtrado con tela de gasa y el líquido filtrado recuperado. A continuación, se realizó una extracción líquido-líquido combinando el líquido filtrado y cloroformo a una relación 1:1 v/v, en botellas de centrifuga de copolímero de polipropileno de 250 mL (**Fig. 5 D**). La combinación del filtrado y cloroformo fue mezclada por agitación (**Fig. 5 E**), y centrifugada en un rotor de ángulo fijo JA-14 (Beckman®) a 10,000 rpm, 40 min a 4°C. Después del tiempo de centrifugación, la mezcla en la botella separó en dos fases (**Fig. 5 F**), la superior correspondiente a la fase acuosa o extracto de viriones, y la inferior correspondiente a la fase de cloroformo con residuos de fibra y los pigmentos de la planta. La fase superior o extracto de viriones fue recuperado cuidadosamente y mantenido en agitación a 4°C por al menos 4 h para permitir la evaporación de residuos de cloroformo.

Los viriones BMV fueron completamente aislados y purificados a partir del extracto mediante un colchón de sacarosa y adicionalmente con un gradiente de sacarosa usando ultracentrifugación. Primeramente, para preparar el colchón de sacarosa (**Fig. 5-G**), el extracto fue depositado cuidadosamente sobre 5 mL de solución de sacarosa al 10% (acetato de sodio 50 mM, acetato de magnesio 8 mM, pH 4.5 ajustado con ácido acético) dentro de tubos de ultracentrifuga y centrifugado a 32,000 rpm (rotor SW-32Ti, Beckman®), 4°C por 2 h. Después de la centrifugación, en el fondo del tubo se formó un precipitado que corresponde a las partículas virales o viriones BMV el cual fue recuperado y resuspendido en solución amortiguadora

de suspensión de virus (acetato de sodio 50 mM, acetato de magnesio 8 mM, pH 4.5 ajustado con ácido acético).

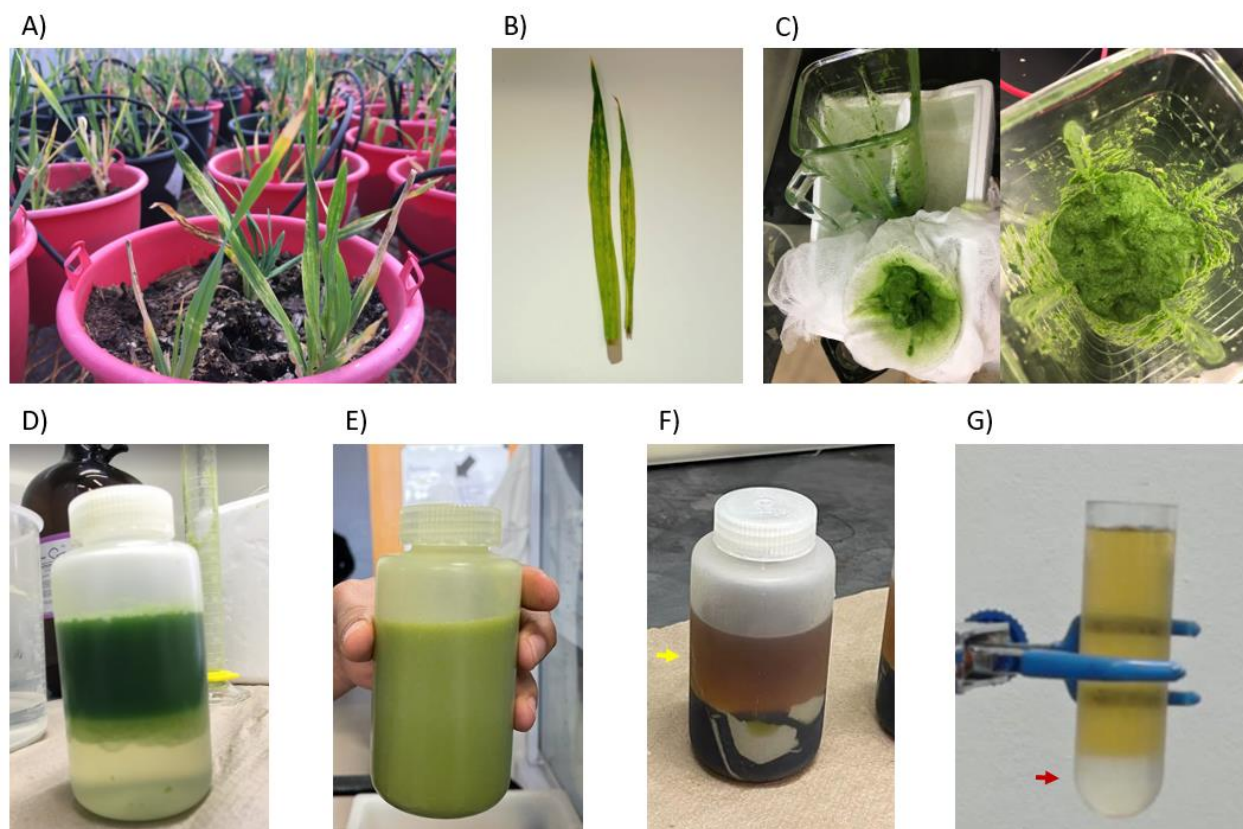


Figura 5. Extracción y purificación del virus BMV. A) y B) Hojas de cebada infectadas con el virus BMV. C) Macerado de las hojas infectadas. D y E) Mezcla del filtrado de virus y cloroformo antes y después de ser homogenizada, respectivamente. F) Separación de fases de la mezcla, superior: extracto de virus (flecha amarilla), inferior: cloroformo con residuos de fibra. G) Colchón de sacarosa (flecha roja).

Posteriormente, la suspensión de viriones BMV fue depositada sobre un gradiente de sacarosa de 10-40%. El gradiente de sacarosa fue previamente preparado mediante ciclos de congelación a -80°C y descongelación a 4°C de 20 mL de solución amortiguadora de virus al 25% sacarosa depositada en tubos de ultracentrífuga de 33 mL de policarbonato. Posteriormente, la suspensión de viriones BMV fue depositada sobre el gradiente de sacarosa formado y centrifugada a 30,000 rpm (rotor SW-32Ti), 4°C por 2 h. Al finalizar la centrifugación, los tubos con el gradiente fueron examinados en un cuarto oscuro incidiendo luz blanca desde el fondo de cada tubo, observándose una fase azul brillante en medio de la columna del volumen dentro del tubo de centrifuga (**Fig. 6**). Esta fase azul corresponde a los viriones y fue recuperada con una pipeta Pasteur de vidrio de punta larga y el volumen recuperado diluido a una relación 1:4 v/v. Finalmente, el volumen diluido fue centrifugado a 32,000 rpm, 4°C por 3 h para concentrar los viriones en un precipitado al fondo del tubo de centrifuga. Al término de la centrifugación, el sobrenadante

fue descartado y el precipitado obtenido que contenía los viriones fue resuspendido en solución amortiguadora de suspensión de virus y almacenados a -80°C a una concentración de 3 mg/mL y cuantificada mediante la absorbancia a 260 nm y el coeficiente de extinción molar del virus BMV ($36,400\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).



Figura 6. Gradiente de Sacarosa. En la imagen se aprecia la banda o fase azul (flecha blanca) correspondiente a la fase que contiene los viriones del BMV dentro del tubo de ultracentrífuga.

Los viriones BMV obtenidos fueron desensamblados para la purificación de la proteína de cápside (CP) necesaria para la síntesis de bionanorreactores tipo VLP. Primero, la suspensión que contenía los viriones fue dializada en membrana de corte de peso molecular 14,000 Da (Sigma®) contra solución amortiguadora de desensamblaje (cloruro de calcio 0.5 M, Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, ajustado con HCl) por 5 h. Después, la muestra dializada que contenía los viriones desensamblados fue centrifugada a 50,000 rpm (rotor 90Ti, Beckman®), 4°C por 4 h. Al finalizar el tiempo de centrifugación el sobrenadante que contenía la proteína

CP aislada del material genético fue recuperado desde la parte superior del volumen por fracciones de 0.5 mL. Se consideraron fracciones de CP con una pureza mayor a 1.58 estimado usando el cociente de las absorbancias a 280/260 nm. Las fracciones seleccionadas bajo el criterio de pureza establecido fueron dializadas en membrana de 14,000 Da contra solución amortiguadora de proteínas (cloruro de sodio 1 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7.2 ajustado con HCl) por 2 h. La concentración de proteína CP en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fue determinada utilizando el coeficiente de extinción molar de la CP ($24,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y la absorbancia a 280 nm de la muestra. Finalmente se almaceno la solución de proteína purificada CP a 4°C hasta su utilización.

2.5 Ensamble de bionanorreactores VLP-GOx

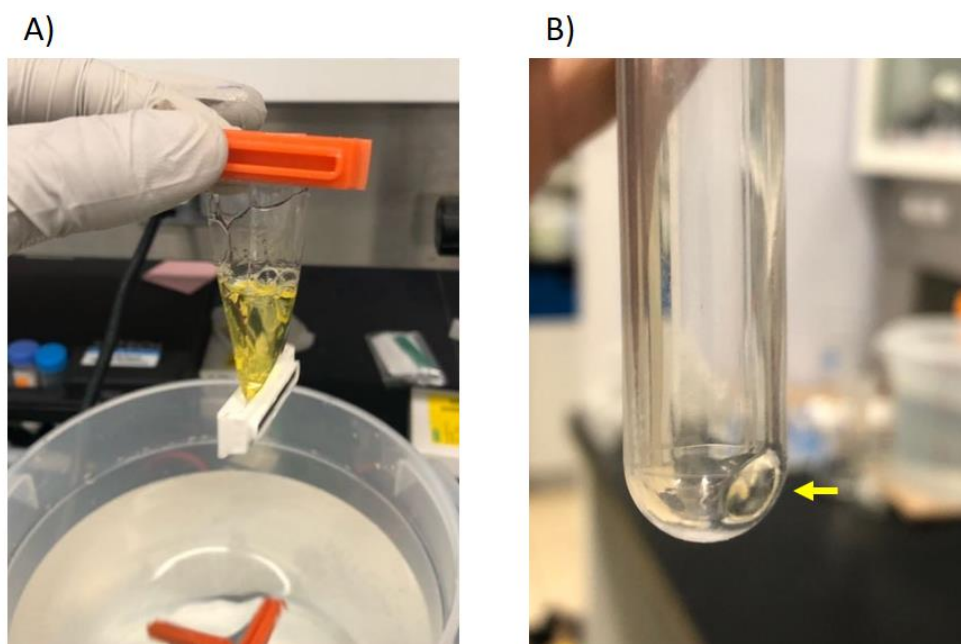


Figura 7. Ensamble de los bionanorreactores VLP-GOx. A) Diálisis en condiciones de autoensamblaje para la síntesis de bionanorreactores (enzima GOx más proteína de cápside del BMV dentro de la membrana de diálisis). B) Precipitado de bionanorreactores VLP-GOx (flecha amarilla) en el fondo del tubo de ultracentrífuga.

Los bionanorreactores con actividad GOx (VLP-GOx) fueron sintetizados por el método de autoensamblaje utilizando diálisis para el recambio de condiciones. Primero, la enzima GOx comercial fue disuelta previamente en solución amortiguadora de fosfatos (fosfato de sodio 50 mM, pH 7 ajustado con HCl). Después, la enzima GOx en disolución fue combinada con la proteína de cápside CP previamente purificada (**Fig. 7-A**) a diferentes relaciones molares (1:2, 1:3, 1:6, 1:23, GOx:CP mol:mol). Posteriormente, las

preparaciones fueron llevadas a condiciones de autoensamblaje de VLPs mediante diálisis en dos pasos. Primera diálisis (cloruro de sodio 50 mM, cloruro de potasio 10 mM, cloruro de magnesio 5 mM, tris-HCl 50 mM, pH 7.2 ajustado con HCl) a 4°C por 4 h. Segunda diálisis: solución amortiguadora de autoensamble (acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 0.75 M, acetato de magnesio 8 mM, pH 5.1 ajustado con ácido acético) a 4°C por 4 h.

Adicionalmente, se realizó el ensamble de cápsides o VLP del BMV sin actividad catalítica, llevando directamente la proteína CP a la segunda diálisis. Después de la diálisis en dos pasos las preparaciones fueron recuperadas y centrifugadas a 40,000 rpm (rotor 90Ti), 4°C por 2 h. Al finalizar la centrifugación se formó un precipitado en el fondo del tubo de ultracentrifuga que correspondía a los bionanorreactores (**Fig. 7-B**). El sobrenadante fue retirado del tubo con una micropipeta, tomando el volumen desde el fondo del tubo, tratando de no dañar ni resuspender el precipitado. Finalmente, después de retirar el sobrenadante, el precipitado que contenía los bionanorreactores fue resuspendido en solución amortiguadora de ensamble y la suspensión de bionanorreactores filtrada a través de membrana 0.2 µm (Verex, Phenomenex®).

Posterior al ensamble, los bionanorreactores VLP-GOx fueron purificados por cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (por su nombre en inglés: *High-Performance Liquid Chromatography*). La cromatografía fue realizada utilizando una columna de exclusión de tamaño molecular (TSKgel Column, Super SW2000, Supelco-Tosoh Bioscience, Bellefont, PA) para eliminar los residuos de enzima GOx libre no encapsulada en función del tiempo de retención. Primero, la suspensión filtrada de bionanorreactores fue inyectada en la columna montada en un equipo HPLC (Agilent 1100 series) y un método isocrático de elución con solución amortiguadora de fase móvil (acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 5.1 ajustado con ácido acético).

Los bionanorreactores fueron aislados por cromatografía de exclusión de tamaño molecular considerando las diferencias entre el tiempo de retención de las VLPs del BMV, la enzima GOx libre y la proteína de cápside CP desensamblada. Finalmente, tras la cromatografía la fracción que contenían los bionanorreactores VLP-GOx fue colectada y llevada a una concentración de trabajo empleando tubos de ultrafiltración con una membrana de corte de peso molecular de 30,000 Da (Merck Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units). La concentración de proteína total en las preparaciones de bionanorreactores purificados fue determinada utilizando el ensayo Bradford con el reactivo Bio-Rad Bradford Protein Assay (Hercules, CA) debido a que la composición de los bionanorreactores es completamente a base de proteína.

2.6 Funcionalización de la superficie de los bioanorretores VLP-GOx

La funcionalización de los bioanorretores con actividad GOx fue realizada recubriendo la superficie de las VLP-GOx con la proteína albúmina sérica humana o HSA (**Fig. 4**) para el direccionamiento específico a células tumorales de cáncer de mama. Los residuos cisteína de la HSA (**Fig. 3**) fueron utilizados para su anclaje en la superficie de la VLP a través de enlaces disulfuro entre las cisteínas de la HSA (Larsen, et. al, 2016; Chauhan, et al., 2020) y la cisteína 107 (Lucas, et al., 2002) de la proteína CP de la VLP del BMV (**Fig. 8-A y B**). Previamente, la HSA fue preparada mediante la reducción de sus residuos cisteína con base en el protocolo descrito por Chauhan y col. en 2020 para la formación de enlaces disulfuro. En breve, la HSA fue disuelta en solución acuosa a 50 mM de L-glutatión reducido para la reacción de reducción de los residuos cisteína. La solución resultante se mantuvo en agitación 2 h a temperatura ambiente. Después del tiempo de reacción, la preparación que contenía la HSA con los grupos cisteína reducidos fue dializada en agua desionizada por 2 h a temperatura ambiente para eliminar el agente reductor, este paso se repitió una vez más. Finalmente, la preparación la HSA con los grupos cisteína reducidos o “HSA reducida” fue recuperada y almacenada a 4°C.

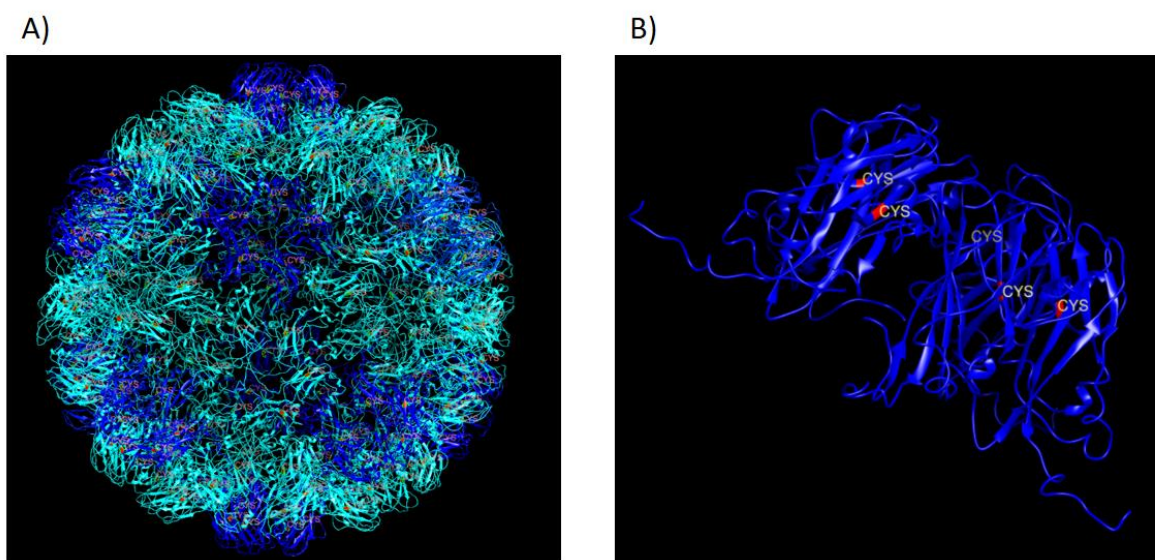


Figura 8. Estructura tridimensional de la VLP del BMV. A) Sitios cisteína (etiquetas rojas) en la superficie de la VLP. B) Capsómero del BMV con cisteína 107 (etiquetas rojas) por cada CP. Archivo.pdb 1js9 (Lucas, et al., 2002) visualizado en UCSF Chimera®.

La HSA reducida en sus residuos cisteína fue utilizada para el recubrimiento de la superficie externa de los bioanorretores. Primeramente, la reacción de funcionalización fue realizada mezclando los

bionanorreactores VLP-GOx (sintetizados a una relación molar 1:3 GOx:CP) con la proteína HSA reducida en una relación de masas de 1:8 p/p de VLP-GOx:HSA. Esta reacción se mantuvo en agitación a 4°C por al menos 12 h. Después del tiempo de reacción, la preparación fue centrifugada a 40,000 rpm, 4°C por 2 h para concentrar los bionanorreactores funcionalizados en un precipitado al fondo del tubo de centrifuga. Al finalizar el tiempo de centrifugación, el sobrenadante fue descartado y el precipitado que contenía los bionanorreactores funcionalizados fue resuspendido en solución amortiguadora de ensamble. La suspensión resultante fue filtrada a través de membrana 0.2 µm (Verex, Phenomenex®).

Finalmente, los bionanorreactores funcionalizados fueron purificados y aislados de la HSA libre por cromatografía de exclusión de tamaño molecular como se describe anteriormente para los bionanorreactores sin funcionalización, con base en la diferencia entre el tiempo de retención de los bionanorreactores y la HSA libre. Adicionalmente, siguiendo el mismo procedimiento para la funcionalización de la superficie de los bionanorreactores, se realizó la funcionalización de las VLPs sin actividad catalítica o VLP del BMV con la proteína HSA y la preparación resultante fue purificada de la misma forma por cromatografía de exclusión de tamaño molecular.

2.7 Caracterización de bionanorreactores

Los bionanorreactores con actividad GOx: VLP-GOx y VLP-GOx@HSA previamente aislados y purificados fueron caracterizados. La composición de los bionanorreactores es complemente a base de proteínas. Por lo tanto, la proporción de proteínas en cada preparación fue caracterizada mediante electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico o SDS-PAGE (por sus siglas en inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Las muestras de los bionanorreactores con actividad GOx y los respectivos controles fueron mezclados con β-mercaptoetanol, respectivamente, y calentados por 10 min a 90°C en una placa térmica. Posteriormente, las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida preparado al 15% en la fase de separación. La electroforesis fue corrida a 120 mV por 20 min y posteriormente a 180 mV por 1h. Al término, el gel de poliacrilamida fue lavado dos veces con agua desionizada, después teñido con solución InstanBlue® por 5 h, y en seguida lavado dos veces más con agua desionizada. Finalmente, la imagen del gel de poliacrilamida resultante fue capturada con un fotodocumentador (Modelo IBright FL 1000) y la imagen obtenida fue procesada con el software ImageJ® para un análisis densidad de pixeles de las bandas teñidas en el gel, y de esta manera estimar la proporción de cada una de las proteínas que conforman los bionanorreactores.

La morfología de los bionanorreactores producidos fue caracterizada por microscopia electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés). Primero se colocó 6 μL de bionanorreactores VLP-GOx o VLP-GOX@HSA a 0.75 mg/mL sobre el lado brillante de una rejilla de cobre. Después de dos minutos, el volumen de la muestra sobre la rejilla de TEM fue retirado con un papel absorbente por el borde de la rejilla. Posteriormente, sobre la rejilla se depositaron 6 μL de acetato de uranilo al 1% en solución acuosa y después de dos minutos la solución de acetato de uranilo se retiró con un papel absorbente por el borde de la rejilla. A continuación, se evaporó el residuo de humedad colocando la rejilla 10 min bajo una lámpara de luz amarilla. Finalmente, la preparación de bionanorreactores sobre la rejilla de TEM fue analizada en un equipo TEM (JEOL JEM-2010) operado a 100 kV. Por otra parte, se caracterizó el tamaño de los bionanorreactores en solución mediante la determinación del diámetro hidrodinámico estimado con la técnica de dispersión dinámica de luz o DLS (por sus siglas en inglés: *Dynamic light scattering*) utilizando un equipo Zetasizer (Nano-ZS, Malvern®).

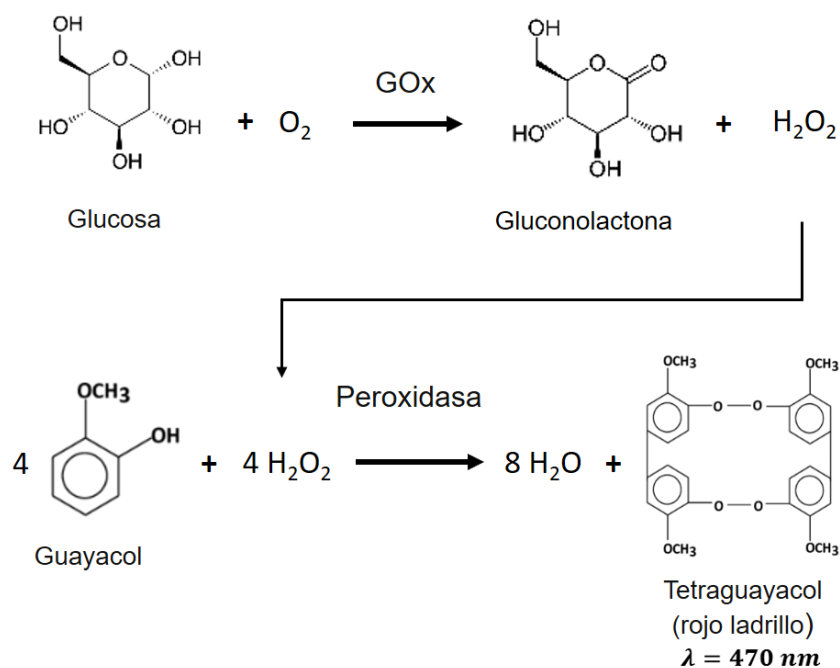


Figura 9. Reacción de actividad GOx acoplada a la enzima peroxidasa.

La actividad catalítica de los bionanorreactores VLP-GOx o VLP-GOX@HSA fue caracterizada mediante un ensayo de actividad enzimática GOx acoplada a una reacción colorimétrica con peroxidasa (**Fig. 9**). En esta reacción acoplada, primero: la actividad GOx transforma glucosa y oxígeno molecular en peróxido de hidrógeno y gluconolactona, y segundo: la actividad de la peroxidasa utiliza el peróxido de hidrógeno

generado por la actividad GOx, y guayacol para producir tetraguayacol y agua. El tetraguayacol es de coloración rojo ladrillo y tiene un pico de absorbancia a 470 nm, el incremento de este compuesto en la reacción acoplada puede monitorearse mediante espectrofotometría.

La reacción acoplada fue preparada en solución amortiguadora de actividad GOx (acetato de sodio 50 mM, pH 5.1 ajustado con ácido acético) con un coctel de 20 mM de guayacol, 30U de peroxidasa, a diferentes concentraciones de glucosa (0,25, 50, 100 y 150 mM). Una vez preparado el coctel de reacción se agregó en una celda de 1 mL para espectrofotómetro el volumen correspondiente y la muestra de bionanorreactores bien mezclados, e inmediatamente se monitoreó el incremento de la absorbancia a 470 nm por 5 min con un espectrofotómetro (NanoDrop, Thermo Scientific).

El cambio de la absorbancia por min en la reacción acoplada fue registrado, y con la ecuación de Beer-Lambert y un análisis estequiométrico, se calculó indirectamente la tasa de transformación de glucosa. El coeficiente de extinción molar del tetraguayacol ($26,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) fue utilizado para calcular la tasa de transformación por min en la reacción acoplada. La tasa de transformación a una determinada concentración de glucosa por gramos de proteína total fue definida aquí como actividad específica GOx. De acuerdo a la actividad específica GOx en función de la concentración de glucosa se realizó una regresión no lineal de Michaelis-Menten para determinar los parámetros o constantes catalíticas de los bionanorreactores VLP-GOx y VLP-GOx@HSA. Finalmente, las constantes catalíticas de los bionanorreactores se compararon entre sí y con la enzima GOx libre en solución.

2.8 Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

El efecto citotóxico de los bionanorreactores con actividad GOx fue estudiado *in vitro* con dos líneas celulares: 4T1 como modelo de tumor de mama murino, y 293T (células de riñón embrionario humano) como modelo de células sanas. El ensayo de citotoxicidad fue realizado utilizando el reactivo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). El reactivo MTT es empleado para determinar directamente la actividad metabólica celular. En los cultivos, las enzimas de las células viables tienen la capacidad de reducir el reactivo MTT en su forma insoluble formazán que posee un color purpura. Previo a los ensayos *in vitro* los bionanorreactores fueron esterilizados por filtración con membrana de $0.22 \mu\text{m}$ para los ensayos biológicos. Posteriormente, ambas líneas celulares fueron expuestas a diferentes concentraciones de bionanorreactores.

Primero, en placas para cultivo celular de 96 pozos se sembraron 4,000 y 10,000 células/pozo de la línea 4T1 (con medio RPMI) y 293T (con medio DMEM), respectivamente, e inmediatamente las placas de cultivo fueron incubadas a 37 °C y con atmosfera de CO₂ al 5%. A las 24 h de la siembra, las células fueron expuestas por 24 h a diferentes concentraciones (0.58 – 100 µg/mL) de bionanorreactores con actividad GOx o VLPs no catalíticas como control, respectivamente. Finalmente, a las 48 h del inicio del cultivo, se estimó la citotoxicidad de los diferentes tratamientos mediante un ensayo MTT (TOX-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Al término del ensayo MTT se midió en cada pozo de cultivo la absorbancia a 570 nm con un equipo Multiskan GO (Thermo Scientific). La absorbancia resultante del grupo control negativo (células incubadas únicamente con medio de cultivo) fue establecida como el 100% de sobrevivencia. Los grupos experimentales fueron comparados con el control negativo para estimar la tasa de sobrevivencia después de la exposición ante los bionanorreactores.

2.9 Estudio de microscopia de fluorescencia

El efecto de los bionanorreactores fue estudiado *in vitro* a nivel celular por microscopia de fluorescencia con la línea celular MDA-MB231/GPF de tumor de mama humano. Esta línea en particular tiene acoplada en la actina a la proteína verde fluorescente GFP (por sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*) mediante una modificación genética. Por lo tanto, la morfología de las células puede apreciarse por fluorescencia de color verde del citoesqueleto a través de microscopía de fluorescencia. Primero, el cultivo se comenzó sembrando 50,000 células MDA-MB-231/GPF en cajas Petri de 3 cm de diámetro para cultivo celular con medio DMEM suplementado al 10% de suero fetal bovino (Biowest, Francia) y 1% de antibiótico/antimicótico (GIBCO®) e incubando por 24 h a 37°C y una atmosfera al 5% de CO₂. Posteriormente, las células fueron lavadas con solución amortiguadora de fosfatos salino o PBS (por sus siglas en inglés *phosphate buffered saline*). A continuación, el PBS fue retirado y se agregaron 100 µg/mL de bionanorreactores VLP-GOx@HSA en medio DMEM e inmediatamente el cultivo fue incubado a 37°C, en atmosfera de CO₂ al 5% por 4 h.

El cultivo de células de las células MDA-MB-231/GPF expuestas a los bionanorreactores fue monitoreado en tiempo real con un microscopio de fluorescencia LS720 Microscope Lumascope (Etaluma Inc., San Diego, CA) acoplado dentro de una incubadora. Cada dos min a partir del inicio del cultivo se capturaron imágenes en contraste de fases y de luz verde fluorescente (rango del filtro verde fluorescente de 502-561 nm bajo la excitación con luz azul de 473-491 nm). Se fijaron 3 coordenadas distintas en el cultivo donde se localizaban las células estudiadas y estas coordenadas fueron seguidas durante todo el tiempo del

cultivo. Finalmente, las imágenes obtenidas fueron utilizadas para realizar un video con la técnica de cámara rápida mediante el empalme de la imagen en contraste de fases e imagen con su correspondiente en luz verde fluorescente de cada instante capturado.

2.10 Análisis estadístico

Finalmente, un análisis estadístico fue realizado con los resultados obtenidos por triplicado. El software Prism GraphPad® 8.0 fue utilizado para comparar las diferencias entre los tratamientos. Se consideró el análisis de varianzas (ANOVA) de dos vías y las pruebas post hoc Sidak o Tukey según correspondiera. Las diferencias aceptadas como significativas tuvieron un valor de $P < 0.001$ y se representan en las figuras con el símbolo *.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Complementariedad de cargas electrostáticas

La complementariedad de cargas electrostáticas entre la superficie de la enzima GOx y la superficie interna de las VLPs del BMV fue confirmada mediante los estudios *in silico* de la distribución superficial de cargas electrostáticas y el potencial Z. Con el software Maestro Schrödinger® y mediante un mapa de colores (**Fig. 10**) se logró visualizar una mayor distribución de cargas electrostáticas negativas sobre la superficie de la enzima GOx, diferente a la superficie de los capsómeros de las VLPs del BMV (pentámeros y hexámeros) donde aprecia una mayor distribución de cargas positivas en la superficie interna en la VLP. Esta distribución de cargas positivas hacia el interior de la VLP en los capsómeros corresponde con la posición de los residuos N-terminal de la proteína CP. Por otra parte, el lado exterior de los capsómeros en la VLP evidenció una distribución de cargas electrostáticas más heterogénea.

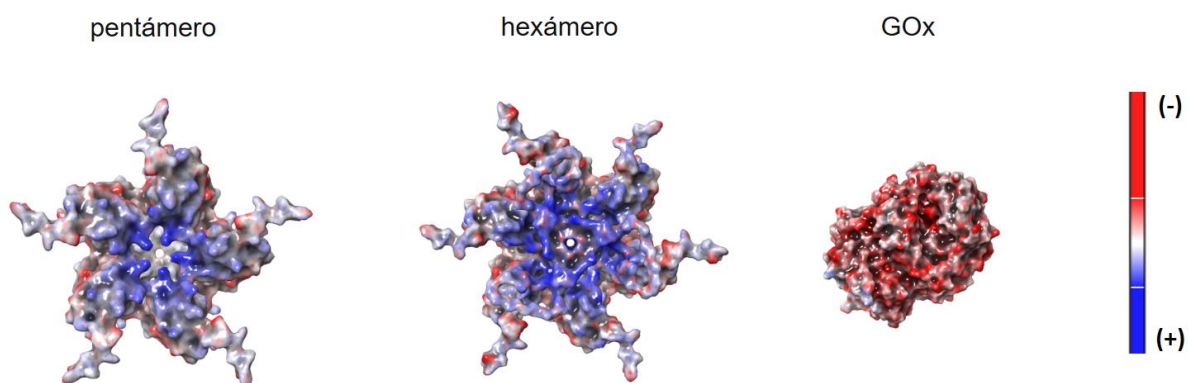


Figura 10. Representación de la distribución de cargas electrostáticas en la superficie interna de los capsómeros de la VLP del BMV (pentámero y hexámero) y la enzima GOx mediante un mapa de colores en la estructura tridimensional. Escala de color: rojo (cargas negativas) y azul (cargas positivas). Archivos pbd analizados con el software Maestro Schrödinger®.

Además de los resultados *in silico*, la carga efectiva de la enzima GOx en solución bajo condiciones de autoensamblaje fue confirmado por el perfil de potencial Z en función del pH (**Fig. 11**). Los resultados mostraron que el punto isoeléctrico de la enzima GOx se encuentra alrededor del pH 4.6, arriba de este valor de pH la enzima tiene carga eléctrica efectiva negativa (**Fig. 11-A**) Por otra parte, el punto isoeléctrico de la proteína de cápside CP fue estimado alrededor de pH 6.1, a bajo de este valor de pH la proteína tiene

un comportamiento positivo (**Fig. 11-B**) Por lo tanto, la reacción de ensamblaje se ajustó a pH 5.1, valor donde la enzima GOx mantiene un valor negativo y la CP un valor positivo, necesarios para la complementariedad de cargas electrostáticas y la formación de las VLPs BMV con actividad catalítica GOx por autoensamblaje.

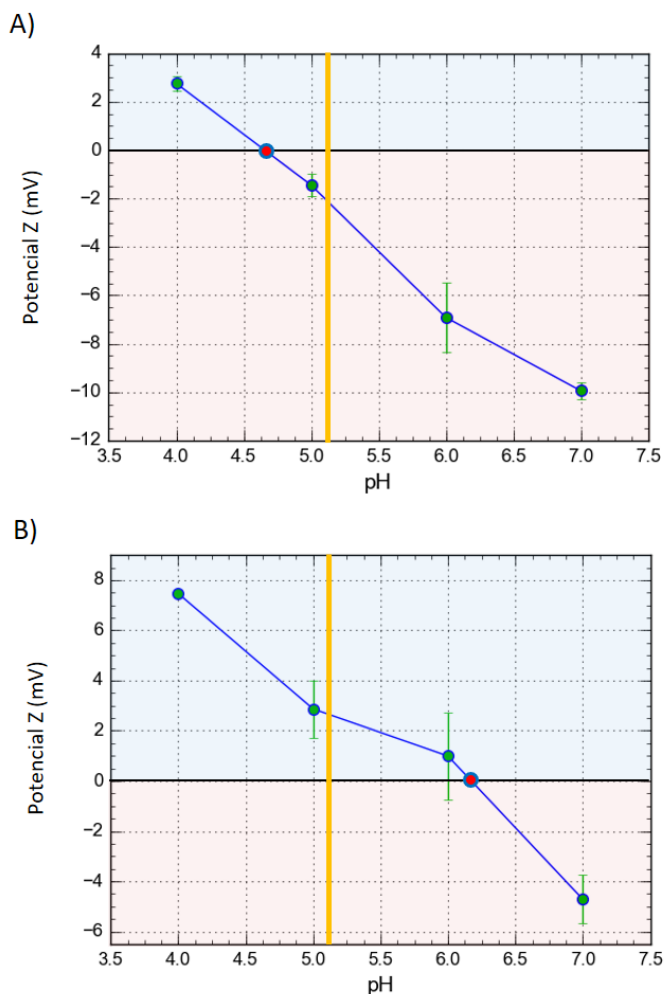


Figura 11. Perfil de potencial Z de A) la enzima GOx y B) la proteína CP desensamblada. Datos experimentales (puntos verdes). Punto isoeléctrico estimado (punto rojo). Barra amarilla en pH 5.1 (condiciones de autoensamblaje).

3.2 Ensamble de bionanorreactores con actividad GOx

Los bionanorreactores tipo VLP con actividad enzimática GOx o VLP-GOx fueron exitosamente sintetizados por el método de autoensamblaje del BMV, modulando las condiciones de pH y fuerza iónica (**Fig. 12**). El encapsulamiento de la enzima GOx en las VLPs fue optimizado realizando la síntesis de bionanorreactores a diferentes relaciones molares entre la enzima GOx y la proteína CP en la mezcla de autoensamblaje. Las

cuatro relaciones molares probadas en la síntesis de bionanorreactores produjeron partículas tipo VLP catalíticamente activas y los bionanorreactores resultantes fueron comparados con base en su actividad específica (U/g) (**Tabla 1**). La actividad específica fue calculada considerando la cantidad de micromoles de sustrato transformado por minuto por gramo de proteína total en la preparación. La relación molar 1:3 GOx:CP mostró mayor actividad específica en comparación con los bionanorreactores preparados con las otras relaciones molares probadas, registrando $1,316 \pm 18$ U/g (unidades de actividad catalítica por gramo de proteína total en la preparación). Por esta razón, la relación 1:3 fue seleccionada para producir bionanorreactores funcionalizados.

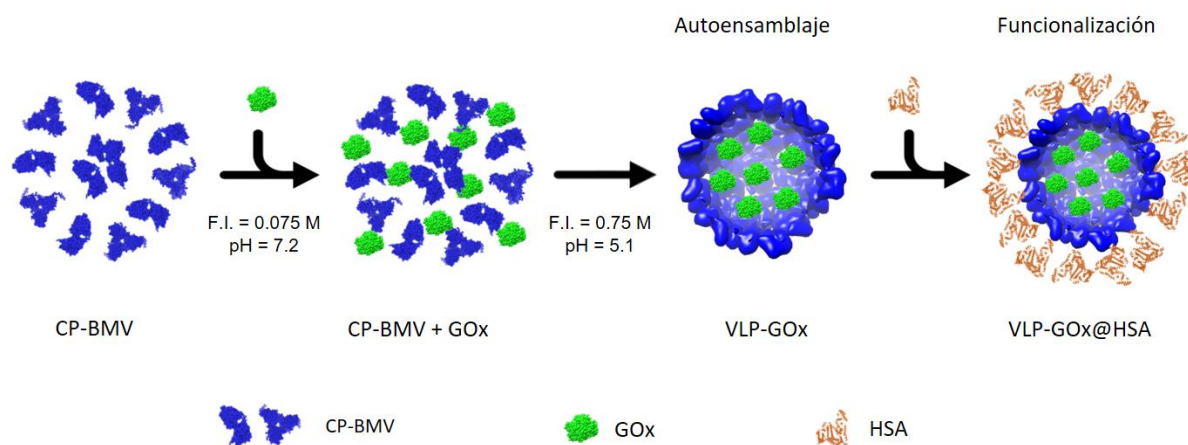


Figura 12. Ensamble y funcionalización de bionanorreactores tipo VLP del BMV con actividad GOx.

3.3 Purificación de los bionanorreactores

Todos los bionanorreactores con actividad GOx fueron purificados exitosamente por cromatografía de exclusión de tamaño molecular previo a todas las caracterizaciones (**Fig. 13**). La cromatografía de exclusión molecular resultó ser un método eficiente para la separación de bionanorreactores de la enzima no encapsulada considerando las diferencias en el tiempo de retención. Los tiempos de retención de las partículas tipo VLP, la enzima GOx y la proteína CP fueron de 5.7, 7.5 y 8.4 min, respectivamente (**Fig. 13 A**). Todos los bionanorreactores preparados a diferente relación molar fueron aislados exitosamente de la enzima GOx no encapsulada recuperando el volumen de la fracción 5.3-6.2 min con absorbancia máxima en 5.7 min (**Fig. 13 B**). En el caso de los bionanorreactores funcionalizados el aislamiento fue realizado recuperando de la cromatografía la fracción con pico en 5.7 min de la misma manera que los nanorreactores sin funcionalizar, pero en esta ocasión para separar la HSA no conjugada. Por otra parte,

las nanopartículas control hechas a base de cápsides sin moléculas GOx cargo denominadas VLP y VLP@HSA fueron purificadas de manera similar mediante cromatografía de exclusión molecular.

Tabla 1. Diámetro hidrodinámico determinado por dispersión dinámica de luz y constantes catalíticas de los bionanorreactores sintetizados a diferente relación molar. Las cinéticas catalíticas fueron calculadas mediante una regresión no lineal de Michaelis-Menten usando el software CurveExpert Pro®. Los valores de la V_{max} fueron estimados con base en la proteína total de la preparación.

Preparación	Diámetro hidrodinámico (nm)	Índice de polidispersidad	V_{max}^a (U/g proteína)	K_M^a (mM)
GOx libre	12.2 ± 4.1	0.325	237,985 ± 13,920	27.8 ± 3.1
Proteína de cápside (CP)	6.8 ± 1.2	0.246	--	--
BMV nativo	27.6 ± 6.7	0.067	--	--
GOx:CP relación molar		Bionanorreactores VLP-GOx		
1:2	25.8 ± 8.5	0.163	507 ± 27	47.7 ± 13.0
1:3	28.8 ± 7.9	0.135	1,316 ± 18	34.6 ± 1.9
1:6	33.4 ± 14.2	0.324	872 ± 95	40.0 ± 4.4
1:23	26.1 ± 8.9	0.172	137 ± 28	49.0 ± 4.6
1:3 VLP-GOx@HSA	50.6 ± 29.7	0.303	106 ± 9	70.4 ± 11.2

^a Promedio aritmético y desviación estándar de al menos 3 cinéticas independientes.

3.4 Funcionalización

Los bionanorreactores VLP-GOx fueron exitosamente funcionalizados con la proteína HSA (**Fig. 12**). La funcionalización de las VLP-GOx con la HSA fue posible mediante la formación de enlaces disulfuro. La proteína HSA previamente reducida en sus residuos cisteína fue anclada a la superficie externa de los bionanorreactores VLP-GOx por medio de enlaces disulfuro entre las cistinas de la HSA y la cisteína 107 de la proteína de cápside CP del BMV. Los bionanorreactores funcionalizados fueron purificados por cromatografía de exclusión de tamaño molecular de acuerdo con el tiempo de retención, recuperando el volumen de la fracción 5.3-6.2 min durante la cromatografía. La funcionalización con HSA de los bionanorreactores fue considerado porque esta proteína muestra afinidad para enlazarse a receptores de membrana en la superficie de la mayoría de las células, pero esta interacción es mayor en células tumorales y es útil para el direccionamiento activo y reconocimiento de formulaciones a base albúmina (Zhou, et al., 2019; Desai, et al., 2009; Lin, et al., 2016).

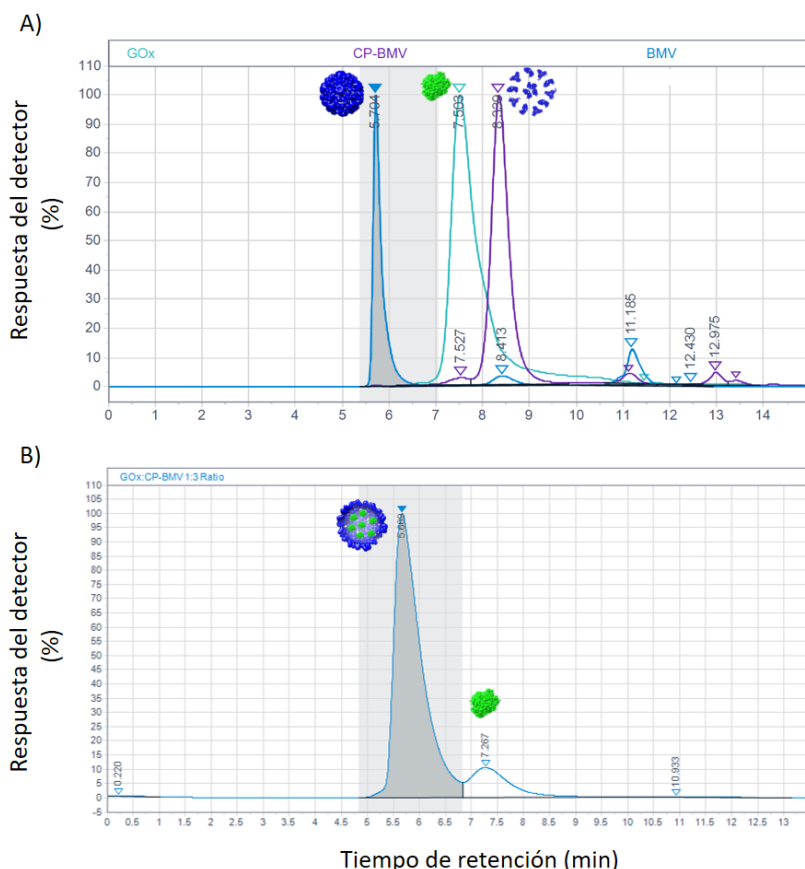


Figura 13. Purificación de bionanorreactores tipo VLP por cromatografía de exclusión de tamaño molecular. A) Cromatogramas sobrelapados donde se aprecian las diferencias en el tiempo de retención de las nanopartículas del BMV (azul), la enzima GOx (verde), y la proteína CP (púrpura), respectivamente. B) Cromatograma correspondiente al tiempo de retención de los bionanorreactores VLP-GOx (1:3 relación molar).

3.5 Diámetro hidrodinámico de los bionanorreactores

El tamaño en solución o diámetro hidrodinámico de los bionanorreactores fue caracterizado por la técnica de dispersión dinámica de luz. Todos los bionanorreactores con actividad GOx sintetizados a diferente relación molar mostraron un diámetro hidrodinámico muy cercano al del virus nativo 27.6 ± 6.7 nm (**Tabla 1**). No se encontraron diferencias significativas entre el diámetro hidrodinámico de los bionanorreactores producidos y el virus nativo BMV. Por el contrario, los bionanorreactores funcionalizados VLP-GOx@HSA mostraron un diámetro hidrodinámico de 50.6 ± 29.7 nm mayor en comparación con los bionanorreactores sin funcionalizar (**Tabla 1**). Como era de esperarse el diámetro hidrodinámico de los bionanorreactores funcionalizados fue mayor debido al anclaje de la HSA en la superficie del bionanorreactor, y además tuvo una desviación estándar significativa debido a la conjugación química azarosa de la HSA sobre la superficie de la VLP, lo que sugiere un número variable de moléculas HSA ancladas por cada cápside.

3.6 Composición molecular de los bionanorreactores

La encapsulación de la enzima GOx en las VLPs del BMV y el recubrimiento con HSA del bionanorreactor fueron confirmados por SDS-PAGE (**Fig. 14**). El número de moléculas GOx (dímeros activos, 160,000 Da) por cada VLP de BMV (180 monómeros de la proteína CP, 20,385 Da) fue estimado con base en densitometría de intensidad de bandas en el gel desnaturalizante en el de poliacrilamida usando el software ImageJ®. De acuerdo con la intensidad de pixeles de las bandas, la preparación de bionanorreactores sin funcionalizar, tuvo una proporción en proteína CP de 96.4% y de enzima GOx 3.6% (**Tabla 2**).

Considerando la proporción de intensidad de pixeles en las bandas del gel de poliacrilamida se estimó una molécula de GOx por cada VLP en promedio. Por otra parte, la preparación de bionanorreactores funcionalizados contuvo 22.8% de CP, 0.9% de GOx y 76.3% de la proteína total del bionanorreactor, considerando esta proporción se estimaron 70.4 moléculas de HSA por cápside. Este contenido en HSA en los bionanorreactores funcionalizados VLP-GOx@HSA corresponde con el incremento del diámetro hidrodinámico de 50.6 nm, confirmando la funcionalización.

3.7 Actividad catalítica de los bionanorreactores

La enzima GOx confinada dentro de la VLP del BMV retuvo la actividad catalítica y la actividad se ajustó a una cinética enzimática de Michaelis-Menten. Las constantes catalíticas: velocidad máxima ($V_{\max}$), constante de velocidad (k_{cat}) y constante de Michaelis-Menten (K_M), correspondientes a los bionanorreactores VLP-GOx y VLP-GOx@HSA fueron estimadas considerando solamente la cantidad de enzima GOx en cada preparación (**Tabla 2**).

La $V_{\max}$ de los bionanorreactores sin funcionalizar VLP-GOx fue de 36,500 U/g, considerando la cantidad en gramos de enzima GOx en la preparación y representa el 15.3% de la velocidad máxima de la enzima GOx libre 237,985 U/g. Por otra parte, la $V_{\max}$ de los bionanorreactores funcionalizados VLP-GOx@HSA fue de 11,780 U/g, que representa solo el 4.9% de la actividad catalítica de la enzima GOx libre. Considerando la concentración molar de la enzima GOx en las preparaciones de bionanorreactores y el peso molecular del dímero catalíticamente activo GOx, la tasa de transformación o k_{cat} obtenida con la regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten fue de 634 s^{-1} para la enzima libre GOx, mientras que los bionanorreactores VLP-GOx y VLP-GOx@HSA mostraron valores inferiores 90 s^{-1} y 34 s^{-1} , respectivamente.

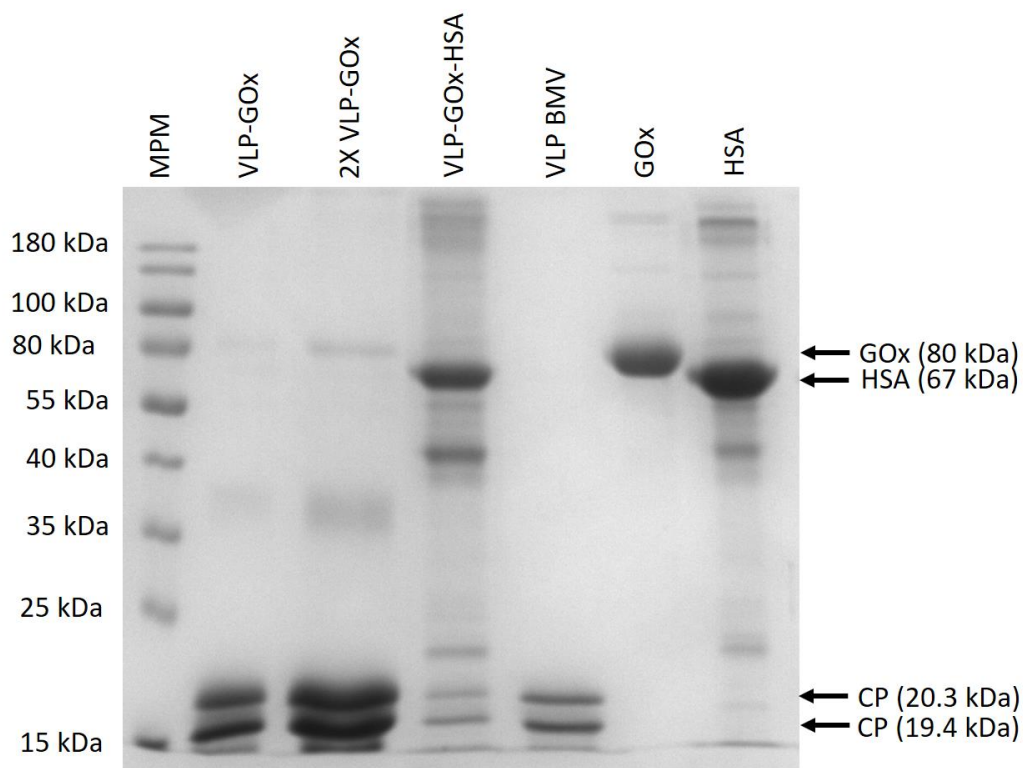


Figura 14. Composición en proteína de los bionanorreactores con actividad GOx por SDS-PAGE. Carril 1: estándar de peso molecular. Carril 2: bionanorreactores VLP-GOx. Carril 3: bionanorreactores VLP-GOx a una doble concentración (2X VLP-GOx). Carril 4: Bionanorreactores funcionalizados con la HSA (VLP-GOx@HSA). Carril 5: VLPs del BMV. Carril 6 GOx. Carril 7: HSA.

Tabla 2. Composición molecular de los bionanorreactores enzimáticos. Proporción de la enzima GOx, la proteína CP y HSA con base a la composición de proteína y al número de moles en cada preparación de bionanorreactores, respectivamente. Estos valores fueron usados para estimar el número de GOx por cada VLP y los parámetros catalíticos de la cinética enzimática con base al contenido en gramos de GOx.

Preparación	Composición con base a la proteína ^a (%)	Composición con base al número de moles ^b (%)	Moléculas GOx por cápside ^c	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)
GOx libre	GOx = 100	GOx = 100	--	634	27.8
VLP-GOx	CP = 96.4 GOx = 3.6	CP = 98.82 GOx = 1.18	0.85	90	34.6
VLP-GOx-HAS	CP = 22.8 GOx = 0.9 HSA = 76.3	CP = 49.43 GOx = 0.59 HSA = 49.98	0.90	34	70.4

^a Porcentaje de proteína a partir de densitometría de bandas del gel de electroforesis SDS-PAGE (**Fig. 14**). ^b Estimación realizada usando los siguientes pesos moleculares: CP 20,385 Da, dímero activo GOx 160,000 Da y HSA 67,000 Da. ^c Se consideraron cápsides del BMV con número de triangulación T=3 compuesta por 180 monómeros de CP.

3.8 Morfología de los bionanorreactores

La morfología o posible estructura geométrica de los bionanorreactores tipo VLP y con actividad GOx sin funcionalizar y funcionalizados fue caracterizada por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (**Fig. 15**). Las micrografías obtenidas por TEM revelan una estructura cuasi-esférica de los bionanorreactores no funcionalizados VLP-GOx con una simetría similar a la del virus nativo BMV (**Fig. 15-A y B**) y con un diámetro de 28 nm en promedio. Por otra parte, los bionanorreactores funcionalizados VLP-GOx@HSA muestran una ornamentación sobre la superficie exterior que corresponde a las moléculas de HSA ancladas en la superficie de las VLPs (**Fig. 15-C y D**).

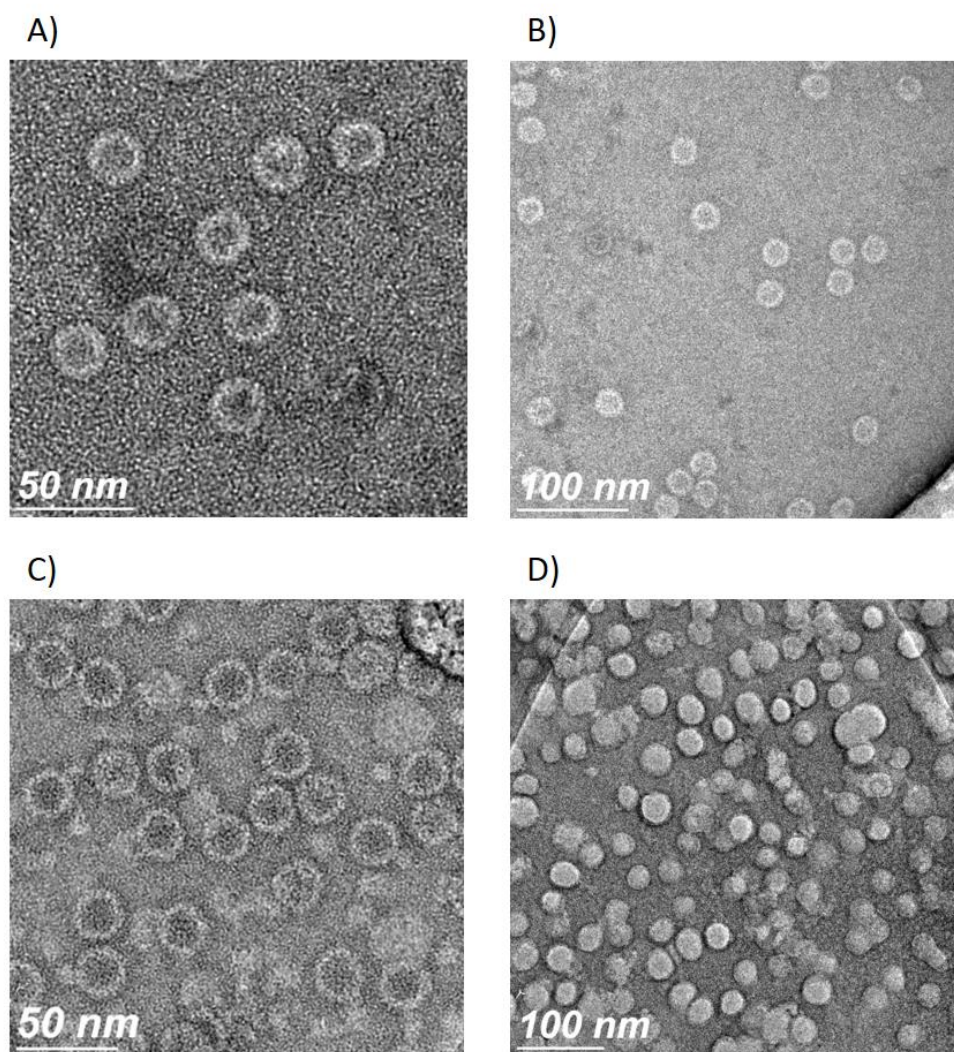


Figura 15. Morfología o estructura geométrica de los bionanorreactores GOx. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de trasmisión. A) y B) bionanorreactores sin funcionalización VLP-GOx. C) y D) Bionanorreactores funcionalizados VLP-GOx@HSA.

3.9 Efecto citotóxico *in vitro* de los bionanorreactores

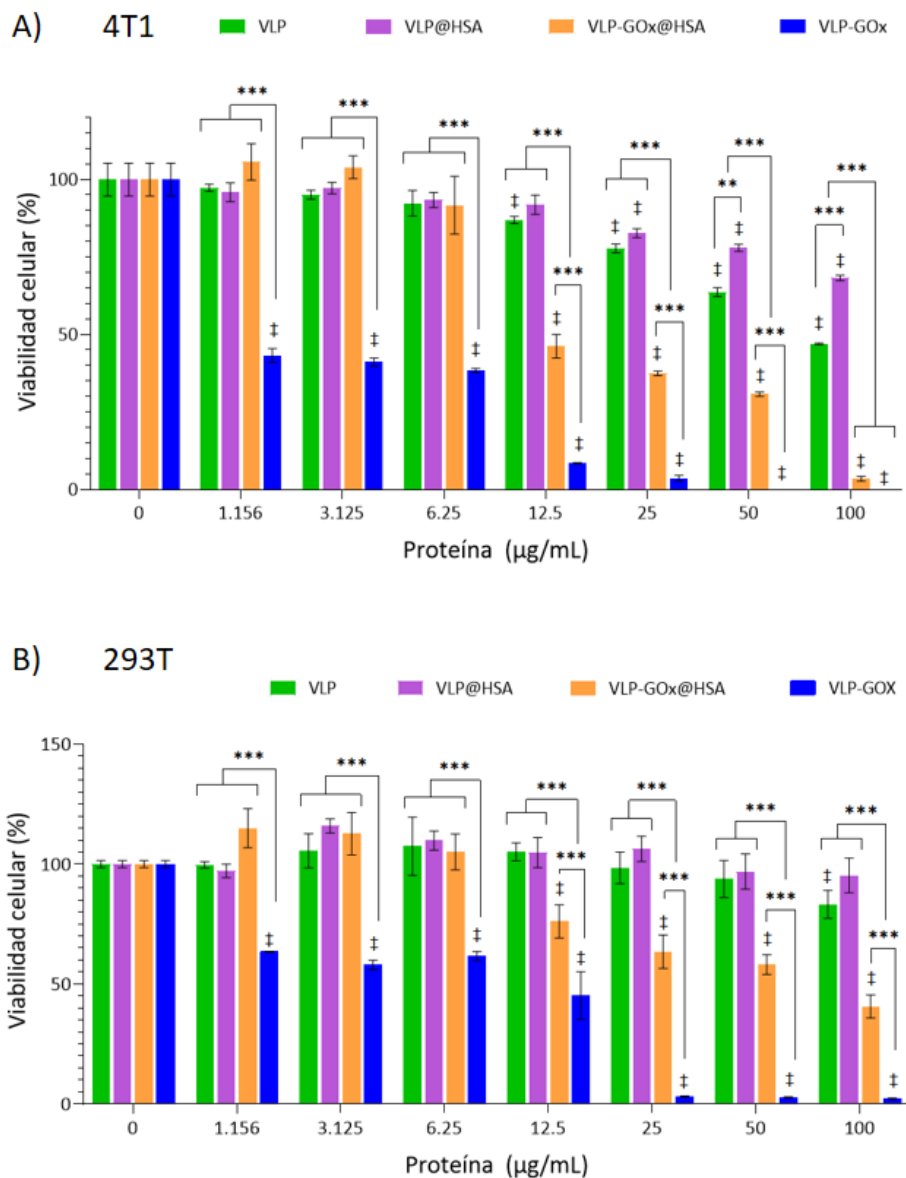


Figura 16. Actividad citotóxica *in vitro* de los bionanorreactores (VLP-GOx y VLP-GOx@HSA) y preparaciones con VLP sin actividad catalítica (VLPs y VLP@HSA) sobre A) la línea celular 4T1 de tumor de mama murino y B) la línea 293T de riñón embrionario humano, determinada por la tasa de viabilidad celular. Análisis estadístico ANOVA de dos vías ($p < 0.001$). ***Diferencias significativas entre las preparaciones a la misma concentración (proteína total) en el cultivo. ‡ Diferencias significativas con respecto al control sin tratamiento (0 µg/mL). Prueba de comparación múltiple de Tukey.

Como se esperaba, los bionanorreactores enzimáticos con actividad GOx (VLP-GOx y VLP-GOx@HSA) producidos mostraron actividad citotóxica en los cultivos de células tumorales de cáncer de mama murino 4T1. La citotoxicidad fue inversamente relacionada con la tasa de viabilidad celular en los cultivos tratados

y la viabilidad determinada por la actividad metabólica de las células para transformar el reactivo MTT mediante un ensayo colorimétrico.

Los bionanorreactores VLP-GOx sin funcionalización mostraron un efecto citotóxico significativo en las células 4T1 a partir de bajas concentraciones 1.156 μg de proteína total VLP-GOx por mL de cultivo, reduciendo la tasa de viabilidad a menos del 50 % y llevándola a 0% a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$ (**Fig. 16-A**). En el caso de los bionanorreactores funcionalizados VLP-GOx@HSA la actividad citotóxica se encontró a partir de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ reduciendo la viabilidad a menos de 50%. Sin embargo, no se encontró pérdida total de la viabilidad en las todas concentraciones probadas con los bionanorreactores funcionalizados. El efecto citotóxico en función de la proteína total de los bionanorreactores fue comparado con el control sin tratamiento (0 $\mu\text{g/mL}$).

Como experimento control fue probado el efecto citotóxico de una preparación con VLPs del BMV sin la molécula GOx como cargo, así como VLPs sin la enzima GOx pero funcionalizadas con la proteína HSA (VLP@HSA). Interesantemente, tanto las VLPs como las VLP@HSA funcionalizadas, ejercen un efecto citotóxico significativo a altas concentraciones en células tumorales 4T1, arriba de 25 $\mu\text{g/mL}$ (**Fig. 16-A**); comparado también con el control sin tratamiento (0 $\mu\text{g/mL}$). Adicionalmente, a altas concentraciones: 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, se observa un mayor efecto citotóxico de las VLP no catalíticas sin funcionalización en comparación con las VLPs funcionalizadas. Por otra parte, no se encontró efecto citotóxico en las preparaciones de VLPs no catalíticas sobre la línea celular 293T (**Fig. 16-B**) empleada como modelo de células sanas, excepto en el tratamiento a la mayor concentración ensayada 100 $\mu\text{g/mL}$ VLP, donde se observa un ligero efecto citotóxico. No obstante, los bionanorreactores también ejercen un efecto citotóxico significativo en línea celular de riñón fetal humano 293T en el caso de las VLP-GOx a partir de bajas concentraciones 1.156 $\mu\text{g/mL}$, y en las VLP-GOx@HSA a partir de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ (**Fig. 16-B**). No se observa pérdida total de la viabilidad en ninguna de las concentraciones de bionanorreactores probadas, tanto de las VLP-GOx como de VLP-GOx@HSA.

Comparando la tasa de viabilidad celular de la línea 4T1 y 293T expuestas a la misma concentración de bionanorreactores, se distingue claramente que el efecto citotóxico es significativamente más acentuado en la línea celular 4T1 en comparación con la línea celular 293T (**Fig. 17**). En el caso de los bionanorreactores VLP-GOx la diferencia significativa se observa en el rango de 1.156 a 12.5 $\mu\text{g/mL}$ y en el caso de las VLP-GOx@HSA entre 12.5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. La actividad citotóxica fue dependiente de la concentración de los bionanorreactores VLP-GOx o de la preparación de VLPs sin actividad catalítica (VLP y VLP@HSA) suministrada en los cultivos celulares.

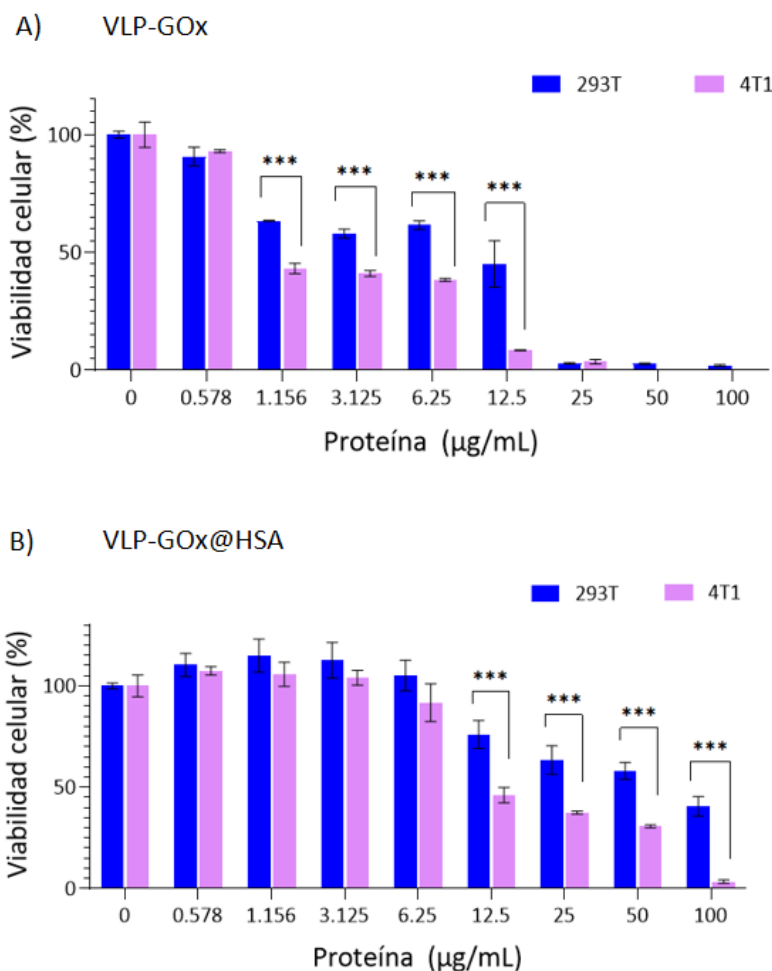


Figura 17. Actividad citotóxica *in vitro* de los bionanorreactores VLP-GOx determinada mediante la tasa de viabilidad celular. Cultivos con línea 4T1 de tumor de mama murino (barras rosas) y línea 293T de riñón embrionario humano (barras azules) expuestos a diferentes concentraciones de bionanorreactores VLP-GOx. Análisis estadístico ANOVA de dos vías ($p < 0.001$). ***Diferencias significativas en la viabilidad a la misma concentración en el cultivo de cada línea celular. Prueba de comparación múltiple de Sidak.

Ambos bionanorreactores con actividad GOx funcionalizados (VLP-GOx@HSA) y sin funcionalizar (VLP-GOx) mostraron un efecto citotóxico *in vitro* en las células tumorales 4T1. El efecto de los bionanorreactores en la viabilidad celular de la línea 4T1 fue expresado en función de la cantidad de proteína GOx suministrada a los cultivos (**Fig. 18-A**) y en función de la actividad enzimática GOx (**Fig. 18-B**). Estas dos formas de expresar la concentración del tratamiento son debidas a que existen diferencias significativas en la composición de proteínas entre la preparación de VLP-GOx y VLP-GOx@HSA como se muestra en la (**Tabla 2**). Si bien, el contenido de la enzima GOx por cada VLP es similar en ambos casos, la cantidad de actividad específica enzimática del bionanorreactor cambia cuando esta funcionalizado o recubierto por la proteína HSA (**Tabla 1**).

En las células tumorales de mama 4T1 la concentración de inhibición media (CI_{50}) de las VLP-GOx fue de 0.04 μg de GOx/mL de cultivo de cultivo celular, mientras que para las VLP-GOx@HSA fue de 0.1 μg GOx/mL y no se detectó actividad metabólica a 1 μg GOx/mL para ambas preparaciones (**Fig. 18-B**). La CI_{50} en las células 4T1 de los bionanorreactores en función de la actividad enzimática fue de 1 mU de actividad GOx por mL de cultivo celular y no se encontró actividad metabólica alrededor de 10 mU/mL en ambas preparaciones, VLP-GOx y VLP-GOx@HSA (**Fig. 18-B**). Comparando la CI_{50} de los bionanorreactores, funcionalizados y sin funcionalizar, en los cultivos de la línea tumoral 4T1 no se observan ventajas significativas en el incremento de la entrega de actividad citotóxica tras la funcionalización de los bionanorreactores VLP-GOx con la HSA.

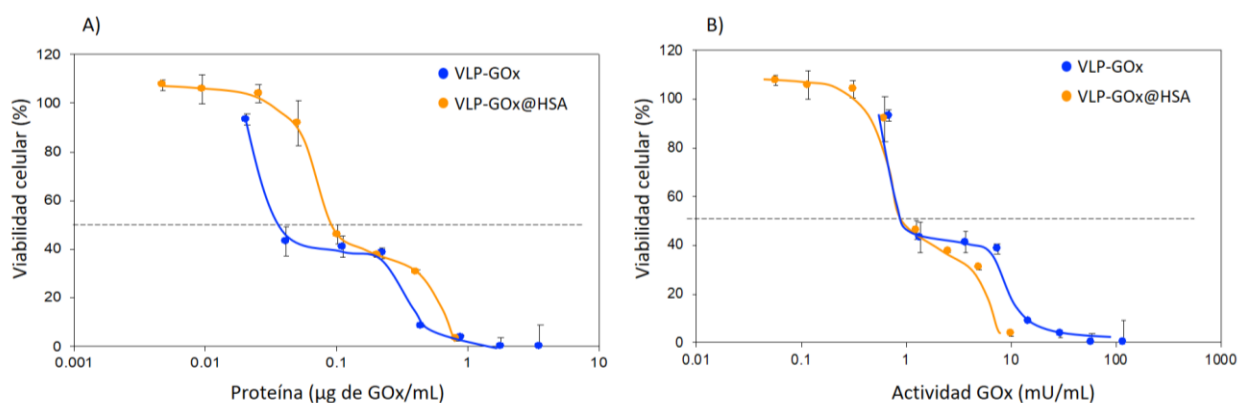


Figura 18. Viabilidad celular de la línea 4T1 de mama murino expuesta ante los bionanorreactores con actividad GOx. Porcentaje de viabilidad celular de la línea 4T1 expuesta ante los bionanorreactores en función de A) la concentración de proteína GOx y B) las unidades de actividad enzimática GOx por cada mililitro de medio de cultivo.

La actividad citotóxica de los bionanorreactores en las células de epitelio de riñón fetal humano 293T fue analizada (**Fig. 19**) de igual manera expresando la viabilidad celular en función de la concentración de proteína GOx (**Fig. 19-A**) y en función de la actividad enzimática del bionanorreactor (**Fig. 19-B**). La IC_{50} de los bionanorreactores VLP-GOx fue de 0.45 μg de GOx/mL de cultivo celular, y no se encontró actividad metabólica a 1 μg de GOx/mL. En el caso de los bionanorreactores funcionalizados VLP-GOx@HSA la CI_{50} encontrada fue alrededor de 0.79 μg de GOx/mL (**Fig. 19-A**).

La viabilidad celular de los cultivos de la línea 293T expresada en función de la actividad GOx muestra que la concentración de inhibición media CI_{50} de los bionanorreactores VLP-GOx es alcanzada suministrando 15 mU de actividad GOx/mL de cultivo celular, y a partir de 30 mU/mL no se observa actividad metabólica o viabilidad celular (**Fig. 19-B**). Por otra parte, los bionanorreactores VLP-GOx@HSA mostraron una CI_{50} a los 8 mU/mL de actividad GOx suministrada en los cultivos de la línea 293T. Finalmente, la CI_{50} en función

de la actividad enzimática de los bionanorreactores VLP-GOx fue menor en las células tumorales 4T1 de 1 mU/mL en comparación con la línea 293T de 15 mU/mL lo que señala un mayor efecto citotóxico de los bionanorreactores VLP-GOx en células tumorales. Sin embargo, comparando la CI_{50} en función de la concentración de proteína GOx y de la actividad enzimática, en ambas líneas celulares no se observan ventajas de la funcionalización de los bionanorreactores sobre el efecto citotóxico.

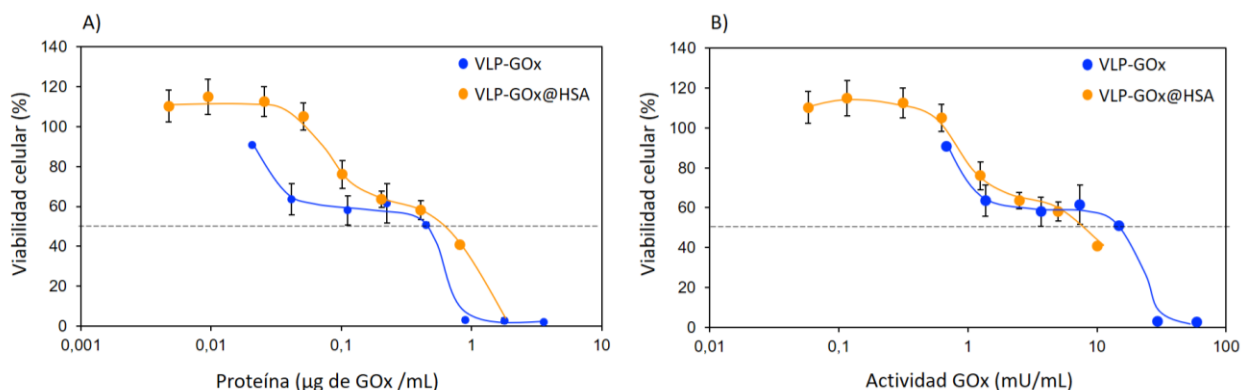


Figura 19. Viabilidad celular de los cultivos de la línea 293T expuestos ante los bionanorreactores con actividad GOx en función de A) la concentración de proteína GOx y B) las unidades de actividad enzimática GOx por mL de cultivo.

3.10 Efecto citológico de los bionanorreactores

El efecto de los bionanorreactores VLP-GOx a nivel citológico fue estudiado en la línea celular MDA-MB-231/GFP por microscopia de fluorescencia y de contraste de fases. Esta línea celular expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP) y fue monitoreada bajo microscopio con filtro de luz verde, capturando imágenes cada dos minutos durante cuatro horas. Las imágenes fueron empalmadas como se muestra en la (Fig. 20) para realizar una mejor comparación de los cambios a nivel celular. Después de una hora de comenzar la exposición ante los bionanorreactores la morfología de las células comenzó a cambiar drásticamente, probablemente debido al estrés oxidativo inducido por la actividad GOx de los bionanorreactores.

Después de dos horas, se observaron protuberancias plasmáticas desde dentro de la célula, lo que sugiere una alta producción de oxígeno a partir de la descomposición del peróxido de hidrógeno por parte de la actividad intrínseca catalasa de la célula. También se observa que la fluorescencia comienza a disminuir con el paso del tiempo. Al cabo de tres horas la fluorescencia de las células siguió disminuyendo y la producción de protuberancias celulares continuo en aumento. Finalmente, a las cuatro horas, el daño a

nivel citológico es claro, y las protuberancias comienzan a romperse y se observan fugas de material del citosol, y la fluorescencia en verde se extinguió por completo, indicando la muerte de la célula.

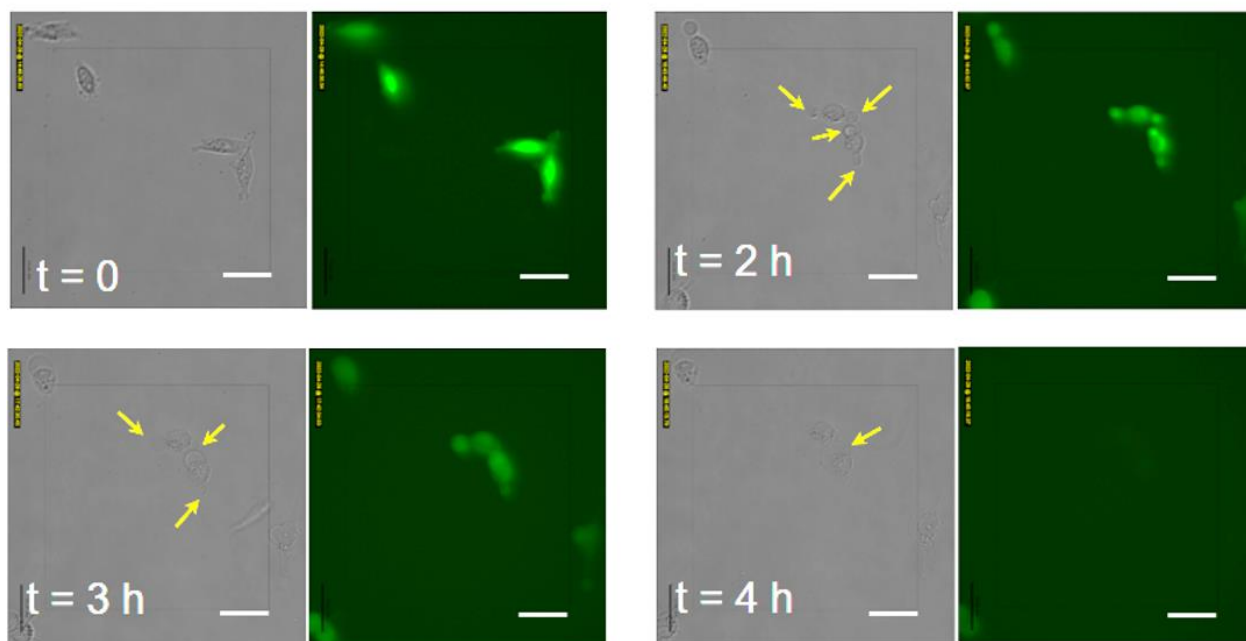


Figura 20. Efecto *in vitro* a nivel celular de los bionanorreactores sobre la línea de tumor de mama humano triple negativo MDA-MB-231/ la cual expresa constitutivamente la proteína GFP. Micrografías obtenidas por contraste de fases y microcopia de fluorescencia con filtro de luz verde. Todas las micrografías mostradas corresponden con las mismas coordenadas en el cultivo, pero cada renglón corresponde a un mismo instante.

Capítulo 4. Discusión

El cáncer de mama es una histopatología altamente frecuente que continúa afectando a mujeres de todo el mundo (Arnold, et al., 2022; Azamjah, et al., 2019). Lamentablemente las cifras de este padecimiento van en un aumento (Arnold, et al., 2022). Recientemente, en el campo de la nanomedicina el uso de nanopartículas inteligentes está ganando terreno (Fu, et al., 2020; Tagde, et al., 2022; Brigger, et al., 2012), mientras que la terapia convencional contra el cáncer de mama sigue enfrentando el desafío de ser más eficiente y reducir los efectos secundarios (Corben, 2013; Hassanpour & Dehghani, 2017). Los bionanorreactores de nanopartículas tipo virus del BMV con actividad catalítica GOx o VLP-GOx demostraron ejercer exitosamente un efecto citotóxico sobre células tumorales de mama murino 4T1, y muestran un alto potencial para aplicaciones en el tratamiento contra el cáncer de mama para combatir las estadísticas actuales a nivel mundial.

Ambos sistemas de bionanorreactores VLP-GOx y VLP-GOx@HSA tuvieron un efecto citotóxico en los cultivos de la línea celular 4T1. La actividad citotóxica de los bionanorreactores fue encontrada tanto en células tumorales 4T1 como en la línea celular 293T utilizadas como modelo de células sanas. El efecto citotóxico de ambos bionanorreactores se debe a la actividad glucosa oxidasa en cada preparación. Por otra parte, la funcionalización del bionanorreactor VLP-GOx con la HSA no mostró mejoras en la actividad citotóxica. Sin embargo, el efecto citotóxico de los bionanorreactores fue más acentuado en la línea 4T1 (**Fig. 17**) en comparación con la línea 293T. Pese a que el contenido de la enzima GOx por cada VLP es prácticamente el mismo, tanto en los bionanorreactores sin funcionalización como en los funcionalizados, la actividad específica o V_{max} del bionanorreactor disminuye en un orden de magnitud cuando está funcionalizado con la proteína HSA.

La pérdida de afinidad por el sustrato del bionanorreactor funcionalizado se refleja en el incremento de la K_M . Es importante considerar que los cultivos celulares fueron enriquecidos con suero fetal bovino el cual contiene albúmina que es muy similar molecularmente a la HSA. Por lo tanto, la albúmina del suero bovino puede competir por los receptores celulares de albúmina en las células 4T1 opacando el efecto preferencial de la funcionalización con HSA de los bionanorreactores. Es pertinente en un futuro realizar un experimento de citotoxicidad similar, pero esta vez prescindiendo del uso de suero fetal bovino en los cultivos celulares bajo condiciones adecuadas. No obstante, también es importante considerar que en el plasma sanguíneo existe una alta concentración de HSA, y finalmente, pensando en una aplicación biomédica para su uso en el cuerpo humano, los bionanorreactores VLP-GOx funcionalizados con la HSA

tendrían que demostrar ser lo suficientemente selectivos para competir eficazmente con la HSA endógena del paciente

La complementariedad de cargas electrostáticas fue fundamental para lograr el encapsulamiento de la enzima GOx en las VLPs del BMV y producir los bionanorreactores por el método de autoensamblaje. Debido a la capacidad de las VLPs para cargar moléculas aniónicas, tal como el material genético propio del virus, fueron estudiadas las propiedades electrostáticas de la enzima GOx y de la proteína de cápside CP de las VLPs del BMV, tanto *in silico* como experimentalmente mediante el potencial Z. Los resultados confirmaron la carga negativa de la enzima GOx que fue fundamental para interactuar electrostáticamente con el extremo N-terminal de la CP del BMV, la cual está positivamente cargada, y así lograr el encapsulamiento en condiciones de autoensamblaje. El pH 5.1 y la fuerza iónica de 0.75 M de NaCl de la solución amortiguadora fueron las principales condiciones moduladas para el encapsulamiento de la enzima GOx en las VLPs del BMV por autoensamblaje. En promedio, se encapsuló una molécula de GOx (dímero) por VLP (**Tabla 2**). Considerando el diámetro hidrodinámico de los dímeros activos de la enzima GOx de 12.2 nm (**Tabla 1**) y el diámetro interno de las VLPs del BMV (T=3) de 17.8 nm (Lucas et al. 2002), estéricamente no sería posible tener encapsulado más de un dímero de GOx por cada VLP.

Como era de esperarse la enzima GOx encapsulada mostró un valor más alto en la constante de Michaelis-Menten (K_M) en comparación con la enzima libre, lo que representa una afinidad menor por el sustrato cuando está encapsulada, especialmente en los bionanorreactores funcionalizados con la HSA. Esto puede deberse a limitaciones de transferencia de masa cuando la enzima GOx está confinada dentro de la cápside del BMV. El bionanorreactor es un sistema semi-cerrado debido a la estructura semi-porosa de la VLP-BMV que limita la difusión de los sustratos y productos hacia el interior y el exterior, respectivamente, a través de sus poros de 2 nm de diámetro (Lucas et al. 2002). Particularmente, en los bionanorreactores funcionalizados la difusión de los sustratos y productos es más limitada por el recubrimiento de la HSA en la superficie del bionanorreactor, y este efecto se ve reflejado en un valor más alto de la K_M .

En consecuencia, el número de recambio enzimático o constante de velocidad (k_{cat}) del bionanorreactor es afectada por la velocidad a la que difunden tanto los sustratos como los por productos hacia adentro y hacia afuera de la VLP. La limitación en la difusión de los sustratos y productos por la estructura semi-porosa de las VLPs origina la caída en el número de recambio de la GOx encapsulada dentro del bionanorreactor VLP-GOx al 14% y, más aún, en el bionanorreactor funcionalizado VLP-GOx@HSA la lleva al 5.5% respecto a la enzima GOx libre. No obstante, la enzima GOx retiene eficientemente la actividad

catalítica en ambas preparaciones, manteniendo actividad significativa cuando está encapsulada y es suficiente para ejercer un efecto citotóxico en los cultivos celulares.

La GOx ha sido reportada anteriormente como agente citotóxico para células tumorales y se le atribuye la capacidad de reducir el tejido tumoral en experimentos *in vivo* (Huo, et al., 2017). El efecto citotóxico de la GOx es originado por la producción de peróxido de hidrógeno, causando daño celular por estrés oxidativo, además de hipoxia por el consumo de oxígeno e inanición de las células por el agotamiento de la glucosa debido a la actividad GOx (Zhao, et al., 2017; Zhang, et al., 2018; Fan, et al., 2017). Previamente, Brasch y col. realizaron la co-encápsulación de la enzima GOx en las VLPs del virus CCMV (por sus siglas en inglés *Cowpea chlorotic mottle virus*) junto con una DNAzima, que es una imitación de enzima, compuesta por una secuencia específica de DNA y una molécula de hemina, este complejo descompone el peróxido producido por la GOx. Además, los autores realizaron un segundo sistema de co-encapsulación de la GOx junto con la enzima glucoquinasa. La actividad catalítica de ambos sistemas resultantes fue estudiada como cascada enzimática y con fines distintos a la terapia del cáncer (Brasch, et al., 2017). No obstante, los autores no reportan parámetros catalíticos exclusivos de la actividad GOx en ambos sistemas de nanorreactor enzimático.

Inesperadamente, encontramos un ligero efecto citotóxico en la preparación de VLPs que no contenían actividad catalítica GOx, especialmente, en los cultivos de las células tumorales 4T1. Este efecto podría ser resultado de una alta concentración de proteína propia de la preparación. No obstante, en la **Fig. 16 A.** se aprecia como a altas concentraciones de proteína (50 y 100 µg/mL) las VLPs sin actividad catalítica y sin funcionalización reducen mayormente la viabilidad en los cultivos de línea tumoral 4T1 en comparación con las VLPs no catalíticas funcionalizadas con la HSA a la misma concentración de proteína. Previamente, ha sido demostrado *in vivo* que partículas virales y nanopartículas tipo virus o VLPs tienen un efecto activador en la respuesta inmune específica contra células tumorales (Al-Barwani, et al., 2014; Mohsen, et al., 2019; Duval, et al. 2020). En particular, VLPs sin ninguna funcionalización derivadas del virus *Cowpea mosaic virus* (CPMV) han mostrado tener potencial como inmunoterapia anti-cáncer (Beatty & Lewis 2019). Por otra parte, el virus CPMV administrado sistémicamente en ratones puede estimular, en combinación con radiación, una respuesta inmunitaria terapéutica (Patel, et al., 2018). No obstante, existe poca información de ensayos de citotoxicidad *in vitro* con VLPs sin ninguna funcionalización. Sin embargo, Li y col., en 2021, expusieron *in vitro* células dendríticas derivadas de medula ósea ante VLPs del P22 sin ninguna funcionalización reportando una tasa de sobrevivencia de más del 90% en cultivos tratados a altas concentraciones de VLPs (200 µg/mL), indicando que las VLPs conteniendo únicamente las proteínas de la cápside tienen un bajo efecto citotóxico en estas células (Li et al., 2021). Por otra parte, cápsides vacías o

VLPs derivadas del virus de la hepatitis B fueron ensayadas en cultivos *in vitro* con las células 293T de riñón sin mostrar algún efecto citotóxico (Sakai, et al., 2021).

Adicionalmente, encontramos evidente daño celular a nivel de la membrana plasmática en la línea celular de cáncer de mama triple negativo humano MDA-MB-231/eGFP en presencia de los bionanorreactores VLP-GOx@HSA (**Fig. 19**). La línea MDA-MB-231/eGFP expresa de manera constitutiva la proteína verde fluorescente o GFP debido a una modificación genética de fusión del gen que codifica para esta proteína con el gen de la β -actina del citoesqueleto de la célula. Por lo tanto, la morfología de las células MDA-MB-231/eGFP expuestas a los bionanorreactores fue observada exitosamente por fluorescencia del citoesqueleto de color verde bajo la excitación con luz azul, usando microscopia de fluorescencia. Al cabo de la primera hora de la exposición a los bionanorreactores con actividad GOx se aprecian cambios drásticos en la morfología de las células. Después de dos horas de incubación se perciben protrusiones de la membrana plasmática de las células MDA-MB-231/eGFP claramente observables en contraste de fases como luz verde fluorescente. Estas protrusiones podrían deberse a la formación de burbujas de oxígeno dentro de la célula producidas por la activación del sistema antioxidante de las células en consecuencia al exceso de peróxido de hidrógeno generado por la actividad GOx del bionanorreactor. Un ejemplo, de estas respuestas celulares antioxidantes es la actividad catalasa endógena de la célula (Nandi, et al., 2019).

A pesar de la ausencia de valores de referencia para la actividad de catalasa en tejido mamario humano sano, es bien sabido que las células tumorales, como muchas otras células, muestran una importante actividad de catalasa. La catalasa es una enzima antioxidante que puede eliminar eficazmente el peróxido de hidrógeno, evitando el daño celular causado por las especies reactivas del oxígeno. En el caso de la línea celular 4T1 de tumor de mama murino, la actividad catalasa puede alcanzar hasta 75 U/mg de proteína (Hassanshahi, et al., 2022) y en el caso de línea celular MCF-7 que representa células tumorales de cáncer de mama positivas a receptores de estrógeno, la actividad catalasa oscila alrededor de 12 U/mg de proteína (Glorieux, et al., 2011). Luego entonces, en presencia de peróxido de hidrógeno, la enzima catalasa endógena puede producir oxígeno molecular gaseoso dentro de la célula como se observa en los videos obtenidos de los cultivos de células MD-MB-231/eGFP expuestos a los bionanorreactores con actividad GOx. En los cultivos, cuando las células se lisan, inmediatamente desaparece la fluorescencia debido a la destrucción de la membrana plasmática y subsecuentemente ocurre la dilución del fluoróforo del citoplasma al medio de cultivo.

Las ventajas de las VLPs como nanoacarreadores de actividad enzimática en aplicaciones biomédicas son principalmente proteger a la enzima de interés de la degradación de las proteasas endógenas del paciente

(O'Neil, et al., 2013), reducir la respuesta inmunogénica, especialmente cuando el acarreador está recubierto con proteínas compatibles como la HSA o polímeros no inmunogénicos como el polietilenglicol (Nuñez-Rivera, et al., 2020). Anteriormente, la funcionalización con la proteína HSA ha mostrado incrementar la afinidad de agentes antitumorales hacia células tumorales (Zhou, et al., 2019; Chen, et al., 2014). La HSA provee una interacción entre el agente antitumoral y la proteína ácida y rica en cisteína SPARC y la glicoproteína Gp60 (albodina) facilitando la internalización en las células tumorales. Especialmente la línea celular 4T1 expresa altamente la proteína SPARC y la Gp60, lo cual promueve la alta internalización de la HSA en comparación con el tejido sano (Zhou, et al., 2019).

El papel de la proteína SPARC en desarrollo del cáncer aún se mantiene en controversia. Altos niveles de la expresión de SPARC han sido reportados en cáncer de páncreas (Von Hoff, et al., 2011), gastrointestinal (Gamradt, et al., 2021), cervico-uterino (Sova, et al., 2006), óseo (Bellahcène & Castronovo, 1995), mama (Lien, et al., 2007; Jones, et al., 2004; Shi, et al., 2022), y en glioblastomas (Rempel, et al., 1998). En contraste, bajos niveles en la expresión de SPARC han sido encontrados en cáncer de páncreas (Puolakkainen, et al., 2004), ovario (Yiu, et al., 2001), y colorectal (Yang, et al., 2007; Cheetham, et al., 2008). Preparaciones terapéuticas a base de la proteína HSA ha mostrado unirse eficientemente a la proteína SPARC (Tao, et al., 2021; Are 2022 & Babu, 2022). Desde hace dos décadas atrás, diferentes medicamentos a base de proteínas séricas fueron aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América para la terapia avanzada de del cáncer y el tratamiento de la diabetes, entre otras nanoformulaciones que actualmente están siendo evaluadas en pruebas clínicas (Iqbal, et al., 2021).

Más aun, la captación celular de nanopartículas de HSA por células tumorales 4T1 ha sido demostrada previamente por microscopia confocal de fluorescencia (Chen, et al., 2014). Teniendo esto en cuenta, los bionanorreactores VLP-GOx fueron funcionalizados con la proteína HSA (**Fig. 12**). El recubrimiento del bionanorreactor con la proteína HSA incrementa el contenido de proteína inerte de actividad GOx en la preparación. No obstante, no se encontraron ventajas en la citotoxicidad de los bionanorreactores con base al contenido de GOx ($\mu\text{g/mL}$) o a la actividad catalítica GOx (mU/mL) tras el recubrimiento del bionanorreactor con la HSA; ya que ambas preparaciones VLP-GOx y VLP-GOx@HSA mostraron una CI_{50} muy próximas entre sí en los cultivos celulares (**Fig. 17 y 18**).

Por otra parte, se encontró citotoxicidad tanto en células tumorales como en células sanas, esto es muy importante porque indica que es apropiado buscar ligantes más específicos que apunten a células tumorales y evadan la internalización en células sanas. Otros bionanorreactores enzimáticos han sido

funcionalizados con un derivado de estradiol o ácido fólico para ser reconocidos por receptores de estrógenos y folato, respectivamente, en células tumorales de mama y han mostrado una eficiente internalización (Tapia-Moreno, et al., 2017; Chauhan, et al., 2018; Cheung, et al., 2016). Otros ligantes para el reconocimiento específico de células tumorales como anticuerpos monoclonales (Kocbek, et al., 2007), péptidos (Hosseini-Nejad-Ariani, et al., 2019), aptámeros (Camorani, et al., 2020), vitaminas (Welsh, et al., 2003), y carbohidratos (Li, et al., 2022), entre otros (Alqaraghuli, et al., 2019) han sido estudiados.

El direccionamiento específico es crucial para el cáncer triple negativo porque representa el 15-20% de todos los casos de cáncer de mama, el cual es característico por una baja expresión de receptores hormonales (estrógeno o progesterona) y el receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Foulkes, et al., 2010). No obstante, este agresivo cáncer es responsable de una gran proporción de casos de metástasis y muertes de mujeres en el mundo (Fadare & Tavassoli, 2008).

Capítulo 5. Conclusiones

La complementariedad de cargas electrostáticas entre la superficie de la enzima GOx y el extremo N-terminal de la CP del BMV fue fundamental para la encapsulación de la enzima por el método de autoensamblaje modulado por el pH y la fuerza iónica. La enzima GOx encapsulada en la VLP del BMV mostró actividad catalítica significativa. El comportamiento catalítico del bionanorreactor resultante VLP-GOx se ajustó al modelo de cinética enzimática de Michaelis-Menten. Los parámetros catalíticos obtenidos con este modelo muestran que la actividad catalítica se reduce cuando la enzima es encapsulada, pero es suficiente para ejercer citotoxicidad. La morfología de los bionanorreactores VLP-GOx resultó muy similar a la geometría del virus nativo. Además, los bionanorreactores son altamente hidrosoluble y son adecuados para su uso en fluidos biológicos.

Las nanopartículas tipo virus BMV catalíticamente activas, o bionanorreactores VLP-GOx, completamente formuladas a base de proteínas tienen un alto potencial en la terapia contra el cáncer de mama al mostrar citotoxicidad significativa en la línea celular de tumor de mama murino 4T1. Los bionanorreactores con actividad GOx o VLP-GOx generan citotoxicidad en células tumorales. No obstante, también se registró citotoxicidad en la línea celular de riñón humano 293T, utilizada como modelo de células sanas. La funcionalización del bionanorreactor VLP-GOx con la HSA descrita en este protocolo no mostró ventajas significativas en la especificidad de entrega de actividad citotóxica en células tumorales. Sin embargo, es recomendable optimizar la funcionalización del bionanorreactor VLP-GOx conjugándolo con otro agente más específico para el direccionamiento selectivo a células tumorales.

Los bionanorreactores enzimáticos con actividad GOx podrían ser una alternativa eficiente para mejorar la terapia actual contra el cáncer de mama, por lo cual es necesario realizar estudios *in vivo* para reforzar la eficacia de esta estrategia de tratamiento.

Literatura citada

- Al-Barwani, F., Donaldson, B., Pelham, S. J., Young, S. L., & Ward, V. K. (2014). Antigen delivery by virus-like particles for immunotherapeutic vaccination. *Therapeutic Delivery*, 5, 1223–1240. <https://doi.org/10.4155/tde.14.74>.
- Alqaraghuli, H. G. J., Kashanian, S., & Rafipour, R. (2019). A review on targeting nanoparticles for breast cancer. *Current Pharmacology and Biotechnology*, 20, 1087–1107. <https://doi.org/10.2174/1389201020666190731130001>.
- Altun, İ., & Sonkaya, A. (2018). The most common side effects experienced by patients were receiving first cycle of chemotherapy. *Iranian Journal of Public Health*, 47(8), 1218–1219.
- Are, R. P., & Babu, A. R. (2022). Molecular interaction analysis of SPARC–collagen with human serum albumin. *Journal of Computational Biophysics and Chemistry*, 21, 927–939. <https://doi.org/10.1142/S2737416522500399>.
- Arnold, M., Morgan, E., Rungay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S., & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*, 66, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.08.010>.
- Azamjah, N., Soltan-Zadeh, Y., & Zayeri, F. (2019). Global trend of breast cancer mortality rate: A 25-year study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20, 2015–2020. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.7.2015>.
- Beatty, P. H., & Lewis, J. D. (2019). Cowpea mosaic virus nanoparticles for cancer imaging and therapy. *Advances Drug Delivery Review*, 145, 130–144. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.005>.
- Bellahcène, A., & Castronovo V. (1995). Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *The American Journal of Pathology*, 146, 95–100.
- Bhattacharya, A.A., Grune, T., Curry, S. (2000). Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol* 303: 721. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4158>.
- Blackadar, C. B. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 7(1), 54–86. <https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i1.54>.
- Brasch, M., Putri, R. M., De Ruiter, M. V., Luque, D., Koay, M. S. T., Castón, J. R., & Cornelissen, J. J. L. M. (2017). Assembling enzymatic cascade pathways inside virus-based nanocages using dual-tasking nucleic acid tags. *Journal of the American Chemistry Society*, 139, 1512–1519. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b10948>.
- Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2012). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (Suppl.) 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.006>.
- Cadena-Nava, R. D., Comas-Garcia, M., Garmann, R. F., Rao, A. L. N., Knobler, C. M., & Gelbart, W. M. (2012). Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: requirement for a specific high protein/rna mass ratio. *Journal of Virology*, 86(6), 3318–3326. <https://doi.org/10.1128/JVI.06566-11>.

- Camorani, S., Passariello, M., Agnello, L., Esposito, S., Collina, F., Cantile, M., Di Bonito, M., Ulasov, I. V., Fedele, M., Zannetti, A., De Lorenzo, C., & Cerchia, L. (2020). Aptamer targeted therapy potentiates immune checkpoint blockade in triple-negative breast cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 39, 180. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01694-9>.
- Carter, D. C., & Ho, J. X. (1994). Structure of serum albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 45: 153-203. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60640-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60640-3).
- Chakraborti, S., Lin, T. Y., Glatt, S., & Heddle, J. G. (2020). Enzyme encapsulation by protein cages. *RSC Advances*, 10(22), 13293–13301. <https://doi.org/10.1039/C9RA10983H>.
- Chang, K., Liu, Z., Fang, X., Chen, H., Men, X., Yuan, Y., Sun, K., Zhang, X., Yuan, Z., & Wu, C. (2017). Enhanced phototherapy by nanoparticle-enzyme via generation and photolysis of hydrogen peroxide. *Nano Letters*, 17 (7), 4323–4329. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b01382>.
- Chatterjee, M., Ben-Josef, E., Robb, R., Vedaie, M., Seum, S., Thirumoorthy, K., Palanichamy, K., Harbrecht, M., Chakravarti, A., & Williams, T. M. (2017). Caveolae-mediated endocytosis is critical for albumin cellular uptake and response to albumin-bound chemotherapy. *Cancer Research*, 77(21):5925-5937. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0604>.
- Chauhan, K., Hernandez-Meza, J. M., Rodríguez-Hernández, A. G., Juárez-Moreno, K., Sengar, P., & Vazquez-Duhalt, R. (2018). Multifunctionalized biocatalytic P22 nanoreactor for combinatory treatment of ER+ breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 16, 17. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0345-2>.
- Chauhan, K., Sengar, P., Juárez-Moreno, K., Hirata, G. A., & Vazquez-Duhalt, R. (2020). Camouflaged, activatable and therapeutic tandem bionanoreactors for breast cancer theranosis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 580, 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.07.043>.
- Cheetham, S., Tang, M. J., Mesak, F., Kennecke, H., Owen, D., & Tai, I. T. (2008). SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2'deoxyctidine to increase SPARC expression and improve therapy response. *British Journal of Cancer*, 98, 1810–1819. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604377>.
- Chen, Q., Liang, C., Wang, X., He, J., Li, Y., & Liu, Z. (2014). An albumin-based theranostic nano-agent for dual-modal imaging guided photothermal therapy to inhibit lymphatic metastasis of cancer post surgery. *Biomaterials*, 35, 9355-9362. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.062>.
- Cheung, A., Bax, H.J., Josephs, D.H., Ilieva, K.M., Pellizzari, G., Opzoomer, J., Bloomfield, J., Fittall, M., Grigoriadis, A., Figini, M., Canevari, S., Spicer, J. F., Tutt, A.N., & Karagiannis, S.N. (2016) Targeting folate receptor alpha for cancer treatment. *Oncotarget*, 7, 52553-52574. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9651>.
- Choi, S. H., Byeon, H. J., Choi, J. S., Thao, L., Kim, I., Lee, E. S., Shin, B. S., Lee, K. C., & Youn, Y. S. (2015). Inhalable self-assembled albumin nanoparticles for treating drug-resistant lung cancer. *Journal of Controlled Release*, 197:199-207. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.008>.
- Comellas-Aragonès, M., Engelkamp, H., Claessen, V., Sommerdijk, N. A. J. M., Rowan, A. E., Christianen, P. C. M., Maan, J. C., Verduin, B. J. M., Cornelissen J. J. L. M. & Nolte R. J. M. (2007). A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nature Nanotechnology* 2, 635–639. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.299>.

- Corben, A. D. (2013). Pathology of invasive breast disease. *Surgical Clinics of North America*, 93, 363–392. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2013.01.003>.
- Das, S., Zhao, L., Elofson, K., & Finn, M. G. (2020). Enzyme stabilization by virus-like particles. *Biochemistry*, 59 (31), 2870–2881. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00435>.
- Davies, C., Godwin, J., Gray, R., Clarke, M., Cutter, D., Darby, S., McGale, P., Pan, H. C., Taylor, C., Wang, Y. C., Dowsett, M., Ingle, J., & Peto, R. (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet*. 378(9793):771-84. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60993-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60993-8).
- Desai, N., Trieu, V., Damascelli, B., & Soon-Shiong, P. (2009). SPARC expression correlates with tumor response to albumin-bound paclitaxel in head and neck cancer patients. *Translational Oncology*, 2(2):59-64. <https://doi.org/10.1593/tlo.09109>.
- Dinda, S., Sarkar, S., & Das, P. K. (2018). Glucose oxidase mediated targeted cancer-starving therapy by biotinylated self-assembled vesicles. *Chemical Communications*, 54, 9929–9932. <https://doi.org/10.1039/C8CC03599G>.
- Ding, X., Liu, D., Booth, G., Gao, W., & Lu, Y. (2018). Virus-like particle engineering: from rational design to versatile applications. *Biotechnology Journal*, 13(5), e1700324. <https://doi.org/10.1002/biot.201700324>.
- Douglas, T., & Young, M. (2006). Viruses: Making friends with old foes. *Science*, 312(5775), 873–875. <https://doi.org/10.1126/science.1123223>.
- Duval, K. E. A., Wagner, R. J., Beiss, V., Fiering, S. N., Steinmetz, N. F., & Hoopes, P. J. (2020). Cowpea mosaic virus nanoparticle enhancement of hypofractionated radiation in a B16 murine melanoma model. *Frontiers in Oncology*, 16, 594614. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.594614>.
- Evans, T. W. (2002). Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16 (s5) 6–11. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.16.s5.2.x>.
- Fadare, O., & Tavassoli, F. A. (2008). Clinical and pathologic aspects of basal-like breast cancers. *Nature Clinical Practice Oncology*, 5, 149-159. <https://doi.org/10.1038/ncponc1038>.
- Fan, W., Lu, N., Huang, P., Liu, Y., Yang, Z., Wang, S., Yu, G., Liu, Y., Hu, J., He, Q., Qu, J., Wang, T., & Chen, X. (2017). Glucose-responsive sequential generation of hydrogen peroxide and nitric oxide for synergistic cancer starving-like/gas therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 56, 1229–1233. <https://doi.org/10.1002/anie.201610682>.
- Feng, L., Xie, R., Wang, C., Gai, S., He, F., Yang, D., Yang, P., & Lin, J. (2018). Magnetic targeting, tumor microenvironment-responsive intelligent nanocatalysts for enhanced tumor ablation. *ACS Nano*, 12 (11), 11000–11012. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.8b05042>.
- Feng, W., Han, X., Wang, R., Gao, X., Hu, P., Yue, W., Chen, Y., & Shi, J. (2018). Nanocatalysts-augmented and photothermal-enhanced tumor-specific sequential nanocatalytic therapy in both nir-i and nir-ii biowindows. *Advanced Materials*, 1805919. <https://doi.org/10.1002/adma.201805919>.

- Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 363, 1938-1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>.
- Fu, L. H., Qi, C., Hu, Y. R., Lin, J., & Huang, P. (2019). Glucose oxidase-instructed multimodal synergistic cancer therapy. *Advanced Materials*, 31, 1808325. <https://doi.org/10.1002/adma.201808325>.
- Fu, L. H., Qi, C., Lin, J., & Huang, P. (2018). Catalytic chemistry of glucose oxidase in cancer diagnosis and treatment. *Chemical Society Reviews*, 47(17), 6454–6472. <https://doi.org/10.1039/c7cs00891k>.
- Fu, X., Shi, Y., Qi, T., Qiu, S., Huang, Y., Zhao, X., Sun, Q., & Lin, G. (2020). Precise design strategies of nanomedicine for improving cancer therapeutic efficacy using subcellular targeting. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5, 262. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00342-0>.
- Gama, P., Cadena-Nava, R. D., Juárez-Moreno, K., Pérez-Robles, J., & Vazquez-Duhalt, R. (2021). Virus-based nanoreactors with GALT activity for classic galactosemia therapy. *ChemMedChem*, 16, 1438. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000999>.
- Gamradt, P., De La Fouchardière, C., & Hennino, A. (2021). stromal protein-mediated immune regulation in digestive cancers. *Cancers*, 13, 146. <https://doi.org/10.3390/cancers13010146>.
- Global Cancer Observatory (2020). International Agency for Research on Cancer. *World Health Organization*. Data source: <https://gco.iarc.fr/>
- Glorieux, C., Dejeans, N., Sid, B., Beck, R., Buc Calderon, P., & Verrax, J. (2011). Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 82, 1384-1390. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.007>.
- González-Davis, O., Villagrana-Escareño, M. V., Trujillo, M. A., Gama, P., Chauhan, K., & Vazquez-Duhalt, R. (2023). Virus-like nanoparticles as enzyme carriers for Enzyme Replacement Therapy (ERT). *Virology*, 580, 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.01.017>.
- Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular . *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>
- Hassanshahi, J., Hajializadeh, Z., Niknia, S., Mahmoodi, M., & Kaeidi, A. (2022). Anti-tumor effects of *Thymus Caramanicus* Jalas extract in mice through oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 74, 1797–1804. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgac060>.
- Hecht, H.J., Kalisz, H.M., Hendle, J., Schmid, R.D., & Schomburg, D. (1993). Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 229(1), 0–172. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1015>.
- Hernández Meza, J. M. (2017). *Estudio de la purificación y estabilidad de partículas pseudovirales derivadas del bacteriófago P22 con actividad peroxigenasa de citocromo P450*. [Tesis de licenciatura, Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2017/noviembre/0767597/Index.html>.
- Hoogenboezem, E. N., & Duvall, C. L. (2018). Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 130: 73–89. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.011>.

- Hosseini-Nejad-Ariani, H., Althagafi, E., & Kaur, K. (2019). Small peptide ligands for targeting EGFR in triple negative breast cancer cells. *Scientific Reports*, 25, 2723. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38574-y>.
- Huo, M., Wang, L., Chen, Y. & Shi, J. (2017). Tumor-selective catalytic nanomedicine by nanocatalyst delivery. *Nature Communications*, 8(1):357. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00424-8>.
- Inoue, T., Kawano, M. A., Takahashi, R. U., 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. *Journal of Biotechnology*, 134(1-2), 181–92. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.12.006>.
- Iqbal, H., Yang, T., Li, T., Zhang, M., Ke, H., Ding, D., Deng, Y., & Chen, H. (2021). Serum protein-based nanoparticles for cancer diagnosis and treatment. *Journal of Controlled Release*, 329, 997-1022. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.030>.
- Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Cossu, A., Reis-Filho, J. S., Fulford, L., Dexter, T., Davies, S., Bulmer, K., Ford, E., Parry, S., Budroni, M., Palmieri, G., Neville, A. M., O'Hare, M. J., & Lakhani, S. R. (2004). Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells identification of novel prognostic markers for breast Cancer. *Cancer Research*, 64, 3037–3045. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2028>.
- Jordan, P., Patterson, D., Saboda, K., Edwards, E., Miettinen, H., Basu, G., Thielges, M., & Douglas, T. (2016). Self-assembling biomolecular catalysts for hydrogen production. *Nature Chemistry*, 8, 179–185. <https://doi.org/10.1038/nchem.2416>.
- Kocbek, P., Obermajer, N., Cegnar, M., Kos, J., & Kristl, J. (2007). Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *Journal of Controlled Release*, 120, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.03.012>.
- Koellhoffer, E. C., & Steinmetz, N. F. (2022). Cowpea mosaic virus and natural killer cell agonism for *in situ* cancer vaccination. *Nano Letters*, 22(13), 5348–5356. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.2c01328>.
- Kragh-Hansen, U. (1981). Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol Rev.* 33(1):17-53.
- Kraj, P., Selivanovitch, E., Lee, B., & Douglas, T. (2021). Polymer coatings on virus-like particle nanoreactors at low ionic strength—charge reversal and substrate access. *Biomacromolecules*, 22(5), 2107–2118. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00208>.
- Larsen, M. T., Kuhlmann, M., Hvam, M. L., & Howard, K. A. (2016). Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. *Molecular and Cellular Therapies*. 4: 3.
- Li, R., Peng, Y., Pu, Y., Zhao, Y., Nie, R., Guo, L., & Wu, Y. (2022). Fructose and biotin co-modified liposomes for dual-targeting breast cancer. *Journal of Liposome Research*, 32, 119-128. <https://doi.org/10.1080/08982104.2021.1894171>.
- Li, W., Jing, Z., Wang, S., Li, Q., Xing, Y., Shi, H., Li, S., & Hong, Z. (2021). P22 virus-like particles as an effective antigen delivery nanopatform for cancer immunotherapy. *Biomaterials*, 271, 120726. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120726>.

- Lien, H. C., Hsiao, Y. H., Lin, Y. S., Yao, Y. T., Juan, H. F., Kuo, W. H., Hung, M., Chang, K. J., & Hsieh, F. J. (2007). Molecular signatures of metaplastic carcinoma of the breast by large-scale transcriptional profiling: identification of genes potentially related to epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*, 26, 7859–7871. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210593>.
- Lin, T., Zhao, P., Jiang, Y., Tang, Y., Jin, H., Pan, Z., He, H., Yang, V. C., & Huang, Y. (2016). Blood-brain barrier-penetrating albumin nanoparticles for biomimetic drug delivery via albumin-binding protein pathways for antiglioma therapy. *ACS Nano*, 10(11):9999-10012. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b04268>.
- Lucas, R. W., Larson, S. B., & McPherson, A. (2002). The crystallographic structure of brome mosaic virus. *Journal of Molecular Biology*, 317, 95–108. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5389>.
- Mano, N. (2019). Engineering glucose oxidase for bioelectrochemical applications. *Bioelectrochemistry*, 128, 218–240. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.04.015>.
- Matsumura, Y., & Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*, 46(12 Pt 1): 6387-92.
- McIntosh, D. P., Tan, X. Y., Oh, P., & Schnitzer, J. E. (2002). Targeting endothelium and its dynamic caveolae for tissue-specific transcytosis *in vivo*: a pathway to overcome cell barriers to drug and gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4): 1996-2001. <https://doi.org/10.1073/pnas.251662398>.
- Mejía-Méndez, J. L., Vazquez-Duhalt, R., Hernández, L. R., Sánchez-Arreola, E., & Bach, H. (2022). Virus-like particles: fundamentals and biomedical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8579. <https://doi.org/10.3390/ijms23158579>.
- Merlot, A. M., Kalinowski, D. S., & Richardson, D. R. (2014). Unraveling the mysteries of serum albumin—more than just a serum protein. *Frontiers in Physiology*, 5: 299. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00299>.
- Mohsen, M. O., Speiser, D. E., Knuth, A., & Bachmann, M. F. (2019). Virus-like particles for vaccination against cancer. *Wiley Interdisciplinary Review of Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12, 1579. <https://doi.org/10.1002/wnan.1579>.
- Nakashima, F., Shibata, T., Kamiya, K., Yoshitake, J., Kikuchi, R., Matsushita, T., Ishii, I., Giménez-Bastida, J. A., Schneider, C., & Uchida, K. (2018). Structural and functional insights into S-thiolation of human serum albumins. *Scientific Reports*, 8(1): 932. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19610-9>.
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 9613090. <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>.
- Nkanga, C. I., & Steinmetz, N. F. (2021). The pharmacology of plant virus nanoparticles. *Virology*, 556, 39–61. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.01.012>.
- Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini1, Z. S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A. J., & Ahmadian, G. (2021). Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of Nanobiotechnology*, 9, 59. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7>.

- Nuñez-Rivera, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodriguez-Hernandez, A. G., Vazquez-Duhalt, R., & Cadena-Nava, R. D. (2020). Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 372–382. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.28>.
- O'Neil, A., Prevelige, P. E., & Douglas, T. (2013). Stabilizing viral nano-reactors for nerve-agent degradation. *Biomaterials Science*, 1(8), 881–886. <https://doi.org/10.1039/C3BM60063G>.
- Patel, R., Czapar, A. E., Fiering, S., Oleinick, N. L., & Steinmetz, N.F. (2018). Radiation therapy combined with cowpea mosaic virus nanoparticle in situ vaccination initiates immune-mediated tumor regression. *ACS Omega*, 3, 3702–3707. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00227>.
- Pearce, A., Haas, M., Viney, R., Pearson, S. A., Haywood, P., Brown, C., & Ward, R. (2017). Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: a prospective cohort study. *PLoS One*, 12(10), e0184360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184360>.
- Puolakkainen, P. A., Brekken, R. A., Muneer, S., & Sage, E. H. (2004). Enhanced growth of pancreatic tumors in SPARC-null mice is associated with decreased deposition of extracellular matrix and reduced tumor cell apoptosis. *Molecular Cancer Research*, 2, 215–224.
- Rempel, S. A., Golembieski, W. A., Ge, S., Lemke, N., Elisevich, K., Mikkelsen, T., & Gutiérrez, J. A. (1998). SPARC: a signal of astrocytic neoplastic transformation and reactive response in human primary and xenograft gliomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57, 1112–1121. <https://doi.org/10.1097/00005072-199812000-00002>.
- Ruszkowski, M., Strugala, A., Indyka, P., Tresset, G., Figlerowicz, M., & Urbanowicz, A. (2022). Cryo-EM reconstructions of BMV-derived virus-like particles reveal assembly defects in the icosahedral lattice structure. *Nanoscale*, 14(8): 3224–3233. <https://doi.org/10.1039/D1NR05650F>.
- Sakai, C., Hosokawa, K., Watanabe, T., Suzuki, Y., Nakano, T., Ueda, K., & Fujimuro, M. (2021). Human hepatitis B virus-derived virus-like particle as a drug and DNA delivery carrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 581, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.10.009>.
- Sánchez Sánchez, L. P. (2014). *Diseño y caracterización de partículas pseudovirales biocatalíticas*. [Tesis de doctorado, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México]. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/72344>.
- Sánchez-Sánchez, L., Tapia-Moreno, A., Juárez-Moreno, K., Patterson, D. P., Cadena-Nava, R. D., Douglas, T., & Vazquez-Duhalt, R. (2015). Design of a VLP-nanovehicle for CYP450 enzymatic activity delivery. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0127-z>.
- Schnitzer, J. & Oh, P. (1992). Antibodies to SPARC inhibit albumin binding to SPARC, gp60, and microvascular endothelium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 263(6), H1872–H1879. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1992.263.6.H1872>.
- Schoonen, L., & Van Hest, J. C. M. (2014). Functionalization of protein-based nanocages for drug delivery applications. *Nanoscale*, 6(13), 7124–7141. <https://doi.org/10.1039/c4nr00915k>.
- Schwarz, B., Uchida, M., & Douglas T. (2017). Biomedical and catalytic opportunities of virus-like particles in nanotechnology. *Advances in Virus Research*, 97, 1–60. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.09.002>.

- Selivanovitch, E., LaFrance, B., & Douglas, T. (2021). Molecular exclusion limits for diffusion across a porous capsid. *Nature Communications*, 12, 2903. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23200-1>.
- Shi, S., Ma, H. Y., Han, X. Y., Sang, Y. Z., Yang, M. Y., & Zhang, Z.-G. (2022). Prognostic significance of SPARC expression in breast cancer: a meta-analysis and bioinformatics analysis. *BioMed Research International*, 2022, 8600419. <https://doi.org/10.1155/2022/8600419>.
- Sleep, D., Cameron, J., & Evans, L. R. (2013). Albumin as a versatile platform for drug half-life extension. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(12): 5526-34. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.023. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.023>.
- Son, Y. O., Jang, Y. S., Shi, X., & Lee, J. C. (2009). Activation of JNK and c-Jun is involved in glucose oxidase-mediated cell death of human lymphoma cells. *Molecules and Cells*, 28(6): 545-51. <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0149-1>.
- Son, Y. O., Kook, S. H., Jang, Y. S., Shi, X., & Lee, J. C. (2009). Critical role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in modulating the mode of cell death caused by continuous oxidative stress. *Journal Cellular Biochemistry*, 108(4):989-97. <https://doi.org/10.1002/jcb.22332>.
- Sova, P., Feng, Q., Geiss, G., Wood, T., Strauss, R., Rudolf, V., Lieber, A., & Kiviat, N. (2006). Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray Analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15, 114–123. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0323>.
- Spada, A., Emami, J., Tuszynski, J. A., & Lavasanifar, A. (2021). The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 8 (5), 1862–1894. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00046>.
- Tagde, P., Najda, A., Nagpal, K., Kulkarni, G. T., Shah, M., Ullah, O., Balant, S., & Rahman, M. H. (2022). Nanomedicine-based delivery strategies for breast cancer treatment and management. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2856. <https://doi.org/10.3390/ijms23052856>.
- Tao, H., Wang, R., Sheng, W., & Zhen, Y. (2021). The development of human serum albumin-based drugs and relevant fusion proteins for cancer therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.080>.
- Tapia Moreno, M. A. (2015). Funcionalización y direccionamiento de partículas tipo virus del bacteriófago P22 con actividad citocromo P450. [Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/656>.
- Tapia-Moreno, A., Juarez-Moreno, K., Gonzalez-Davis, O., Cadena-Nava, R. D., & Vazquez-Duhalt, R. (2017). Biocatalytic virus capsid as nanovehicle for enzymatic activation of Tamoxifen in tumor cells. *Biotechnology Journal*, 12, 1600706. <https://doi.org/10.1002/biot.201600706>.
- Vervoort, D. F. M., Heiringhoff, R., Timmermans, S., Van Stevendaal, M., & Van Hest J. C. M. (2021). Dual site-selective presentation of functional handles on protein-engineered cowpea chlorotic mottle virus-like particles. *Bioconjugate Chemistry*, 32 (5), 958–963. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00108>.

- Von Hoff, D. D., Ramanathan, R. K., Borad, M. J., Laheru, D. A., Smith, L. S., Wood, T. E., Korn, R. L., Desai, N., Trieu, V., Iglesias, J. L., Zhang, H., Soon-Shiong, P., Shi, T., Rajeshkumar, N. V., Maitra, A., & Hidalgo, M. (2011). Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase i/ii trial. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 4548–4554. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.5742>.
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: A review. *Journal of the American Medical Association*, 321(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>.
- Welsh, J., Wietzke, J. A., Zinser, G. M., Byrne, B., Smith, K., & Narvaez, C.J. (2003). Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *Journal of Nutrition*, 133, 2425S–2433S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.7.2425S>.
- Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H.M., & Hecht, H.J.(1999). 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55: 969–977. <https://doi.org/10.1107/s0907444999003431>.
- Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 927–938. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1407-4>.
- Yan, D., Wei, Y. Q., Guo, H. C., & Sun, S. Q. (2015). The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(24), 10415–10432. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7000-8>.
- Yang, E., Kang, H. J., Koh, K. H., Rhee, H., Kim, N. K., & Kim, H. (2007). Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers. *International Journal of Cancer*, 121, 567–575. <https://doi.org/10.1002/ijc.22706>.
- Yiu, G. K., Chan, W. Y., Ng, S. W., Chan, P. S., Cheung, K. K., Berkowitz, R. S., & Mok S. C. (2001). SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *The American Journal of Pathology*, 159, 609–622. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61732-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61732-4).
- Yu, X., Weng, Z., Zhao, Z., Xu, J., Qi, Z., & Liu, J. (2022). Assembly of protein cages for drug delivery. *Pharmaceutics*, 14, 2609. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122609>.
- Zhang, R., Feng, L., Dong, Z., Wang, L., Liang, C., Chen, J., Ma, Q., Zhang, R., Chen, Q., Wang, Y., & Liu, Z. (2018). Glucose & oxygen exhausting liposomes for combined cancer starvation and hypoxia-activated therapy. *Biomaterials*, 162, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.02.004>.
- Zhao, W., Hu, J., & Gao, W. (2017). Glucose oxidase-polymer nanogels for synergistic cancer-starving and oxidation therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9, 23528–23535. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b06814>.
- Zhou, C., Song, X., Guo, C., Tan, Y., Zhao, J., Yang, Q., Chen, D., Tan, T., Sun, X., Gong, T., & Zhang, Z. (2019). An alternative and injectable preformed albumin-bound anticancer drug delivery system for anticancer and antimetastasis treatment. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11, 42534–42548. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b11307>.

Zoldak, G., Zubrik, A., Musatov, A., Stupak, M., & Sedlak, E. (2004). Irreversible thermal denaturation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* is the transition to the denatured state with residual structure. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 47601–47609. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406883200>.

Anexos

Anexo 1

La cinética enzimática de los bionanorreactores tipo VLP del BMV con actividad GOx fue analizada mediante una regresión no lineal de Michaelis-Menten a partir de los ensayos de actividad enzimática. Se estudió la actividad catalítica de todos los bionanorreactores sintetizados a diferentes relaciones molares (1:2, 1:3, 1:6 y 1:23), los bionanorreactores funcionalizados (VLP-GOx@HSA) y la enzima GOx libre. Con base en los resultados de la regresión no lineal se estimaron los parámetros catalíticos (**Fig. 21**).

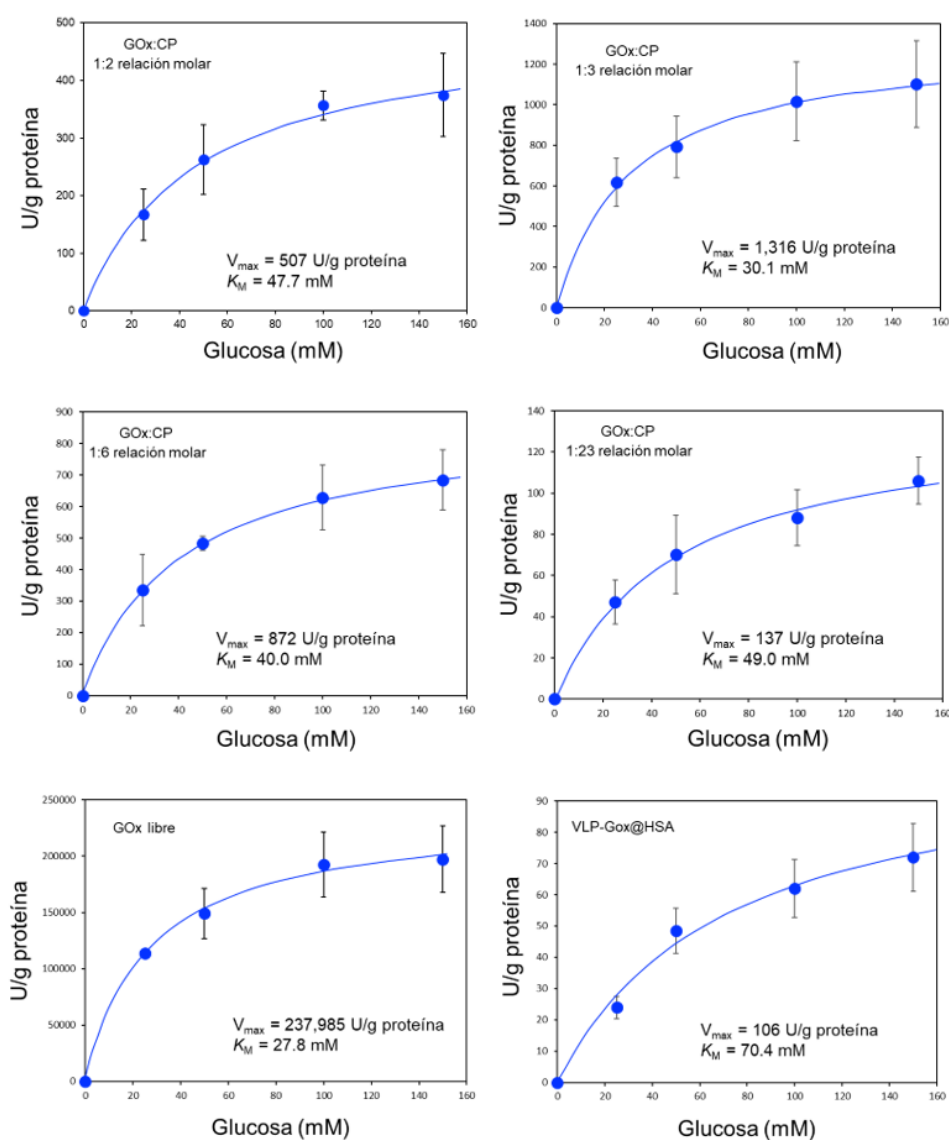


Figura 21. Cinética enzimática de los bionanorreactores tipo VLP del BMV con actividad GOx y parámetros catalíticos, obtenidos mediante la regresión no lineal de Michaelis-Menten.

Anexo 2

Los bionanorreactores VLP-GOx fueron obtenidos encapsulando la enzima GOx en las VLPs durante autoensamblaje de las proteínas de cápside del BMV. Para verificar el encapsulamiento la enzima GOx en la VLP del BMV por autoensamblaje, se realizó un experimento como control negativo, combinando VLPs del BMV con la enzima GOx y llevándola condiciones de autoensamblaje anteriormente descritas (**Fig. 22-A**). La preparación control negativo de encapsulación fue tratada de igual manera que los bionanorreactores VLP-GOx durante su síntesis y proceso de purificación (**Fig. 22-B**). Los resultados mostraron que el experimento control negativo no produce VLP catalíticas. Estas evidencias corroboran que la enzima GOx queda encapsulada en las VLPs durante la reacción de autoensamblaje de las proteínas de cápside del BMV, y que el bionanorreactor es resultado de la asociación de la enzima GOx, precisamente, dentro de la VLP.

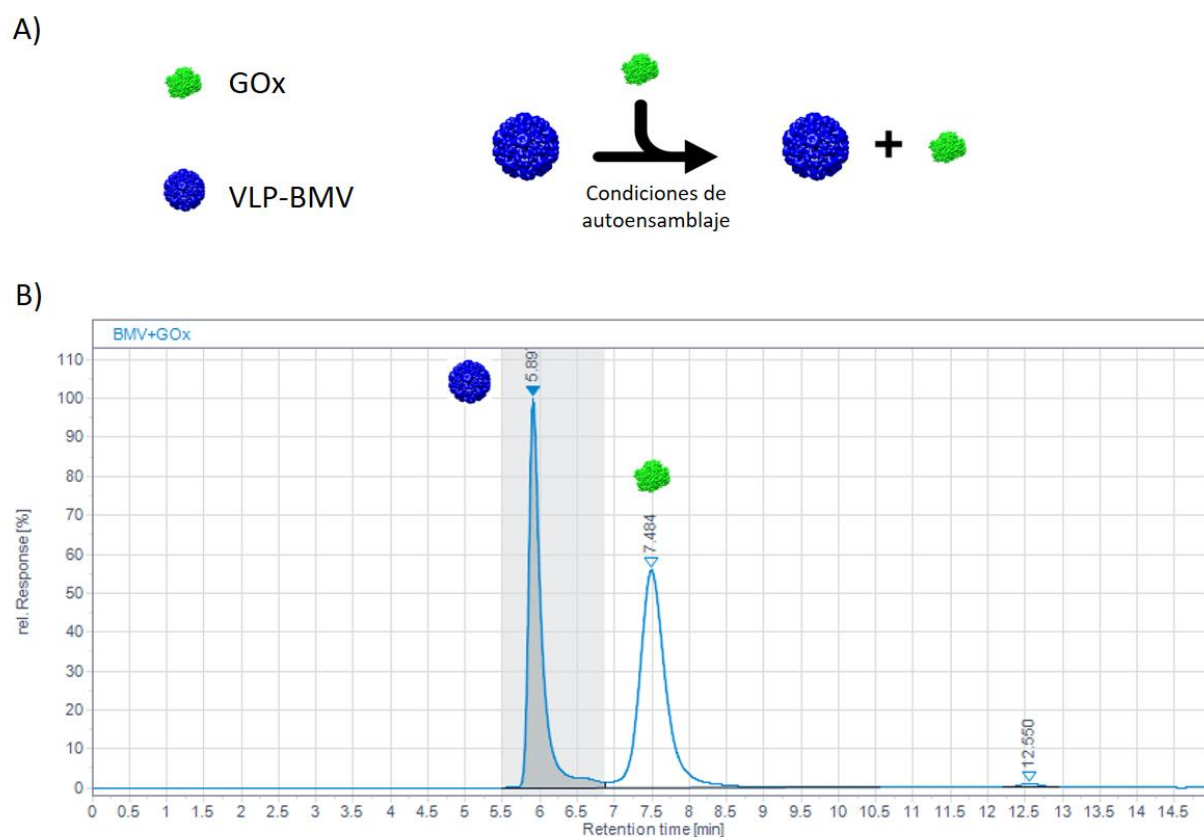


Figura 22. A) Esquema del experimento control negativo de encapsulación. B) Cromatograma del experimento control negativo, la fracción con pico máximo en 5.8 min corresponde a VLP no catalíticas.

Anexo 3

Artículo de investigación de la tesis de doctorado con el título “*Glucose oxidase virus-based nanoreactors for smart breast cancer therapy*” publicado en el Biotechnology Journal. Aceptación 05 de julio de 2023.

Received: 4 May 2023 | Accepted: 5 July 2023

DOI: 10.1002/biot.202300199

Biotechnology
Journal

RESEARCH ARTICLE

Glucose oxidase virus-based nanoreactors for smart breast cancer therapy

Pedro Gama^{1,2} | Patricia Juárez² | Ana G. Rodríguez-Hernández¹ |
Rafael Vazquez-Duhalt¹

¹Centro de Nanociencias y Nanotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Ensenada, Baja California, Mexico

²Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada, Baja
California, Mexico

Correspondence

Rafael Vazquez-Duhalt, Centro de
Nanociencias y Nanotecnología, UNAM, Km
107 Carretera Tijuana-Ensenada Ensenada,
Baja California 22760, México.
Email: rvd@ens.cnyr.unam.mx

Abstract

Background: Breast cancer is the most common malignant tumor disease and the leading cause of female mortality. The evolution of nanomaterials science opens the opportunity to improve traditional cancer therapies, enhancing therapy efficiency and reducing side effects.

Methods and major results: Herein, protein cages conceived as enzymatic nanoreactors were designed and produced by using virus-like nanoparticles (VLPs) from Brome mosaic virus (BMV) and containing the catalytic activity of glucose oxidase (GOx) enzyme. The GOx enzyme was encapsulated into the BMV capsid (VLP-GOx), and the resulting enzymatic nanoreactors were coated with human serum albumin (VLP-GOx@HSA) for breast tumor cell targeting. The effect of the synthesized GOx nanoreactors on breast tumor cell lines was studied in vitro. Both nanoreactor preparations VLP-GOx and VLP-GOx@HSA showed to be highly cytotoxic for breast tumor cell cultures. Cytotoxicity for human embryonic kidney cells was also found. The monitoring of nanoreactor treatment on triple-negative breast cancer cells showed an evident production of oxygen by the catalase antioxidant enzyme induced by the high production of hydrogen peroxide from GOx activity.

Conclusions and implications: The nanoreactors containing GOx activity are entirely suitable for cytotoxicity generation in tumor cells. The HSA functionalization of the VLP-GOx nanoreactors, a strategy designed for selective cancer targeting, showed no improvement in the cytotoxic effect. The GOx containing enzymatic nanoreactors seems to be an interesting alternative to improve the current cancer therapy. In vivo studies are ongoing to reinforce the effectiveness of this treatment strategy.

KEYWORDS

breast cancer, Brome mosaic virus, enzymatic nanoreactors, glucose oxidase, protein cage, virus-like particle

Abbreviations: BMV, Brome mosaic virus; CP, coat protein; DLS, dynamic light scattering; GOx, glucose oxidase; HSA, human serum albumin; VLP, virus-like nanoparticle.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2023 The Authors. *Biotechnology Journal* published by Wiley-VCH GmbH.

1 | INTRODUCTION

Breast cancer is the most common malignant tumor worldwide and the leading cause of female mortality.^[1,2] More than 680,000 deaths caused by breast cancer were recorded in 2020 by the International Agency for Research on Cancer at WHO.^[3] This histological pathology implies the appearance of adenocarcinoma in mammary glands.^[4] Current therapy for breast cancer consists of invasive tumor surgical resection and systemic chemotherapy treatment.^[5] However, non-specific chemo-pharmacologic treatments induce several drastic side effects.^[6,7] Today, nanomedicine is focusing on designing novel and smart therapies to increase the efficiency of breast cancer treatment.^[8–10]

Glucose oxidase (GOx) enzyme activity has been recently proposed for cancer nanomedicine applications. GOx, an intracellular enzyme from *Aspergillus niger*, is widely used in glucose determination, the fermentation industry, biosensors fabrication, and as a potential antibiotic.^[11,12] This enzyme catalyzes glucose oxidation to produce hydrogen peroxide and gluconolactone. In a tumor environment, the GOx activity reduces, both available glucose and molecular oxygen, essential compounds for cell metabolism. In addition, GOx produces oxidative stress generating hydrogen peroxide, killing tumor cells.^[13] Different designs of GOx enzyme systems have been recently developed for cancer therapy, including several mono- and multi-modal vesicles, polymer dots, and magnetic nanoparticles.^[14–17]

Nanoparticle specific-targeting is an emerging field to deliver selectively cytotoxic activity to tumor cells. The specific anticancer-drug delivery increases the treatment effectiveness and reduces the drastic side effects.^[18] A diversity of nanosystems, such as polymer, protein, metallic, organic, and inorganic nanoparticles, has been proposed for biomedical applications.^[19] Protein cages based on viral capsids, or virus-like particles (VLPs), are interesting nanosystems that have been proposed as nanocarriers for delivering anticancer therapies to specific tumor cells.^[20,21] VLPs are widely used in vaccine technology and have recently been proposed as nanocarriers of drugs for different biomedical therapies.^[22–25] VLPs can be derived from native viruses or obtained by recombinant technology. After removing the genetic material, the purified monomeric coat protein (CP) is self-assembled under certain conditions forming hollow nanoparticles. Self-assembly property is used to confine or encapsulate several cargo molecules producing well-defined symmetry and homogenous size nanoparticles. The VLPs are highly stable and able to carry and deliver cargo molecules, are biocompatible and biodegradable, and show low toxicity.^[26,27] The surface of VLPs can be functionalized with a diversity of ligands to be specifically targeted to cells and tissues,^[28,29] making smarter and more efficient therapies. In addition, the suspension of VLPs is highly stable in biological fluids.

VLPs can contain active enzymes, and the arrangement is called an enzymatic nanoreactor.^[22] Improved catalytic properties have been reported for virus-based enzymatic nanoreactors.^[30–32] VLP-based enzymatic nanoreactors containing cytochrome P450 activity have been proposed for prodrug activation in breast cancer therapy.^[33–35] The protein cage structure protects the catalytic molecule from pro-

tease degradation and decreases enzyme recognition by the immune system conferring a better catalytic performance.^[36–38] Moreover, the intrinsic porous structure of the VLP-based nanoreactors can allow the substrates and products to flow through the system.^[39–41]

In this work, GOx was encapsulated inside VLPs from Brome mosaic virus (BMV). The catalytic properties of the enzymatic nanoreactors were analyzed, and their cytotoxic effect on tumor cell lines was determined.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Materials

Type VII GOx from *A. niger*, human serum albumin (HSA, 96%), dextrose (99.5%), hydrogen peroxide (30 wt%), guaiacol (99%), L-glutathione reduced (98%), and all other general reagents, precursors and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Salts used for buffer solutions were purchased at Fermont (Monterrey, MX). TEM analysis was performed using copper grids (400-mesh) coated with formvar/carbon support film (Ted-Pella, USA). All chemicals were of the highest grade commercially available. Breast cancer 4T1 and human embryonic kidney 293T cell lines were acquired at ATCC (USA).

2.2 | BMV virus production

The VLPs were produced and purified from the native virus, as previously reported.^[42] The BMV native virus was amplified through plant infection to produce VLPs. First, barley plants (*Hordeum vulgare*) were grown under controlled conditions. Then, young barley leaves were inoculated with the BMV virus. Once the leaves showed the infection pattern, they were harvested and stored at -20°C to be later liquefied in a blender (Osterizer) with virus extraction buffer (0.5 M sodium acetate, 80 mM magnesium acetate, pH 4.5). The resulting macerated material was filtered through cheesecloth, then the filtrate was mixed with chloroform 1:1 v/v. The mixture was centrifuged at 10,000 rpm, 4°C , for 20 min. Since two phases formed in the centrifuge bottle, the upper phase (aqueous phase) was collected and stirred at 4°C overnight. Next, the aqueous extract containing the BMV virions was ultracentrifuged on a 5 mL sucrose cushion in a 32 mL centrifuge tube at 32,000 rpm, 4°C for 2 h. After centrifugation, the supernatant was discarded, and a pellet containing the BMV virions was resuspended in a virus suspension buffer (50 mM sodium acetate, 8 mM magnesium acetate, pH 4.5). Then, the BMV virion suspension was poured into a previously prepared centrifuge tube with a sucrose density gradient (10%–40%) and centrifuged at 30,000 rpm, 4°C for 2 h. After centrifugation, the tube was examined under white light to confirm the presence of the blue phase containing the viruses. The blue phase was then recovered and diluted 1:4 v/v in a virus suspension buffer. The dilute blue phase was centrifuged at 32,000 rpm, 4°C for 3 h to concentrate the virions in a pellet. After centrifugation, the supernatant

was discarded, and the pellet containing the virions was resuspended in virus suspension buffer and stored at -70°C .

2.3 | Capsid protein (CP) purification

The native BMV virions were disassembled to obtain the virus CP protein needed to synthesize the VLPs. First, the BMV virions were dialyzed against the disassembly buffer (0.5 M CaCl_2 , 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) for 5 h. Then, the resulting disassembled CP was centrifuged at 50,000 rpm, 4°C for 4 h. After centrifugation, the supernatant containing the CP was collected in 0.5 mL fractions. The CP purity of the fractions was estimated using the A_{280}/A_{260} nm quotient. The best fractions ($A_{280}/A_{260} \geq 1.6$) were combined and dialyzed against the protein buffer (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.2) for 2 h. Finally, the dialyzed CP was recovered and then quantified by absorbance using the CP extinction coefficient.

2.4 | Bioinformatic analysis of proteins

The electrostatic charge complementarity between the GOx enzyme surface and the inner surface of BMV capsid was determined by *in silico* studies. Three-dimensional structures of BMV capsid (ID: 3J7L) and GOx (ID: 1CF3) were obtained in the Protein Data Bank for the bioinformatic analysis. The surface electrostatic charge distribution of the BMV capsomer and the GOx enzyme were analyzed with Maestro Schrodinger software using the Poisson–Boltzmann method. The electrostatic charge distribution on both structures was represented with a color map.

2.5 | VLP-GOx nanoreactors synthesis

The VLP-GOx nanoreactors were synthesized by combining the disassembled CP and free-GOx enzyme and using the auto-assembly method. First, the disassembled CP protein was mixed with the free-GOx enzyme (in phosphate buffer pH 7.0) at different molar ratios (1:2, 1:3, 1:6, and 1:23 GOx:CP). Then, the GOx:CP mixtures were dialyzed in two steps. First, initial buffer (50 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 50 mM Tris, pH 7.2); and second, auto-assembly buffer (50 mM sodium acetate, 750 mM NaCl, 8 mM magnesium acetate, pH 5.1), 4 h, 4°C . After dialysis, the samples were centrifuged at 40,000 rpm, 4°C for 2 h to obtain the nanoreactors in a pellet. After centrifugation, the supernatant was removed and the pellet containing the VLP-GOx nanoreactors was resuspended in the auto-assembly buffer. The resulting VLP-GOx nanoreactor suspensions were filtered using a $0.2\ \mu\text{m}$ filter for further high-performance liquid chromatography (HPLC) purification. Next, the nanoreactors suspension was chromatographed through a size exclusion column (TSKgel Column, Super SW2000, Supelco-Tosoh Bioscience, Bellefont, PA) for HPLC (Agilent 1100 series) purification of the VLP-GOx nanoreactors. The VLP-GOx nanoreactor fractions were collected and then ultrafiltered through

a 30,000 Da membrane (Merck Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units) to adjust the work concentration. Finally, the resulting VLP-GOx nanoreactors were estimated by dynamic light scattering (DLS) with a Zetasizer Nanoseries device (Nano-ZS, Malvern Instruments). The total amount of protein in all preparations was estimated via the Bio-Rad Bradford Protein Assay (Hercules, CA).

2.6 | VLP-GOx surface functionalization

The surface of VLP-GOx nanoreactors was functionalized to improve their affinity to breast cancer cells. The outer surface of the VLP-GOx nanocages was covered with HSA protein. First, the HSA was activated with reduced glutathione, as reported by Chauhan et al.^[8] Second, the VLP-GOx nanoreactors (synthesized at 1:3 molar ratio) and reduced HSA were mixed at 1:8 VLP:HSA w/w ratio and stirred overnight at 4°C for the coating reaction. Next, the HSA functionalized nanoreactors were centrifuged at 40,000 rpm, 4°C for 2 h. After centrifugation, the supernatant was discarded and a pellet containing the HSA functionalized VLP-GOx nanoreactors (VLP-GOx@HSA) was resuspended in the assembly buffer. Finally, the VLP-GOx@HSA suspension was purified by HPLC to get rid of free HSA and aberrant capsids.

2.7 | GOx nanoreactors characterization

The nanoreactor catalytic activity was characterized by a peroxidase-coupled reaction followed by a colorimetric assay. The last product in this coupled reaction is tetraguaiacol, which absorbs at 470 nm. The increased absorbance is directly related to the glucose transformation rate. The kinetic constants of the VLP-GOx nanoreactors were obtained by performing reactions at different glucose concentrations (0, 25, 50, 100, and 150 mM). Kinetic data fitted a rectangular hyperbola plot from the Michaelis–Menten equation relating catalytic rate and substrate concentration. Michaelis–Menten kinetic constants were calculated by non-linear fit using CurveExpert Pro software (Hyams Development Ltd., London, UK).

The encapsulation of the GOx enzyme in VLP nanoparticles and the HSA coating was confirmed by SDS-PAGE. Finally, the size and morphology of the nanoreactor were studied with transmission electron microscopy (TEM, JEOL-2010) operated at 100 kV.

2.8 | Cytotoxic effects of nanoreactors

Breast tumor cell cytotoxic effects of GOx nanoreactors were studied *in vitro* assay. Two different cell lines were exposed to different concentrations of enzymatic nanoreactors: 4T1 murine breast cancer tumor cells and human embryonic kidney (293T) as a healthy cell model. The nanoreactor-exposed cells were analyzed by an MTT colorimetric assay (TOX-1, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) to estimate the cytotoxic effect. Firstly, the cells were cultured in 96 well-plates; for 293T cells in DMEM medium, 10,000 cells per well; for 4T1 cells in

RPMI medium, 4000 cells per well at 37°C and 5% CO₂. After 24 h, the cells were treated with different nanoreactor amounts. Finally, 48 h after starting the cultures, the MTT reagent (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added to the cells, and the absorbance (570 nm) showed in the well-plate was measured with a Multiskan GO spectrophotometer (Thermo Scientific). The resulting absorbance from negative control (cell media) was established as 100% of cell survival. Then, experimental groups were compared to estimate a survival rate.

2.9 | Fluorescence microscopy

Cell culture of 5×10^4 of MDA-MB231/eGFP (Cell Biolabs Inc, Ref. AKR-201) was seeded onto cell culture-treated Petri dishes (3 cm of diameter) and incubated in DMEM culture medium supplement with 10% fetal bovine serum (Biowest, France) and 1% of antibiotic/antimycotic (GIBCO) overnight at 37°C under 5% CO₂ atmosphere. Afterward, cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) 1X. Then, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of VLP-GOx resuspended in DMEM were added to the cell culture and incubated. Time-lapse images of cells were obtained by LS720 Microscope Lumascope (Etaluma Inc., San Diego, CA) every 2 min for 4 h. Phase contrast and green fluorescent (green filter 473–491/502–561 excitation/emission) images were obtained.

2.10 | Statistical analysis

Differences between data were tested using a two-way repeated measures (RM) analysis of variance (ANOVA) with Sidak or Tukey post hoc tests as appropriate. Statistically significant differences were accepted as *p*-values of <0.001, and Excel statistics (Microsoft, Redmond, WA) was used for all analyses.

3 | RESULTS

3.1 | Enzymatic nanoreactor synthesis and functionalization

The complementary electrostatic charge between the negatively charged GOx enzyme surface and the positively charged inner face of the BMV capsid drive the enzyme encapsulation (Figure 1A). The isoelectric point of GOx was determined by electrophoretic light scattering using the Z potential at different pH and showed to be 4.6 (SI 1). The self-assembly process was modulated by ionic strength (0.75 M) at pH 5.1. The GOx enzyme was successfully encapsulated inside VLPs from BMV by the self-assembly synthesis method (Figure 1B).

Four different enzyme-CP molar ratios (GOx:CP) were assayed to optimize the enzyme encapsulation (Table 1). Nanoreactors containing enzymatic activity (VLP-GOx) were obtained in all mixtures tested. All nanoreactor preparations were purified by size exclusion chromatography (SEC) in an HPLC (Figure 2). The purified preparation showing

the highest enzymatic activity (1:3 molar ratio) was then functionalized with HSA (Figure 1B). HSA shows a binding affinity for specific receptors on the surface of different cells in diseased organs that permits the active targeting and the specific recognition of the albumin-based formulations. In vitro experiments, HSA-conjugated preparations showed higher cellular uptake efficiency, longer half-life, higher cytotoxicity, and accumulation in tumors to a much greater extent than the free drug preparations.^[43,44] The functionalization was carried out through previously reduced cysteine groups of HSA protein, producing di-thiol cross-linking with the cysteine (Cys108) of CP-BMV (SI 2).

3.2 | Nanoreactors characterization

The nanoreactor's hydrodynamic size was estimated by DLS. No significant changes in hydrodynamic diameters were found. All the assayed ratios produced VLP-GOx particles with a similar hydrodynamic diameter to the native virus (≈ 28 nm). The unfunctionalized VLP-GOx showed a hydrodynamic diameter of 28.8 ± 7.9 nm, while the functionalized VLP-GOx@HSA showed a value of 50.6 ± 29.7 nm (Table 1). As expected and due to the random chemical conjugation, the hydrodynamic diameter of HSA-functionalized nanoreactors is bigger and shows a significant standard deviation, suggesting a variable number of HSA molecules per capsid.

The structure of the VLP-GOx nanoreactors was also characterized by TEM (Figure 3). The obtained micrographs of the VLP-GOx nanoreactor show a quasi-spherical shape with similar symmetry to the native BMV virus (28 nm). In addition, functionalized VLP-GOx@HSA nanoreactors show an ornamented outer surface displaying HSA protein molecules on the nanoreactor surface.

3.3 | Catalytic characterization

The protein proportions in the nanoreactors were estimated by densitometry on an SDS-PAGE gel (SI 3). According to the band's intensity, the GOx enzyme in the unfunctionalized VLP-GOx corresponds to 3.6% of the total protein, while in the HSA functionalized preparations (VLP-GOx@HSA), the GOx represented only 0.9%, CP 22.8%, and the cover shell of HSA 76.3% of the total protein in the nanoreactor.

The catalytic constants for GOx activity of nanoreactors were estimated using a Michaelis-Menten nonlinear regression (SI 4). The assembly from 1:3 GOx:CP molar ratio showed the highest specific activity ($1,316 \text{ U g}^{-1} \text{ protein}$) and a Michaelis constant (K_M) of 30.1 mM (Table 1). It is important to point out that the catalytic rate values in Table 1 are in total protein basis that includes the CP, GOx, and in the case also HSA. Thus, the 1:3 GOx:CP molar ratio was used for further studies and for HSA functionalization. Considering the GOx content in the nanoreactor preparations, the V_{max} of VLP-GOx, in enzyme activity basis, is estimated to be $36,500 \text{ U g}^{-1}$ of GOx, representing 15.3% of the transformation rate of free enzyme. On the other hand, the V_{max} of functionalized VLP-GOx@HSA in enzymatic activity basis is $11,780 \text{ U g}^{-1}$ of GOx, 4.9% of the value

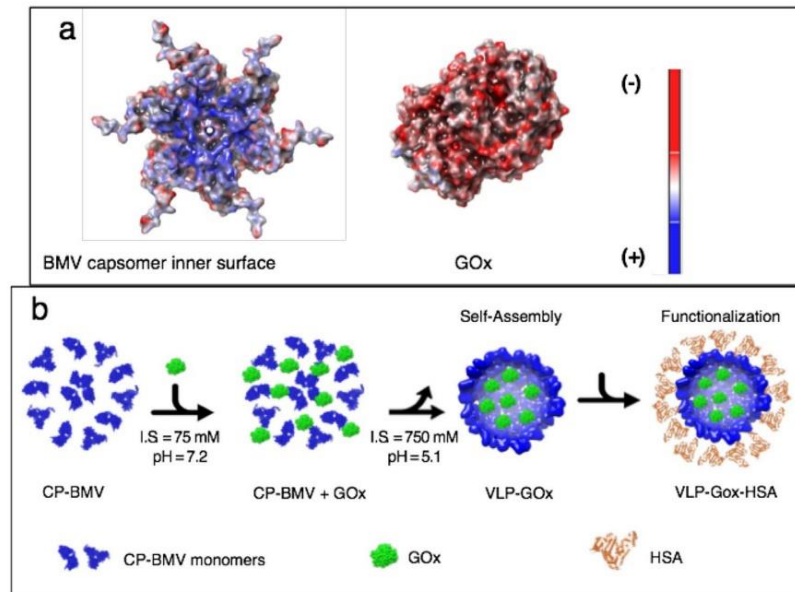


FIGURE 1 (A) Surface electric charge distribution on the GOx enzyme and BMV capsomer. The GOx surface mostly exhibits negative electric charges (red color), and the inner surface of BMV capsomers shows a more positive (blue color) electric charge distribution. The difference in electric charge distribution between GOx and the inner BMV surface results in electric charge complementarity. In silico results by Maestro Schrodinger. (B) Schematic representation of VLP-GOx nanoreactor self-assembly encapsulation and HSA functionalization. BMV, Brome mosaic virus; GOx, glucose oxidase; HSA, human serum albumin; VLP, virus-like nanoparticle.

TABLE 1 Hydrodynamic diameter determined by dynamic light scattering (DLS) of proteins and catalytic contents of enzymatic nanoreactors assembled at different GOx:CP molar ratios.

Preparation	Hydrodynamic diameter (nm)	Polydispersity index	V_{max}^a (U g ⁻¹ protein)	K_M^a (mM)
Free GOx	12.2 ± 4.1	0.325	237,985 ± 13,920	27.8 ± 3.1
Coat protein (CP)	6.8 ± 1.2	0.246	–	–
Native BMV	27.6 ± 6.7	0.067	–	–
GOx:CP molar ratio	VLP-GOx nanoreactors			
1:2	25.8 ± 8.5	0.163	507 ± 27	47.7 ± 13.0
1:3	28.8 ± 7.9	0.135	1316 ± 18	30.1 ± 1.9
1:6	33.4 ± 14.2	0.324	872 ± 95	40.0 ± 4.4
1:23	26.1 ± 8.9	0.172	137 ± 28	49.0 ± 4.6
1:3 VLP-GOx@HSA	50.6 ± 29.7	0.303	106 ± 9	70.4 ± 11.2

V_{max} values were estimated in total protein basis. Michaelis–Menten kinetic constants were calculated by non-linear fit using CurveExpert Pro software (Hyams Development Ltd., London, UK). See kinetic graphs SI 4. BMV, Brome mosaic virus; GOx, glucose oxidase; HSA, human serum albumin; VLP, virus-like nanoparticle.

^aArithmetic mean value and standard deviation from at least three independent enzyme kinetics.

of the free enzyme. Using the amount of enzyme contained in the nanoreactors and the molecular weight of GOx, the transformation rate constant (k_{cat}) could be obtained (Table 2). The free enzyme showed a k_{cat} value of 634 s⁻¹, while the preparations VLP-GOx and VLP-GOx@HSA showed values of 90 and 34 s⁻¹, respectively. In addition, it is possible to estimate the number of GOx molecules (active dimer of 160,000 Da) per capsid or nanoreactor (180 monomers of 20,385 Da). The number of GOx molecules inside each VLP cap-

sid was estimated as an average of 0.85 molecules of GOx per VLP nanoreactor.

3.4 | Antitumoral effect

The antitumoral effect of nanoreactors was assayed in 4T1 breast tumor cells, a breast cancer cell line derived from the mammary

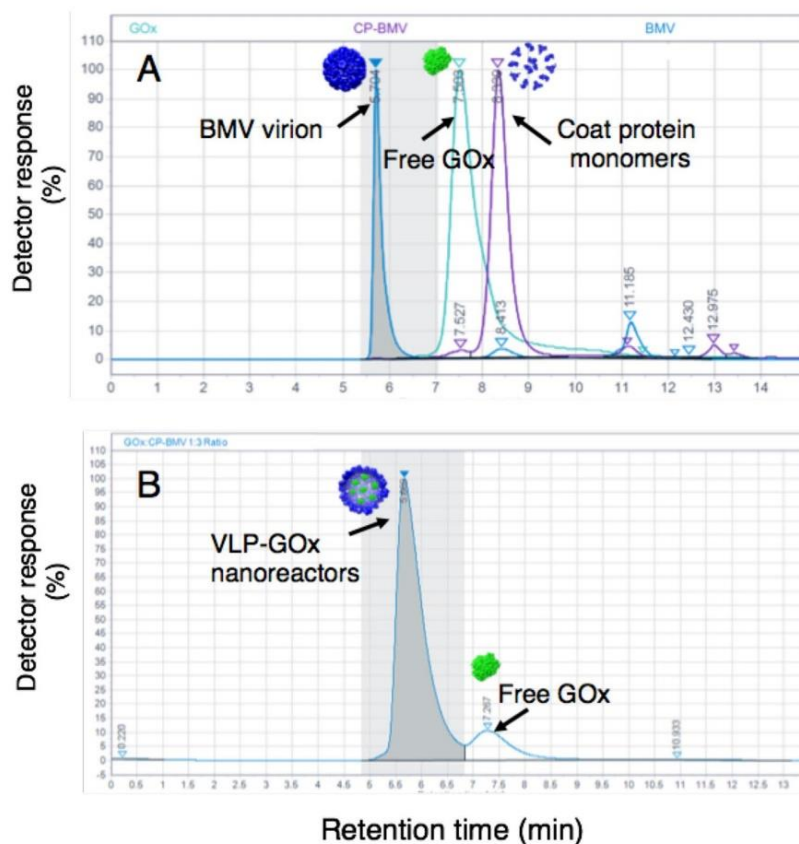


FIGURE 2 Purification of VLP-GOx nanoreactors by size exclusion chromatography using differences in retention time (A) Overlapped chromatograms show the retention time for native BMV = 5.7 min, free GOx = 7.5 min and disassembled CP = 8.4 min. (B) VLP-GOx nanoreactors retention time = 5.7 min, similar to native virions of BMV. The VLP-GOx nanoreactors were purified by collecting the fractions from 5.5 to 6.5 min. BMV, Brome mosaic virus; CP, coat protein; GOx, glucose oxidase; VLP, virus-like nanoparticle.

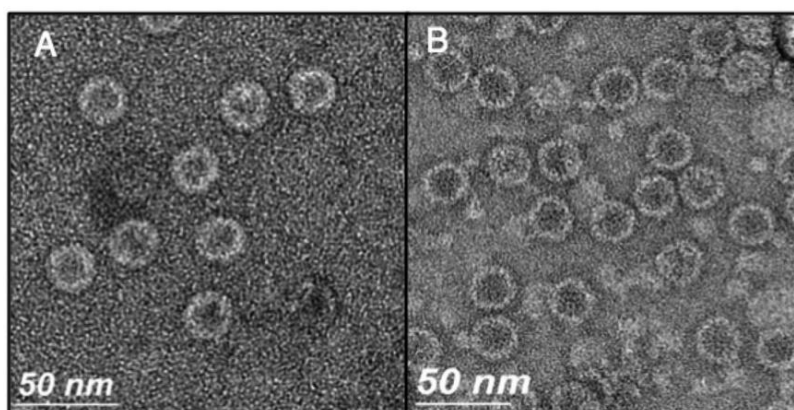


FIGURE 3 Transmission electron microscopy (TEM) of nanoreactors. (A) Quasi-spherical unmodified VLP-GOx nanoreactors, and (B) VLP-GOx@HSA functionalized nanoreactors. GOx, glucose oxidase; HSA, human serum albumin; VLP, virus-like nanoparticle.

TABLE 2 Composition of enzymatic nanoreactors in protein and molar basis.

Preparation	Composition in protein basis ^a (%)	Composition in mol basis ^b (%)	GOx molecules per capsid ^c	k_{cat} ^d (s ⁻¹)	K_M ^d (mM)
Free GOx	GOx = 100	GOx = 100	–	634 ± 37	27.8 ± 3.0
VLP-GOx	CP = 96.4 GOx = 3.6	CP = 98.82 GOx = 1.18	0.85	90 ± 10	34.6 ± 6.2
VLP-GOx-HSA	CP = 22.8 GOx = 0.9 HSA = 76.3	CP = 49.43 GOx = 0.59 HSA = 49.98	0.90	34 ± 3	70.4 ± 11.2

These values were used to estimate the number of glucose oxidase molecules per VLP capsid and the kinetic constants. CP, coat protein; GOx, glucose oxidase; HSA, human serum albumin; VLP, virus-like nanoparticle.

^aProtein percentage from the densitometry of the SDS-PAGE electrophoresis gel (SI 3).

^bEstimation by using 20,385 Da for CP monomer; 160,000 Da for GOx active dimer; 67,000 Da for HSA.

^cThe BMV capsid is composed of 180 CP monomers.

^dArithmetic mean value and standard deviation from at least three independent enzyme kinetics.

gland tissue of a mouse. In addition, the cytotoxic effect of nanoreactors was also assayed on cultures of 293T healthy cell line from the human embryonic kidney. Cytotoxicity was directly estimated as the cell viability as a metabolic activity using the MTT colorimetric assay.

Control experiments were carried out with VLP alone without GOx (Figure 4). Interestingly, high concentrations of empty VLPs and VLPs@HSA (>25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) significantly reduced the cell viability of 4T1 cancer cells. In contrast, VLPs treatment of 293T epithelial cells did not reduce cell viability at the highest concentration tested of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, except for unfunctionalized VLPs.

The same cytotoxicity experiments were performed with GOx-containing nanoreactors (Figures 5 and 6). The results were expressed based on both GOx content and nanoreactor GOx activity. These two forms to express the treatment doses are because the protein content of the two preparations is significantly different, and even if the GOx content is similar, the enzymatic activity changes when the nanoreactor is covered with HSA (Table 2). On the 4T1 breast tumor cells, the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values were 0.04 $\mu\text{g GOx mL}^{-1}$ for VLP-GOx and around 0.1 $\mu\text{g GOx mL}^{-1}$ for VLP-GOx@HSA, and no cell metabolic activity was detected at 1 $\mu\text{g GOx mL}^{-1}$ for both preparations (Figure 5A). The 4T1 tumor cells showed an IC_{50} at around 1 mU of GOx activity per mL of cell culture, and no metabolic activity at around 10 mU mL^{-1} in both preparations (Figure 5B).

The cytotoxicity was also assayed in 293T healthy embryonic kidney human cells (Figure 6). The results were expressed as both GOx protein content and nanoreactor GOx activity. The IC_{50} values were 0.45 $\mu\text{g GOx mL}^{-1}$ for VLP-GOx and around 0.79 $\mu\text{g GOx mL}^{-1}$ for VLP-GOx@HSA, and no cell metabolic activity was detected at 1 $\mu\text{g GOx mL}^{-1}$ for VLP-GOx preparation (Figure 6A). The VLP-GOx nanoreactors on 293T kidney cells showed an IC_{50} at around 15 mU of GOx activity per mL of cell culture, and no metabolic activity at around 30 mU mL^{-1} (Figure 6B). On the other hand, the VLP-GOx@HSA nanoreactors showed an IC_{50} around 8 mU mL^{-1} (Figure 6B).

The effect of the treatment with VLP-GOx@HSA on a triple-negative breast cancer cell line (MDA-MB-231) expressing the green fluorescent protein (GFP) was monitored by fluorescence microscopy

(Figure 7 and videos SI). After 1-h treatment in the presence of nanoreactors, the morphology of cells changed drastically, maybe due to oxidative stress. After 2 h, plasmatic membrane protrusions are produced inside the cells suggesting a high production of oxygen from the hydrogen peroxide decomposition by catalase activity, and the fluorescence starts to diminish. These cell blister production is increasing, and the fluorescence continues to diminish after 3 h. Finally, after 4 h, the cells are clearly damaged, the cell blisters are broken out, and cytosolic leaks are detected, and thus the fluorescence has wholly disappeared.

4 | DISCUSSION

Thanks to the complementarity of charges between the negative charge of the GOx protein and the positively charged internal side of the CP of BMV, it was possible to encapsulate the GOx inside the BMV capsid. An average of 0.85 GOx molecules per capsid was obtained. Considering the hydrodynamic diameter of the dimeric enzyme (≈ 12.2 nm) and the internal diameter of the BMV capsid of 17.8 nm,^[45] it seems not possible the encapsulation of more than one GOx dimeric molecule per capsid. GOx was previously encapsulated in cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) for cascade reaction study with the so-called DNAzyme, a peroxidase mimic formed in situ by a specific sequence of ssDNA in the presence of hemin and gluconokinase.^[46] However, no catalytic information of nanoreactors containing only GOx was reported.

As expected, the nanoreactors showed a higher K_M than the free enzyme, especially in the HSA-functionalized nanoreactors. This could be due to the substrate mass transfer limitations when the enzyme is inside a protein cage. This mass transfer limitation seems to be also the origin of the decrease of transformation rate (k_{cat}) of nanoreactors VLP-GOx and VLP-GOx@HSA to 14% and 5.5% of the value of free enzyme, respectively. Nevertheless, both preparations showed high GOx activity.

Unexpectedly, we found a slight cytotoxic effect of unloaded VLPs, especially on 4T1 cell line (Figure 4). These results should be taken

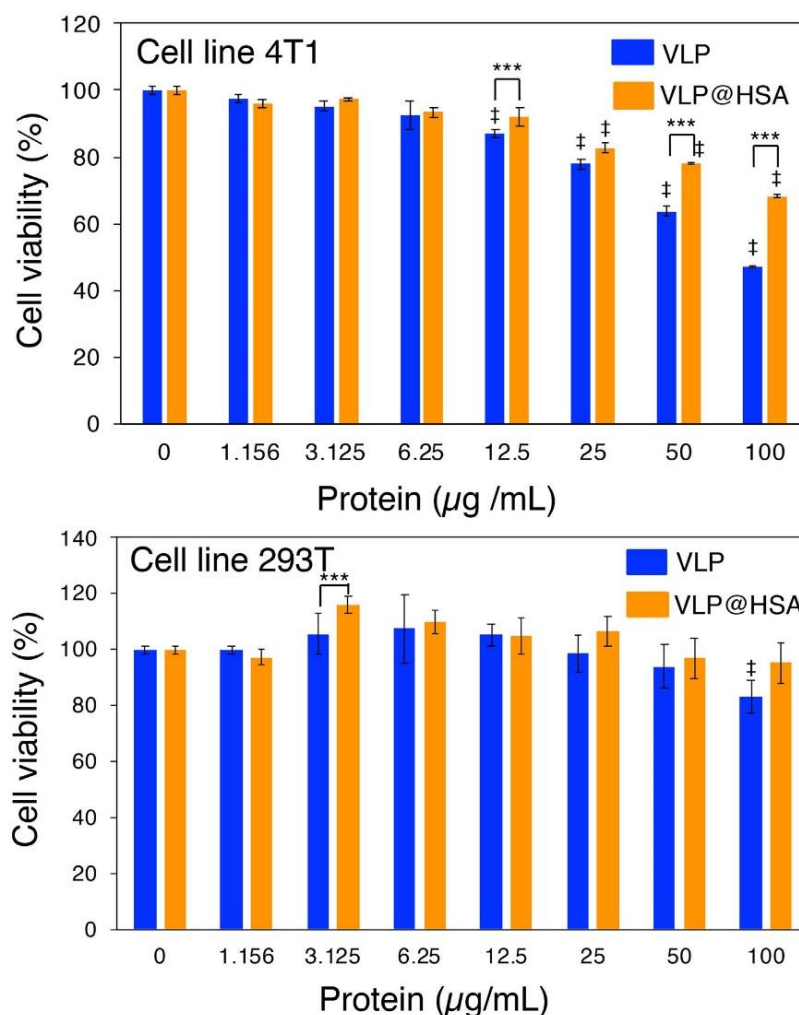


FIGURE 4 Cytotoxicity activity of empty unmodified and modified VLPs on cell cultures of 4T1 breast tumor mouse cell line model, and 293T healthy embryonic kidney human cells. Two-way RM ANOVA ($p < 0.001$). ***Significant difference between the two preparations at the same concentration. ‡Significant difference with the control. ANOVA, analysis of variance; RM, repeated measures; VLP, virus-like nanoparticle.

cautiously due to the high protein concentration. It is known that in vivo virus and VLPs are able to enhance specific anti-cancer immune reactions when delivered directly to the tumor.^[47–49] VLPs from cowpea mosaic virus (CPMV) have shown potential as safe anti-cancer immunotherapy.^[50] Systemically administered CPMV can stimulate an additive therapeutic immune response following treatment of the tumor with a conventional agent such as radiation.^[51] However, scarce information is available on in vitro cytotoxicity of empty and unfunctionalized VLPs. Unfunctionalized P22 VLPs showed a cell survival rate of 90% at concentrations as high as $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicating that VLP had almost no toxicity to bone marrow-derived dendritic cells.^[52] On the other hand, unloaded Human hepatitis B virus-derived VLPs also showed no cytotoxicity on 293T kidney cell line.^[53]

The IC_{50} in both cell lines is similar for VLP-GOx and VLP-GOx@HSA when evaluated in GOx content or GOx activity (Figures 4 and 5). In addition, significant damage in cancer cells was found in the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231/eGFP in the presence of VLP-GOx-HSA nanoreactors (Figure 6 and videos SI). MDA-MB-231/eGFP stable cells express a GFP as a cytoplasmatic protein. This mammalian cell was transfected with a cDNA chimera composed of a fusion of the genes encoding the fluorescent protein and β -actin. After 1-h incubation in the presence of GOx enzymatic nanoreactors, a drastic change in the cell morphology is noted. A plasmatic membrane protrusion (blisters) after 2 h of incubation was clearly observed in phase contrast images (videos SI). This could be due to the formation of gas bubbles inside the cells produced by the catalytic oxy-

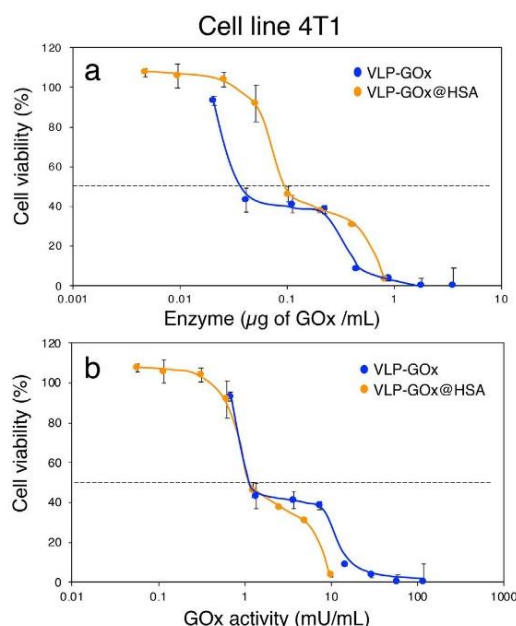


FIGURE 5 Cytotoxicity of unfunctionalized VLP-GOx and functionalized VLP-GOx@HSA nanoreactors on 4T1 breast tumor mouse cell line. Mean and standard deviation were obtained from three independent experiments. GOx, glucose oxidase; HSA, human serum albumin; VLP, virus-like nanoparticle.

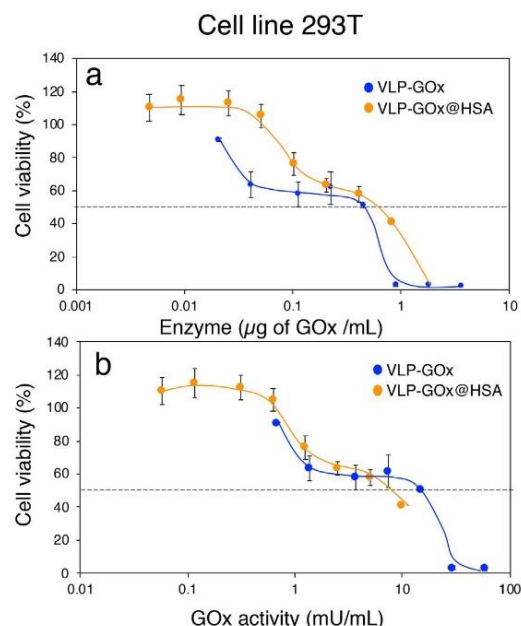


FIGURE 6 Cytotoxicity of unfunctionalized VLP-GOx and functionalized VLP-GOx@HSA nanoreactors on 293T kidney cell line. Mean and standard deviation were obtained from three independent experiments. GOx, glucose oxidase; HSA, human serum albumin; VLP, virus-like nanoparticle.

gen production by the antioxidant system (e.g., catalase) induced by the excess of hydrogen peroxide produced by the GOx activity. Despite the absence of reference values for catalase activity in normal human breast tissue, it is well known that tumor cells, as in many cells, show important catalase activity. Catalase is an antioxidant enzyme that can effectively scavenge H_2O_2 , avoiding cell damage from reactive oxygen species (ROS). In the case of the 4T1 breast tumor cells, the catalase activity ranges around 75 U mg^{-1} of protein,^[54] and for MCF-7 cell, which is a human breast cancer cell line with estrogen receptors (ERs), the catalase activity ranges around 12 U mg^{-1} of protein.^[55] Thus, in the presence of hydrogen peroxide, this endogenous enzyme will produce gaseous oxygen inside the cell. As shown in the videos (SI), when the cell “explodes”, the fluorescence immediately disappears due to the cell membrane destruction and the subsequent dilution of the cytosolic fluorophore in the medium. GOx has been reported as a cytotoxic agent for tumor cells and its capacity to reduce the tumor tissue in vivo experiments.^[56] The cytotoxic effect of GOx is originated from the production of hydrogen peroxide, causing oxidative damage in the cells, hypoxia as oxygen is consumed, and glucose consumption that starves the cells.^[57–59] The advantages of VLPs and nanocarriers of enzymatic activity are the protection against the proteases,^[38] the reduction of immunogenic response, especially when the nanoreactors are covered with compatible proteins or non-immunogenic polymers such as polyethylene glycol.^[60]

It has been reported that HSA functionalization increases tumor cell affinity.^[43] The HSA provides an interaction between the nanocage surface and secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) and glycoprotein receptor Gp60 (albondonin) facilitating the breast tumor cell internalization.^[44] Especially, the 4T1 tumor cells highly express SPARC and Gp60 which promote a higher HSA cell internalization when compared with normal tissues.^[43] The role of SPARC in cancer development is still controversial. Higher levels of SPARC expression have been reported in glioblastomas,^[61] pancreatic cancer,^[62] gastrointestinal cancer,^[63] cervical cancer,^[64] bone cancer,^[65] and breast cancer.^[66–68] In contrast, lower levels of SPARC expression have been found in pancreatic cancers,^[69] ovarian,^[70] and colorectal.^[71,72] HSA-based drugs can bind to SPARC.^[73,74] As a consequence, in the past two decades, several serum protein-based nanomedicines have been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for advanced cancer therapy and diabetes treatment, and more nanoformulations are currently being evaluated in clinical trials.^[75] Moreover, the cellular uptake of HSA nanoparticles by 4T1 tumor cells has been previously demonstrated by confocal fluorescence.^[76] With this in mind, VLP-GOx nanoreactors were functionalized with HSA. The HSA-covered nanoparticles (Figure 3B) significantly increased the protein content of nanoparticles. However, no advantage in cytotoxicity in cell cultures was found when the cytotoxicity results were based on GOx content or GOx activity (Figures 5 and 6).

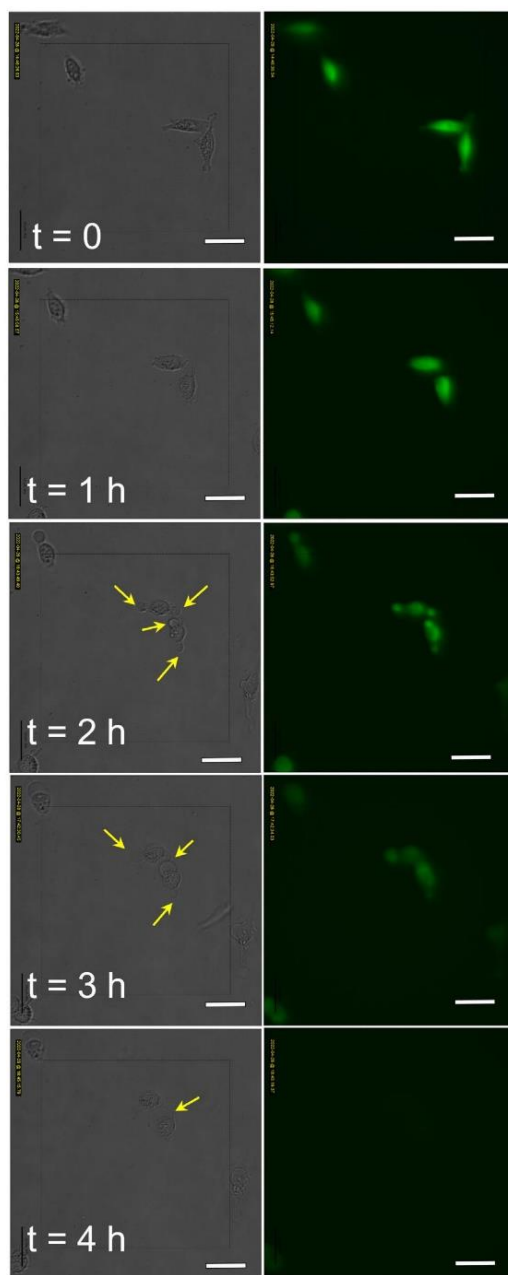


FIGURE 7 Fluorescence microscopy images of the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 expressing GFP. The images were taken at different times after treatment with VLP-GOx@HSA. The bubble-like formations are shown with yellow arrows. See the videos in the Supplementary information. Scale bar = 50 μ m. GFP, green fluorescent protein; GOx, glucose oxidase; HSA, human serum albumin; VLP, virus-like nanoparticle.

On the other hand, the cytotoxicity found in both tumor and healthy cells makes it extremely important to find more specific ligands for tumor cells avoiding cell internalization in healthy cells. VLP-based enzymatic nanoreactors have been functionalized with an estradiol derivative or folic acid to be recognized by estrogen or folate receptors, respectively, in breast tumor cells and effectively internalized.^[34,35,77] Other ligands for specific recognition in tumor cells such as monoclonal antibodies,^[78] peptides,^[79] aptamers,^[80] vitamins,^[81] and carbohydrates,^[82] among others^[83] have been studied. The targeting is crucial for triple-negative breast cancers that represent 15%–20% of all breast cancer cases, which are defined by low expression of the ER, progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor-2 (HER2).^[84] Nevertheless, these aggressive cancers are responsible for a greater proportion of metastatic cases and deaths.^[85]

5 | CONCLUSIONS

Self-assembly is a highly efficient procedure for active enzyme encapsulation. The VLP-encapsulated GOx enzyme showed significant catalytic activity. The nanoreactors containing GOx activity are entirely suitable for cytotoxicity generation in tumor cells. The HSA functionalization, reported as a strategy to improve selective cancer targeting, did not improve the tumor cell cytotoxicity of the VLP-GOx nanoreactors. Targeting the nanoreactors to tumor cells by more specific ligands seems crucial. Nevertheless, GOx-containing enzymatic nanoreactors seem to be an efficient alternative to improve the current cancer therapy. In vivo studies are envisaged to reinforce the effectiveness of this treatment strategy.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Pedro Gama: Formal analysis, investigation, methodology, writing – original draft, writing – review & editing. Patricia Juárez: Formal analysis, investigation, methodology, writing – review & editing. Ana G. Rodríguez-Hernández: Investigation, methodology. Rafael Vazquez-Duhalt: Conceptualization, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, resources, supervision, writing – review & editing.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been funded by UNAM (grant PAPIIT IN209722). The authors thank Dr. Oscar González Davis and Itandehui Betanzo for their technical assistance, and Francisco Ruiz Medina for TEM analysis.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no competing interests.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Additional data that support the findings of this study are available upon reasonable request from the corresponding authors.

REFERENCES

1. Arnold, M., Morgan, E., Rumgay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S., & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*, 66, 15–23.
2. Azamjah, N., Soltan-Zadeh, Y., & Zayeri, F. (2019). Global trend of breast cancer mortality rate: A 25-year study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20, 2015–2020.
3. International Agency for Research on Cancer. (2020). World Health Organization. Data source: <https://gco.iarc.fr/today/home>
4. Corben, A. D. (2013). Pathology of invasive breast disease. *Surgical Clinics of North America*, 93, 363–392.
5. Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment. *The Journal of the American Medical Association*, 321, 288–300.
6. Pearce, A., Haas, M., Viney, R., Pearson, S. A., Haywood, P., Brown, C., & Ward, R. (2017). Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. *PLoS ONE*, 12, e0184360.
7. Altun, I., & Sonkaya, A. (2018). The most common side effects experienced by patients were receiving first cycle of chemotherapy. *Iranian Journal of Public Health*, 47, 1218–1219.
8. Chauhan, K., Sengar, P., Juarez-Moreno, K., Hirata, G. A., & Vazquez-Duhalt, R. (2020). Camouflaged, activatable and therapeutic tandem bionanoreactors for breast cancer theranosis. *Journal of Colloid & Interface Science*, 580, 365–376.
9. Fu, X., Shi, Y., Qi, T., Qiu, S., Huang, Y., Zhao, X., Sun, Q., & Lin, G. (2020). Precise design strategies of nanomedicine for improving cancer therapeutic efficacy using subcellular targeting. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5, 262.
10. Tagde, P., Najda, A., Nagpal, K., Kulkarni, G. T., Shah, M., Ullah, O., Balant, S., & Rahman, M. H. (2022). Nanomedicine-based delivery strategies for breast cancer treatment and management. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 2856.
11. Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: Natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 927–938.
12. Mano, N. (2019). Engineering glucose oxidase for bioelectrochemical applications. *Bioelectrochemistry*, 128, 218–240.
13. Fu, L. H., Qi, C., Lin, J., & Huang, P. (2018). Catalytic chemistry of glucose oxidase in cancer diagnosis and treatment. *Chemical Society Reviews*, 47, 6454–6472.
14. Dinda, S., Sarkar, S., & Das, P. K. (2018). Glucose oxidase mediated targeted cancer-starving therapy by biotinylated self-assembled vesicles. *Chemical Communications*, 54, 9929–9932.
15. Feng, L., Xie, R., Wang, C., Gai, S., He, F., Yang, D., Yang, P., & Lin, J. (2018). Magnetic targeting, tumor microenvironment-responsive intelligent nanocatalysts for enhanced tumor ablation. *ACS Nano*, 12, 11000–11012.
16. Chang, K., Liu, Z., Fang, X., Chen, H., Men, X., Yuan, Y., Sun, K., Zhang, X., Yuan, Z., & Wu, C. (2017). Enhanced phototherapy by nanoparticle-enzyme via generation and photolysis of hydrogen peroxide. *Nano Letters*, 17, 4323–4329.
17. Fu, L. H., Qi, C., Hu, Y. R., Lin, J., & Huang, P. (2019). Glucose oxidase-instructed multimodal synergistic cancer therapy. *Advanced Materials*, 31, 1808325.
18. Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2012). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (Suppl.), 24–36.
19. Ding, X., Liu, D., Booth, G., Gao, W., & Lu, Y. (2018). Virus-like particle engineering: From rational design to versatile applications. *Biotechnology Journal*, 13, e1700324.
20. Koellhoffer, E. C., & Steinmetz, N. F. (2022). Cowpea mosaic virus and natural killer cell agonism for *in situ* cancer vaccination. *Nano Letters*, 22, 5348–5356.
21. Nkanga, C. I., & Steinmetz, N. F. (2021). The pharmacology of plant virus nanoparticles. *Virology*, 556, 39–61.
22. González-Davis, O., Villagrana-Escareño, M. V., Trujillo, M. A., Gama, P., Chauhan, K., & Vazquez-Duhalt, R. (2023). Virus-like nanoparticles as enzyme carriers for Enzyme Replacement Therapy (ERT). *Virology*, 580, 73–87.
23. Mejía-Méndez, J. L., Vazquez-Duhalt, R., Hernández, L. R., Sánchez-Arreola, E., & Bach, H. (2022). Virus-like particles: Fundamentals and biomedical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 8579.
24. Nooraei, S., Bahrulolom, H., Hoseini1, Z. S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A. J., & Ahmadian, G. (2021). Virus-like particles: Preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of Nanobiotechnology*, 9, 59.
25. Yu, X., Weng, Z., Zhao, Z., Xu, J., Qi, Z., & Liu, J. (2022). Assembly of protein cages for drug delivery. *Pharmaceutics*, 14, 2609.
26. Schoonen, L., & Van Hest, J. C. M. (2014). Functionalization of protein-based nanocages for drug delivery applications. *Nanoscale*, 6, 7124–7141.
27. Yan, D., Wei, Y. Q., Guo, H. C., & Sun, S. Q. (2015). The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 10415–10432.
28. Kraj, P., Selivanovitch, E., Lee, B., & Douglas, T. (2021). Polymer coatings on virus-like particle nanoreactors at low ionic strength – charge reversal and substrate access. *Biomacromolecules*, 22, 2107–2118.
29. Douglas, T., & Young, M. (2006). Viruses: Making friends with old foes. *Science*, 312, 873–875.
30. Jordan, P., Patterson, D., Saboda, K., Edwards, E., Miettinen, H., Basu, G., Thielges, M., & Douglas, T. (2016). Self-assembling biomolecular catalysts for hydrogen production. *Nature Chemistry*, 8, 179–185.
31. Chakraborti, S., Lin, T. Y., Glatt, S., & Heddl, J. G. (2020). Enzyme encapsulation by protein cages. *RSC Advances*, 10, 13293–13301.
32. Das, S., Zhao, L., Eloffson, K., & Finn, M. G. (2020). Enzyme stabilization by virus-like particles. *Biochemistry*, 59, 2870–2881.
33. Sánchez-Sánchez, L., Tapia-Moreno, A., Juárez-Moreno, K., Patterson, D. P., Cadena-Nava, R. D., Douglas, T., & Vazquez-Duhalt, R. (2015). Design of a VLP-nanovehicle for CYP450 enzymatic activity delivery. *Journal of Nanobiotechnology*, 13, 1–10.
34. Tapia-Moreno, A., Juárez-Moreno, K., González-Davis, O., Cadena-Nava, R. D., & Vazquez-Duhalt, R. (2017). Biocatalytic virus capsid as nanovehicle for enzymatic activation of Tamoxifen in tumor cells. *Biotechnology Journal*, 12, 1600706.
35. Chauhan, K., Hernández-Meza, J. M., Rodríguez-Hernández, A. G., Juárez-Moreno, K., Sengar, P., & Vazquez-Duhalt, R. (2018). Multifunctionalized biocatalytic P22 nanoreactor for combinatory treatment of ER+ breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 16, 17.
36. Schwarz, B., Uchida, M., & Douglas, T. (2017). Biomedical and catalytic opportunities of virus-like particles in nanotechnology. *Advances in Virus Research*, 97, 1–60.
37. Inoue, T., Kawano, M. A., Takahashi, R. U., 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. *Journal of Biotechnology*, 134, 181–92.
38. O’Neil, A., Prevelige, P. E., & Douglas, T. (2013). Stabilizing viral nano-reactors for nerve-agent degradation. *Biomaterials Science*, 1, 881–886.
39. Selivanovitch, E., LaFrance, B., & Douglas, T. (2021). Molecular exclusion limits for diffusion across a porous capsid. *Nature Communications*, 12, 2903.
40. Gama, P., Cadena-Nava, R. D., Juárez-Moreno, K., Pérez-Robles, J., & Vazquez-Duhalt, R. (2021). Virus-based nanoreactors with GALT activity for classic galactosemia therapy. *ChemMedChem*, 16, 1438.
41. Vervoort, D. F. M., Heiringhoff, R., Timmermans, S., Van Stevendaal, M., & Van Hest, J. C. M. (2021). Dual site-selective presentation of

- functional handles on protein-engineered Cowpea chlorotic mottle virus-like particles. *Bioconjugate Chemistry*, 32, 958–963.
42. Cadena-Nava, R. D., Comas-Garcia, M., Garmann, R. F., Rao, A. L. N., Knobler, C. M., & Gelbart, W. M. (2012). Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: Requirement for a specific high protein/RNA mass ratio. *Journal of Virology*, 86, 3318–3326.
 43. Zhou, C., Song, X., Guo, C., Tan, Y., Zhao, J., Yang, Q., Chen, D., Tan, T., Sun, X., Gong, T., & Zhang, Z. (2019). An alternative and injectable pre-formed albumin-bound anticancer drug delivery system for anticancer and antimetastasis treatment. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11, 42534–42548.
 44. Spada, A., Emami, J., Tuszyński, J. A., & Lavasanifar, A. (2021). The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 8(5), 1862–1894.
 45. Lucas, R. W., Larson, S. B., & McPherson, A. (2002). The crystallographic structure of brome mosaic virus. *Journal of Molecular Biology*, 317, 95–108.
 46. Brasch, M., Putri, R. M., De Ruiter, M. V., Luque, D., Koay, M. S. T., Castón, J. R., & Cornelissen, J. J. L. M. (2017). Assembling enzymatic cascade pathways inside virus-based nanocages using dual-tasking nucleic acid tags. *Journal of the American Chemistry Society*, 139, 1512–1519.
 47. Al-Barwani, F., Donaldson, B., Pelham, S. J., Young, S. L., & Ward, V. K. (2014). Antigen delivery by virus-like particles for immunotherapeutic vaccination. *Therapy Delivery*, 5, 1223–1240.
 48. Mohsen, M. O., Speiser, D. E., Knuth, A., & Bachmann, M. F. (2020). Virus-like particles for vaccination against cancer. *Wiley Interdisciplinary Review of Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12, 1579.
 49. Duval, K. E. A., Wagner, R. J., Beiss, V., Fiering, S. N., Steinmetz, N. F., & Hoopes, P. J. (2020). Cowpea mosaic virus nanoparticle enhancement of hypofractionated radiation in a B16 murine melanoma model. *Frontiers in Oncology*, 16, 594614.
 50. Beatty, P. H., & Lewis, J. D. (2019). Cowpea mosaic virus nanoparticles for cancer imaging and therapy. *Advances in Drug Delivery Review*, 145, 130–144.
 51. Patel, R., Czapar, A. E., Fiering, S., Oleinick, N. L., & Steinmetz, N. F. (2018). Radiation therapy combined with cowpea mosaic virus nanoparticle in situ vaccination initiates immune-mediated tumor regression. *ACS Omega*, 3, 3702–3707.
 52. Li, W., Jing, Z., Wang, S., Li, Q., Xing, Y., Shi, H., Li, S., & Hong, Z. (2021). P22 virus-like particles as an effective antigen delivery nanopatform for cancer immunotherapy. *Biomaterials*, 271, 120726.
 53. Sakai, C., Hosokawa, K., Watanabe, T., Suzuki, Y., Nakano, T., Ueda, K., & Fujimuro, M. (2021). Human hepatitis B virus-derived virus-like particle as a drug and DNA delivery carrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 581, 103–109.
 54. Hassanshahi, J., Hajializadeh, Z., Niknia, S., Mahmoodi, M., & Kaeidi, A. (2022). Anti-tumor effects of *Thymus Caramanicus* Jalas extract in mice through oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 74, 1797–1804.
 55. Glorieux, C., Dejeans, N., Sid, B., Beck, R., Buc Calderon, P., & Verrax, J. (2011). Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 82, 1384–1390.
 56. Huo, M., Wang, L., Chen, Y., & Shi, J. (2017). Tumor-selective catalytic nanomedicine by nanocatalyst delivery. *Nature Communications*, 8, 357.
 57. Zhao, W., Hu, J., & Gao, W. (2017). Glucose oxidase-polymer nanogels for synergistic cancer-starving and oxidation therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9, 23528–23535.
 58. Zhang, R., Feng, L., Dong, Z., Wang, L., Liang, C., Chen, J., Ma, Q., Zhang, R., Chen, Q., Wang, Y., & Liu, Z. (2018). Glucose & oxygen exhausting liposomes for combined cancer starvation and hypoxia-activated therapy. *Biomaterials*, 162, 123–131.
 59. Fan, W., Lu, N., Huang, P., Liu, Y., Yang, Z., Wang, S., Yu, G., Liu, Y., Hu, J., He, Q., Qu, J., Wang, T., & Chen, X. (2017). Glucose-responsive sequential generation of hydrogen peroxide and nitric oxide for synergistic cancer starving-like/gas therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 56, 1229–1233.
 60. Nuñez-Rivera, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodríguez-Hernandez, A. G., Vazquez-Duhalt, R., & Cadena-Nava, R. D. (2020). Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 372–382.
 61. Rempel, S. A., Golembieski, W. A., Ge, S., Lemke, N., Elisevich, K., Mikkelsen, T., & Gutiérrez, J. A. (1998). SPARC. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57, 1112–1121.
 62. Von Hoff, D. D., Ramanathan, R. K., Borad, M. J., Laheru, D. A., Smith, L. S., Wood, T. E., Korn, R. L., Desai, N., Trieu, V., Iglesias, J. L., Zhang, H., Soon-Shiong, P., Shi, T., Rajeshkumar, N. V., Maitra, A., & Hidalgo, M. (2011). Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: A phase I/II trial. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 4548–4554.
 63. Gamradt, P., De La Fouchardière, C., & Hennino, A. (2021). Stromal protein-mediated immune regulation in digestive cancers. *Cancers*, 13, 146.
 64. Sova, P., Feng, Q., Geiss, G., Wood, T., Strauss, R., Rudolf, V., Lieber, A., & Kiviat, N. (2006). Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15, 114–123.
 65. Bellahcène, A., & Castronovo, V. (1995). Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *American Journal of Pathology*, 146, 95–100.
 66. Lien, H. C., Hsiao, Y. H., Lin, Y. S., Yao, Y. T., Juan, H. F., Kuo, W. H., Hung, M., Chang, K. J., & Hsieh, F. J. (2007). Molecular signatures of metastatic carcinoma of the breast by large-scale transcriptional profiling: Identification of genes potentially related to epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*, 26, 7859–7871.
 67. Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Cossu, A., Reis-Filho, J. S., Fulford, L., Dexter, T., Davies, S., Bulmer, K., Ford, E., Parry, S., Budroni, M., Palmieri, G., Neville, A. M., O'Hare, M. J., & Lakhani, S. R. (2004). Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells. *Cancer Research*, 64, 3037–3045.
 68. Shi, S., Ma, H. Y., Han, X. Y., Sang, Y. Z., Yang, M. Y., & Zhang, Z.-G. (2022). Prognostic significance of SPARC expression in breast cancer: A meta-analysis and bioinformatics analysis. *BioMed Research International*, 2022, 8600419.
 69. Puolakkainen, P. A., Brekken, R. A., Muneer, S., & Sage, E. H. (2004). Enhanced growth of pancreatic tumors in SPARC-null mice is associated with decreased deposition of extracellular matrix and reduced tumor cell apoptosis. *Molecular Cancer Research*, 2, 215–224.
 70. Yiu, G. K., Chan, W. Y., Ng, S. W., Chan, P. S., Cheung, K. K., Berkowitz, R. S., & Mok, S. C. (2001). SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *American Journal of Pathology*, 159, 609–622.
 71. Yang, E., Kang, H. J., Koh, K. H., Rhee, H., Kim, N. K., & Kim, H. (2007). Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers. *The International Journal of Cancer*, 121, 567–575.
 72. Cheetham, S., Tang, M. J., Mesak, F., Kennecke, H., Owen, D., & Tai, I. T. (2008). SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2'-deoxycytidine to increase SPARC expression and improve therapy response. *British Journal of Cancer*, 98, 1810–1819.
 73. Tao, H., Wang, R., Sheng, W., & Zhen, Y. (2021). The development of human serum albumin-based drugs and relevant fusion proteins for cancer therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 24–34.
 74. Are, R. P., & Babu, A. R. (2022). Molecular interaction analysis of SPARC–collagen with human serum albumin. *Journal of Computational Biophysics and Chemistry*, 21, 927–939.

75. Iqbal, H., Yang, T., Li, T., Zhang, M., Ke, H., Ding, D., Deng, Y., & Chen, H. (2021). Serum protein-based nanoparticles for cancer diagnosis and treatment. *Journal of Controlled Release*, 329, 997–1022.
76. Chen, Q., Liang, C., Wang, X., He, J., Li, Y., & Liu, Z. (2014). An albumin-based theranostic nano-agent for dual-modal imaging guided photothermal therapy to inhibit lymphatic metastasis of cancer post surgery. *Biomaterials*, 35, 9355–9362.
77. Cheung, A., Bax, H. J., Josephs, D. H., Ilieva, K. M., Pellizzari, G., Opzoomer, J., Bloomfield, J., Fittall, M., Grigoriadis, A., Figini, M., Canevari, S., Spicer, J. F., Tutt, A. N., & Karagiannis, S. N. (2016). Targeting folate receptor alpha for cancer treatment. *Oncotarget*, 7, 52553–52574.
78. Kocbek, P., Obermajer, N., Cegnar, M., Kos, J., & Kristl, J. (2007). Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *Journal of Controlled Release*, 120, 18–26.
79. Hossein-Nejad-Ariani, H., Althagafi, E., & Kaur, K. (2019). Small peptide ligands for targeting EGFR in triple negative breast cancer cells. *Scientific Reports*, 25, 2723.
80. Camorani, S., Passariello, M., Agnello, L., Esposito, S., Collina, F., Cantile, M., Di Bonito, M., Ulasov, I. V., Fedele, M., Zannetti, A., De Lorenzo, C., & Cerchia, L. (2020). Aptamer targeted therapy potentiates immune checkpoint blockade in triple-negative breast cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 39, 180.
81. Welsh, J., Wietzke, J. A., Zinser, G. M., Byrne, B., Smith, K., & Narvaez, C. J. (2003). Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *Journal of Nutrition*, 133, 2425S–2433S.
82. Li, R., Peng, Y., Pu, Y., Zhao, Y., Nie, R., Guo, L., & Wu, Y. (2022). Fructose and biotin co-modified liposomes for dual-targeting breast cancer. *Journal of Liposome Research*, 32, 119–128.
83. Alqaraghuli, H. G. J., Kashanian, S., & Rafipour, R. (2019). A review on targeting nanoparticles for breast cancer. *Current Pharmacology and Biotechnology*, 20, 1087–1107.
84. Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 363, 1938–1948.
85. Fadare, O., & Tavassoli, F. A. (2008). Clinical and pathologic aspects of basal-like breast cancers. *Nature Clinical Practice Oncology*, 5, 149–159.

How to cite this article: Gama, P., Juárez, P., Rodríguez-Hernández, A. G., & Vazquez-Duhalt, R. (2023). Glucose oxidase virus-based nanoreactors for smart breast cancer therapy. *Biotechnology Journal*, 2300199. <https://doi.org/10.1002/biot.202300199>

Anexo 4

Colaboración en el artículo de revisión. “*Virus-like nanoparticles as enzyme carriers for Enzyme Replacement Therapy*” publicado en la revista indexada Virology (ERT).



Virus-like nanoparticles as enzyme carriers for Enzyme Replacement Therapy (ERT)

Oscar González-Davis^a, Maria V. Villagrana-Escareño^a, Mario A. Trujillo^b, Pedro Gama^a, Kanchan Chauhan^a, Rafael Vazquez-Duhalt^{a,*}

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

^b School of Medicine, Universidad Xochicalco, Ensenada, Baja California, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

ERT
Enzymatic nanoreactors
Lysosomal storage diseases
Nanomedicine
VLP

ABSTRACT

Enzyme replacement therapy (ERT) has been used to treat a few of the many existing diseases which are originated from the lack of, or low enzymatic activity. Exogenous enzymes are administered to contend with the enzymatic activity deficiency. Enzymatic nanoreactors based on the enzyme encapsulation inside of virus-like particles (VLPs) appear as an interesting alternative for ERT. VLPs are excellent delivery vehicles for therapeutic enzymes as they are biodegradable, uniformly organized, and porous nanostructures that transport and could protect the biocatalyst from the external environment without much affecting the bioactivity. Consequently, significant efforts have been made in the production processes of virus-based enzymatic nanoreactors and their functionalization, which are critically reviewed. The use of virus-based enzymatic nanoreactors for the treatment of lysosomal storage diseases such as Gaucher, Fabry, and Pompe diseases, as well as potential therapies for galactosemia, and Hurler and Hunter syndromes are discussed.

1. Introduction

Nanomedicine is emerging with new strategies for medical applications (Riehemann et al., 2009). The introduction of nanomaterials is now a great activity to improve biomedical processes and current therapies. Nanotechnology can improve drug delivery with the possibility to target the drug nanocarriers to specific cells and tissues avoiding systemic treatments. These “smart” treatments will reduce the doses needed and make medication more efficient (Mitchell et al., 2021). The improvement of medical imaging, both optical and magnetic (Cormode et al., 2009); tissue reconstruction (Zheng et al., 2021); and biosensing (Vashist et al., 2012) are among procedures that have demonstrated the advantages of nanoparticles for nanomedicine applications.

Enzyme deficiency disorders are a diverse group of diseases originated from the lack or low enzymatic activity inducing, in many cases, drastic metabolic effects. Most of these illnesses are due to hereditary mutations in specific genes encoding these enzymes. In addition to

palliative treatments and the potential use of gene therapy, Enzyme Replacement Therapy (ERT) is a useful therapeutic strategy for these metabolic diseases (Desnick and Schuchman, 2012; Li, 2018; Marchetti et al., 2022).

Enzyme replacement therapy supplies exogenous enzymes to compensate for the lack of endogenous enzymatic activity, and it is widely used for a limited number of illnesses (Marchetti et al., 2022). Nevertheless, ERT has some limitations, dangers, and challenges: i) the administration of foreign proteins to the body represents a danger of severe immunological responses, ii) the exogenous protein degradation by endogenous proteases reduces the treatment efficiency and increases the doses needed, iii) finally, systemic administration increases the doses and could induce side effects due to the presence of enzymes in healthy tissues.

In this work, the use of virus-like particles (VLPs) as enzyme nanocarriers for the ERT is reviewed and discussed (Fig. 1). The VLPs seem to be perfect nanocarriers for biomedical applications because they are protein self-assembling hollow cages that can contain highly

Abbreviations: ADA, Adenosine deamidase; BMV, Brome mosaic virus; CCMV, Cowpea chlorotic mottle virus; CP, Coat protein; CYP, Cytochrome P450; EPT, Enzyme prodrg therapy; ERT, Enzyme replacement therapy; GAA, Acid alpha glucosidase; GALT, Galactose-1-phosphaphate urinydyl transferase; GFP, Green fluorescent protein; HSCT, Hematopoietic stem cell transplantation; IEM, Inborn errors of metabolism; PEG, Poly(ethylene glycol); VLP, Virus-like particle.

* Corresponding author.

E-mail address: rvd@ens.cnyn.unam.mx (R. Vazquez-Duhalt).

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.01.017>

Received 31 August 2022; Received in revised form 20 January 2023; Accepted 30 January 2023

Available online 4 February 2023

0042-6822/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

concentrated enzymatic activity (Chauhan et al., 2021). The porous structure of VLPs allows the entrance of substrates (metabolites) and the exit of products. In addition, the presence of reactive groups on the VLPs surface facilitates the surface functionalization with specific ligands to be recognized by specific cell receptors to target the treatment avoiding systemic circulation (Tapia-Moreno et al., 2017; Chauhan et al., 2018, 2022). Moreover, the VLP surface could also be covered by non-immunogenic polymers or proteins to make the enzymatic nanoparticles stealth to the immune system (Crooke et al., 2019). These features also make VLP-nanoreactors a potential candidate for metabolic prodrug activation to a pharmacologically active drug, also called enzyme prodrug therapy (EPT). Thus, the biocatalysts could be specifically delivered to the tumor cells increasing the on-site drug activation lowering the drug-associated side effects, and increasing the treatment efficiency.

2. Enzyme replacement therapy for diseases originated by the lack of enzyme activity

Inborn errors of metabolism (IEM) are the most common enzymatic deficiency disorders, mainly originated from inherited recessive mutations (Arnold, 2018). The enzymatic deficiency compromises the metabolism interfering with the metabolic pathways. The IEM induce the accumulation of toxic metabolites or deficient production of essential compounds. The most common clinical therapies for IEM disorders are organ or tissue transplantation, gene therapy, and ERT (Vernon, 2015). Today, ERT is widely used to treat IEM disorders which are reviewed below.

2.1. Lysosomal storage diseases

Lysosomal storage diseases due to IEM induce a lack of or low enzyme activity in the lysosomal compartment responsible for the degradation of complex molecules (Fig. 2). Periodic intravenous heterologous-enzyme administration as ERT is the most common available therapy for several lysosomal storage disorders (Concolino et al., 2018). An earlier ERT is better for the prognosis and could even be preventive (Desnick and Schuchman, 2012). Several lysosomal storage diseases, such as Sphingolipidoses, Pompe disease, and Mucopolysaccharidoses have been treated by ERT.

2.1.1. Sphingolipidoses

Sphingolipidose lysosomal storage disease results from the lack of or lower enzyme activity of sphingolipid catabolism. This catabolic

deficiency leads to an accumulation of pathologic cellular inclusions and cell damage, ultimately resulting in cell death. Three kinds of cell inclusions derived from a ceramide are important: sphingomyelin with phosphorylcholine as a hydrophilic group; cerebroside with a galactose or glucose residue; and ganglioside with a sialic acid group binding to the ceramide by an oligosaccharide chain. Gaucher and Fabry diseases are common sphingolipidose and are typically treated by ERT (Platt et al., 2018).

2.1.1.1. Gaucher disease. Gaucher disease is the most common lysosomal lipid storage disease and is transmitted in an autosomal recessive manner. Specific populations, especially those with Ashkenazi Jewish descendants, are at particular risk (one in 800 live births), while the National Gaucher Foundation (United States) estimates the incidence of Gaucher's disease to be about one in 60,000 live births (Beutler et al., 1991; Stirnemann et al., 2017). Gaucher's disease originates from a deficiency of β -glucocerebrosidase activity that leads to an accumulation of glucocerebroside. The clinical features vary depending on the specific subtype of the disease; nonetheless, all subtypes share the following features: hepatosplenomegaly, bone crises, osteoporosis, avascular necrosis of the femur, blood abnormalities such as anemia, thrombocytopenia, pancytopenia, as well some pulmonary manifestations, and finally growth delays.

Gaucher disease is successfully treated by ERT (Grabowski et al., 1998), and the treatment involves the supply of exogenous mannose-functionalized glucocerebrosidase (Gcase). However, due to the lower stability of the enzyme in the blood, periodic intravenous administration is necessary to achieve good efficiency in therapy, which adds to the high cost of the treatment. A conventional ERT needs 60 U/kg, equivalent to \$ 14,700 USD per shot. Thus, a treatment costs around \$ 352,800 USD a year (Tekoah et al., 2013). In addition, the treatment should be for life; therefore, the exceptionally high cost limits its use, even if treatment with ERT provides health benefits to patients. Recently, our group encapsulated the commercial Gcase in plant-based VLPs, which has improved the stability of the enzyme by 11-fold. It may improve the blood circulation half-life of the enzyme and reduce the cost of treatment to some extent (Chauhan et al., 2022).

2.1.1.2. Fabry disease. Fabry disease is an X-linked recessive inherited disease; typical onset is found in boys during childhood but may also appear in 60–80-year-old adults. Reported incidences range from one in 117,000 to one in 476,000 in the general population. Fabry disease is due to the deficiency of α -galactosidase A, which leads to an accumulation of ceramide trihexoside inclusions in the endothelium, organs

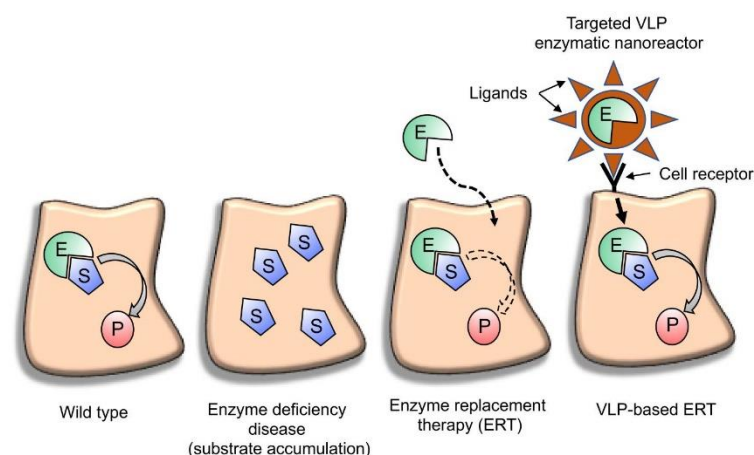


Fig. 1. Enzyme replacement therapy (ERT). Normal cells (wild type) are able to transform a specific metabolite. An enzymatic deficiency, as consequence of inborn errors of metabolism (IEM) from inherited recessive mutations, induces a cell metabolite accumulation. The enzyme replacement treatment consists in the exogenous enzyme administration. Virus-like particles (VLPs) can be used as enzyme nanocarriers. Advantages of VLP-based ERT are protection of the enzyme from protease degradation, targeting to the specific cells and tissues targeting, and reduced immunogenicity.

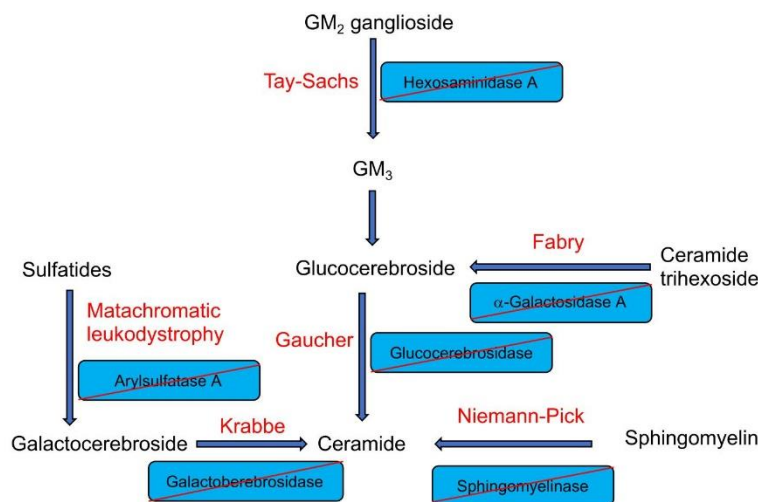


Fig. 2. Lysosomal storage disorders. Metabolite transformation pathway showing the enzyme deficiency (blue squares) and the names of the diseases (red).

epithelium, smooth muscle cells, and compromising the organ systems. The Fabry disease diagnoses are divided into two groups: early and late symptoms. The early symptoms show periodical dysesthesia in hands and feet due to small fiber neuropathy, producing burning pain (Fabry crises), anhidrosis or hypohidrosis, and angiokeratomas. Other early symptoms include nonspecific gastrointestinal disturbances, corneal clouding, and cataracts. The late symptoms are cardiomyopathy, cerebrovascular lesions, such as transient ischemic attack and stroke, and Fabry nephropathy causing progressive renal failure.

ERT is a current treatment for Fabry disease via the administration of the recombinant α -galactosidase A (Alegra et al., 2012). However, the administered α -galactosidase A can be inhibited by high lyso-globotriaosylceramide levels in some patients (Lenders et al., 2016), compromising the ERT treatment. On the other hand, migalastat, an oral pharmacologic chaperone, is used to stabilize GLA gene-specific mutations, avoiding α -galactosidase A folding errors and restoring enzyme activity (Germain et al., 2016).

2.1.2. Pompe disease

Pompe disease, also known as acid maltase deficiency or glycogen storage disease type II (GSD II), is a rare and often fatal muscle disease caused by a deficiency of the lysosomal hydrolase acid α -glucosidase (GAA). The disease affects approximately 1 in 13,000. The GAA deficiency results in lysosomal glycogen accumulation, leading to progressive disruption of cellular function, especially in smooth, cardiac, and skeletal muscle cells. To date, ERT with intravenous administration of recombinant human GAA, α -glucosidase alfa (Myozyme and Lumizyme, Sanofi Genzyme), is the only approved treatment for Pompe disease (Xu et al., 2019).

2.1.3. Mucopolysaccharidoses

Mucopolysaccharidoses are a group of metabolic disorders that result in the impaired breakdown of glycosaminoglycans (previously known as mucopolysaccharides) due to mutations in lysosomal enzymes. At least nine different types of mucopolysaccharidosis have been identified. Hurler syndrome and Hunter syndromes are the two most common conditions (Wolf et al., 2015). Hurler syndrome or mucopolysaccharidosis type I is an autosomal recessive mutation caused by the deficiency of α -L-iduronidase. In contrast, Hunter syndrome or mucopolysaccharidosis type II is an X-linked resistive deficiency of iduronate-2-sulfatase. Both induce the accumulation of glycosaminoglycans, i.e., heparan

sulfate and dermatan sulfate. The clinical features in both conditions (typically milder in Hunter syndrome) include a developmental delay, and facial dysmorphism: frontal bossing, elongated skull, flattened nasal bridge, broad nasal tip, thickened gingiva, anteverted nostrils, constant nasal discharge, spaced and protruded eyes, airway obstruction, and hepatosplenomegaly. In addition, Hurler syndrome shows corneal clouding, failure to thrive, dysostosis multiplex, and inguinal hernia, while Hunter syndrome also includes aggressive behavior, hyperactivity, no corneal clouding, pearly papules, and carpal tunnel syndrome. In both cases, the treatments are symptomatic and palliative, ERT, or bone marrow transplantation.

Enzyme replacement therapy with Laronidase (human recombinant α -L-iduronidase) infusions has been approved for Hurler syndrome and combined with hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), is a feasible and relatively safe treatment to reduce syndrome complications (Grewal et al., 2005; Cox-Brinkman et al., 2006). On the other hand, since 2006, a commercial recombinant human I2S idursulfase for intravenous ERT has been approved and available for Hunter syndrome in the United States and Europe, among other countries. Moreover, combined with ERT, HSCT has been used to treat the severe form of Hurler syndrome (Muenzer et al., 2012).

2.2. Adenosine deaminase (ADA)-Deficient severe combined immunodeficiency (SCID)

Mutations in ADA lead to deficient or absent activity of one of the essential enzymes in the purine salvage pathways, which leads to severe combined immune deficiency. This deficiency causes the accumulation of adenosine deaminase within the lymphocytes leading to a disease phenotype with various complications, such as severe lymphocytopenia affecting T and B-lymphocytes and NK cells, sensorineural deafness, neurodevelopmental defects, and skeletal abnormalities. This disease can be fatal if left undiagnosed and untreated from childhood. ERT using the bovine intestinal adenosine deaminase enzyme conjugated with polyethylene glycol has been one of the primary therapeutic procedures for the disease (Flinn and Gennery, 2018). However, even if an existing ERT is available in the market for this disease, it is not the standard treatment due to the limitations that ERT implies.

2.3. Galactosemia

Galactosemia is a group of recessive autosomal hereditary diseases that involve errors in the Leloir pathway or galactose metabolic pathway (Anderson, 2018). Three enzymes are involved in the Leloir pathway to convert galactose to glucose: galactose kinase (GALK), galactose-1-phosphate uridylyl-transferase (GALT), and UDP-glucose 4-epimerase (GALE) (Demirbas et al., 2018). A deficiency of one of these enzymes causes a subgroup of galactosemia, the most common subgroup is the Classic Galactosemia due to GALT gene mutations. Classic galactosemia incidence varies according to region, from 1:16,500 in Ireland to 1:1,000,000 in Japan. The Global incidence has been estimated at 1:62,000 live births (Levy and Hammersen, 1978).

GALT enzyme catalyzes the transfer of the uridine diphosphate group (UDP) from UDP-glucose to galactose 1-phosphate, generating glucose-1-phosphate and UDP-galactose. The GALT deficiency produces a galactose-1-phosphate accumulation in the organism resulting in galactitol and galactonate production, which are toxic molecules (Coelho et al., 2017). Important diagnoses such as mental neurological and motor disorders, hypergonadotropic hypergonadotropism, osteopenia and osteoporosis, hepatomegaly, early age cataracts; retarded growth, liver and kidney failure, and cirrhosis, among others, are attributed to Classic Galactosemia (Delnoy et al., 2021). The current treatment for GALT deficiency is a lactose-restricted diet. Today, novel therapeutic strategies are being explored: the upstream inhibition of the Leloir pathway to reduce galactose-1-phosphate intoxication (Tang et al., 2012); the use of the antisense therapy for functional correction of a splicing mutation in the GALT gene (Coelho et al., 2015); and recently the use of GALT-nanoreactors (Gama et al., 2021).

2.4. Exocrine pancreatic insufficiency

Inadequate production and activity of pancreatic digestive enzymes and juices can lead to reduced quality of life and lead to lethal complications. The most common complications include steatorrhea, weight loss, and problems with digestion and absorption. The replacement of pancreatic enzymes can produce a broad spectrum of diseases that can cause symptoms some are genetic (e.g., cystic fibrosis), and others are acquired (e.g., autoimmune pancreatitis). Creon (pancrelipase delayed-release capsules), Zenpep (pancrelipase delayed-release capsules), and Pancreaze (pancrelipase delayed-release capsules) are three enteric-coated oral enzyme preparations that are approved for the treatment of exocrine pancreatic insufficiency (Wynne et al., 2019).

2.5. Hyperuricemia

The elevation in serum urea levels is termed hyperuricemia. Hyperuricemia is related to various conditions, including metabolic syndrome, diabetes, hypertension, kidney disorders, cardiovascular diseases, and, most importantly, gout. Recombinant Urate oxidase is a widely used therapy for hyperuricemia. Pegloticase is a recently approved commercial preparation of the pegylated recombinant urate oxidase that catalyzes the oxidation of urate to allantoin. Allantoin is more soluble and can be easily excreted (Schlesinger et al., 2011), decreasing the toxic metabolite levels in serum.

3. VLPs production, assembly process, and geometry

3.1. Protein production

The assembly of the viral structural proteins into organized macromolecular structures (capsids) generates viral “empty shells” known as virus-like particles (VLPs). There are two main procedures for the production of VLPs. One is obtaining the protein directly from the virus in their host, which can be bacteria (Sánchez-Sánchez et al., 2015; Caldeira and Peabody, 2011; Servid et al., 2013), plants (Santi et al., 2006;

Cadena-Nava et al., 2012; Villagrana-Escareño et al., 2019; Nuñez-Rivera et al., 2020), or even from animals (Thrane et al., 2015; Whitacre et al., 2009). Another method is the use of prokaryotic and eukaryotic heterologous expression systems of recombinant proteins (Zeltins, 2013; Effio and Hubbuch, 2015) using bacteria, yeast, insects, or cell cultures (Kushnir et al., 2012; Fuenmayor et al., 2017) (Fig. 3).

When the VLPs are produced from native virus particles, it is necessary to perform a purification process to eliminate the viral genome. This process is generally carried out by disassembling the virus under certain pH, ionic strength, and temperature conditions. Then, the coat protein can be assembled in the presence of different cargoes under specific conditions.

3.2. Assembly process

So far, a large diversity of viruses is known. They are classified according to their genome or according to their assembly process. As mentioned above, VLPs can be produced in native and non-native hosts. VLPs are generally assembled the same way native viruses are made (Douglas and Young, 2006; Aumiller et al., 2018; Perlmutter et al., 2016). However, the assembly can be modulated by the presence of an organic or inorganic template inducing morphological changes (spherical or tubular structures) (Mukherjee et al., 2006; Xu et al., 2008). In the case of viruses, the genome required for host infectivity and virus replication is internalized in the capsid. It is generally accepted that the interaction between the positively charged binding domain of coat proteins and the negatively charged RNA drives the capsid assembly under physiological conditions (Garmann et al., 2014). The formation of virus capsids from coat protein subunits is an extraordinary example of molecular self-assembly. The process has been perfected, resulting in a delicate balance between structural stability and functional dynamics (Brunk and Twarock, 2021). Depending on the VLP system, the assembly process could be by non-templated, scaffolding protein-assisted assembly, or viral genome-assisted assembly. The VLP assembly can be also assisted by chaperones (Chromy et al., 2003). Electrostatic interactions are the most important interaction between capsid and cargo. For example, coat proteins from CCMV and BMV have a basic N-terminus, which electrostatically interacts with negatively charged RNA cargoes (Johnson et al., 2004; Garmann et al., 2022). Thus, the assembly can be also assisted by exogenous cargoes, especially when they are negatively charged (Minten et al., 2011b).

In the case of some viruses with a relatively simple structure, the VLP capsid can self-assemble without the help of auxiliary proteins and viral nucleic acid (Mateu, 2013a). This assembly of the capsid without internal cargo can be obtained under certain conditions like pH, ionic strength, or concentration, in which the interactions between the coat protein monomers are crucial (Reguera et al., 2004; Lavelle et al., 2009; Vega-Acosta et al., 2014; Duran-Meza et al., 2021). These short-ranged interactions are directionally specific as imposed by electrostatic, van der Waals, and hydrogen bonding interactions (Kegel and Van Der Schoot, 2006). *In vitro* VLP assembly could also be obtained by changing parameters such as temperature, pH, ionic strength, concentration, and charge of the cargo (Bertolotti-Ciarlet et al., 2002; Mellado et al., 2009; Samandoulgou et al., 2015, 2021; Uchida et al., 2022). *In vitro* VLP assembly can also be achieved through a method based on the critical assembly concentration of the capsid protein (Zlotnick, 1994; Li et al., 2019).

In the case of structurally complex VLPs, the correct assembly of the capsid often requires the help of scaffolding proteins (SP), both *in vivo* and *in vitro* (Mateu, 2013b; Perlmutter et al., 2016). Scaffolding proteins (SP) are required to catalyze, regulate, or modulate some assembly steps. In viruses, scaffolding proteins associate specifically with the nascent protein complex but are subsequently removed and are absent from the mature structure. This process happens mainly in complex viruses. These proteins can act as molecular chaperones, avoid possible kinetic traps during assembly, and favor the productive assembly

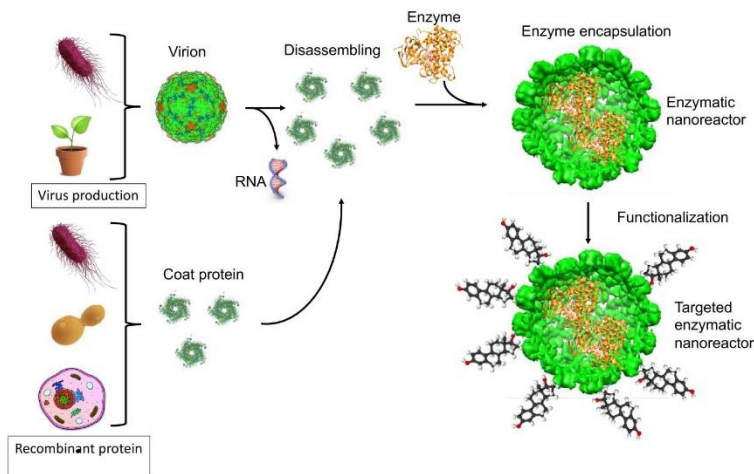


Fig. 3. Schematic process of enzymatic nanoreactor production. The coat proteins can be obtained by (a) host infection and virion disassembly to remove genetic material or (b) by recombinant protein expression. The enzyme is encapsulated inside the capsid, and then the surface of nanoreactor could be functionalized with specific ligands to target the nanoreactor to specific cells or tissues.

pathway over other pathways that can lead to aberrant particles. Scafolding proteins are common in bacteriophages like the P22 virus, in which procapsids are obtained both *in vivo* and *in vitro* from capsid proteins and SP. The P22 bacteriophage assembly starts forming a procapsid, templated by an SP, which interacts with the coat protein to direct assembly where the SP is encapsulated within the procapsid (Fuller and King, 1982; Prevelige et al., 1993; Padilla-Meier et al., 2012; Cortines et al., 2011).

3.3. VLP geometrical diversity

Assembled VLPs can show a similar geometry to the native virus, which is presumed to have the conformational arrangement with the lowest energy. However, different lengths of DNA cargoes can create virus-like structures of various shapes and sizes under physiological conditions. Increasing the length of the ssDNA caused an apparent increase in the particle diameter (de Ruiter et al., 2019). For the dsDNA encapsulation, the addition of the magnesium ions to the assembly buffer reduced the length of the formed rod-like structures and resulted in lengths corresponding to the stretched dsDNA template length. Spherical VLPs have capsids with icosahedral symmetry, which symmetrical structures have been well studied (Natarajan et al., 2005).

In cylindrical or helical viruses, such as the well-studied tobacco mosaic virus, the capsomeres, which are of a single type, fit into a helical structure around a central axis containing a single helix of nucleic acid, usually single-stranded RNA and less frequently single-stranded DNA, which it binds by the interaction between its negative charge and the positive charge of the protein (Stubbs and Kendall, 2012). As the nucleic acid template is essential for the assembly, there is no information available on empty or endogenous cargo containing VLPs from this type of virus.

Complex viruses, such as most of the bacteriophages, with slight variants, show the following general structure: an icosahedral head that houses the nucleic acid, with a tail with a helical structure that forms a hollow cylinder, a collar of capsomeres between the head and the tail, and a basal plate. At the end of the tail, it has anchor points that serve to fix the virus to the cell membrane. Protein fibers also come out of the plaque, which help with virus fixation on the host cell. The process of VLP production from complex bacteriophages is well known (Zeltins, 2013; Patterson et al., 2012).

4. Stability of VLPs

The physical properties of VLPs vary depending on the system and can be significantly different. Some virus-like particles are physicochemically stable nanoparticles, a property that critically contributes to their potential use in the biomedical field (Nooraei et al., 2021). However, although viruses are very stable multimeric structures, the lack of a viral genome in VLPs can make them unstable under changing conditions, particularly during purification and storage. Therefore, maintaining their integrity is very important, as a decrease in conformational stability could affect their cargo rendering them less effective.

As mentioned above, different forces are involved in the VLPs' integrity. Physicochemical parameters such as pH and ionic strength can stabilize or destabilize the VLP capsids, affecting the aqueous envelope of proteins and the surface electrical charge due to the protonation state of the acidic and basic groups of amino acid side chains. The alteration of the surface charge could eliminate the electrostatic interactions that stabilize the tertiary structure and often cause protein precipitation. The protein solubility is minimal at its isoelectric point since its net charge is zero. That is, there are equal numbers of negative and positive charges, which results, on the one hand, in a possible attraction between proteins, and on the other hand, in the disappearance of any electrostatic repulsive force that might hinder the formation of aggregates.

The solubility of a protein generally increases with salt concentration. The "salting in" is the phenomenon by which the concentration of salt increases the solubility of the protein. However, if the ionic strength increases too much, protein solubility decreases (Dahal and Schmit, 2018). This phenomenon is known as "salting out". This phenomenon is basically due to competition between salt ions and protein for the water molecules, which are part of the solvation shell. An increase in the ionic strength of the medium also causes a decrease in the degree of hydration of the ionic groups on the protein surface. As a result, these solutes compete for water by inhibiting the dissociation of acid or amino groups of the protein and thus, decreasing its solubility.

The pH affects the capsid-protein charge, salt interaction with charges on the protein surface, influences the water shell, and disfavors hydrophobic exposure (Le and Müller, 2021). Most *in vitro* VLP assembly reactions are optimized at a physiological pH. However, some particles require acidic or alkaline conditions to assemble. For example, CCMV protein attraction during assembly is optimal at about pH 5 and

decreases sharply with increasing pH (Johnson et al., 2005). However, once assembled, VLPs are stable between pH 4 and 7.5 with low ionic strength (Fox et al., 1998). Norwalk virus VLPs is highly stable over a pH range of 3–7 (Ausar et al., 2006). On the other hand, adeno-associated virus serotype 2 (AAV2) requires an alkaline pH (pH 9) to avoid aggregates and promote VLP formation (Le et al., 2019). Once assembled, most particles are stable at or near physiological pH.

In addition to electrostatic interactions between the coat protein monomers, disulfide bonds to covalently cross-link the monomers are present in some of the most robust viruses. The effect of these covalent bonds on VLP stability varies according to the location and number of disulfide bonds and can significantly increase thermal stability (Bundy and Swartz, 2011). The number and location of disulfide bonds in the coat protein monomers can be engineered in order to control the VLP assembly more strictly and stabilize the resulting VLPs (Xu et al., 2020). The possibility to modulate the VLP stability would be advantageous for most applications. For enzymatic nanoreactors, the ability to control VLP stability by changing the redox potential could be used for sensing and enzyme delivery where the VLP would be more prone to disassemble once it enters the relatively reductive cytosol.

4.1. Thermostability

The increase in thermal energy, associated with an increase in temperature, destroys weak interactions, disrupts protein structure, and induces the hydrophobic interior's interaction with the aqueous medium, leading to the aggregation and precipitation of denatured proteins. Generally, lower temperatures usually are favorable for capsid assembly, as they reduce protein aggregation and chemical degradation. However, reports of optimal capsid formation at near-physiological temperatures have also been published (Jaballah et al., 2017). In some cases, VLPs have been modified to improve particle thermostability. As mentioned above, the introduction of disulfide bonds that crosslink the monomers increase the VLP thermostability (Bundy and Swartz, 2011; Xu et al., 2020). Another common technique is the introduction of stabilizing mutations, as in the case of poliovirus type 3 VLPs (Marsian et al., 2017). Stabilizing mutations on the coat protein resulted in VLPs that were more stable than the wild-type ones. A temperature increase can cause favorable structural transitions drastically affecting the internal volume and capsid porosity as in the case of bacteriophage P22. Teschke et al. (2003) demonstrated that a 10 min temperature increase to 65 °C generated expanded variants which increased the internal volume from 58,000 nm³ to 113,000 nm³. Furthermore, increasing the temperature to 75 °C caused some subunits to separate and create 10 nm pores allowing for better access to the capsid interior.

Storage temperature also affects the conformation of VLPs; thus, the incorporation of protective molecules into the buffer is often critical for VLP stabilization and integrity. Kissmann et al. (2008) and Peixoto et al. (2007) reported that trehalose, sucrose, and glycerol enhance the stability of Norwalk and rotavirus VLPs, respectively. Lynch et al. (2012) found that sorbitol and sucrose were ineffective in retaining HIV-1 Pr55gag VLP stability and conformation; however, 15% trehalose was highly effective in stabilizing the VLPs for at least 1 year at –70 °C withstanding up to 2 freeze-thaw cycles. There is significant variability in the thermal stability of different viruses. Icosahedral viruses tend to be stable, losing little infectivity after several hours at 37 °C. Enveloped viruses are much more heat labile, with their titers declining rapidly at 37 °C. In general, the infectivity of viruses is destroyed by temperatures of 50–60 °C for 30 min, although there are notable exceptions (hepatitis B virus, polyomavirus) (Fooks et al., 2009).

No relation between viral structure and thermal stability was found (Tuladhar et al., 2012). Thermostability studies of two representatives of the Picornaviridae (poliovirus and parechovirus) showed very different thermostabilities, in which the nonenveloped adenovirus was less thermostable than the enveloped and larger influenza virus (Tuladhar et al., 2012). Another study analyzed the stability of VLPs having one or

more mutations (Hartman et al., 2019). The authors generated and characterized a 6615-member library of one- and two-amino acid mutations in the highly mutable FG loop of the MS2 coat protein. The library was subjected to multiple selections, initially for capsid assembly, followed by thermal and pH stability. This epistasis study represents an effort to tailor and engineer virus-like particles in a variety of non-native contexts.

5. Biodistribution and immune responses

Although great advances have been made in designing the *in vivo* properties of VLPs, most of these nanoparticles still suffer rapid clearance from the body due to the reticuloendothelial system comprising the liver and spleen. The typical size range of VLPs predisposes them to travel into lymphatic circulation and promotes uptake by nonspecific antigen-presenting cells such as dendritic cells and macrophages. With little modification, some VLPs are already targeted to specific cell types and organs such as lymphoid tissues (Manolova et al., 2008).

VLPs from pathogenic viruses have served as polyvalent antigens in prophylactic vaccines as they maintain the authentic presentation of conformational antigens by preserving the native structure of the infectious virus and thus, interact with the immune system similar to their parental pathogens, inducing not only humoral but also a cellular response (Naskalska and Pyrc, 2015; Noad and Roy, 2003; Schwarz and Douglas, 2015). As exogenous antigens, they are efficiently taken up by professional antigen-presenting cells, particularly dendritic cells, followed by MHC class II molecules presentation, leading to stimulation of CD4⁺ T helper cells. On the other hand, VLPs are also processed in the cytosol of dendritic cells as endogenous antigens and presented by MHC class I molecules to cytotoxic CD 8⁺ T cells (Grgacic and Anderson, 2006; Groothuis and Neeffjes, 2006; Naskalska and Pyrc, 2015).

The fact that these technologies are derived from a variety of biological sources has raised concerns about the potential for harmful immune responses. In addition, the usefulness of VLPs as stimulators of the immune system can cause drawbacks when using this system as a nanovehicle. In response to these concerns much focus has been placed on masking the immune response and creating biologically invisible particles through PEGylation and alternative surface functionalization, thus, delaying systemic clearance and mitigating immunogenicity (Schwarz and Douglas, 2015).

6. Loading capacity

VLPs have three interfaces available to be manipulated either chemically or genetically: the outer surface, the interface between protein subunits, and the inner face (Douglas and Young, 2006). The latter has been used to encapsulate various materials such as metals (Hooker et al., 2007; Durán-Meza et al., 2020; Chen et al., 2006), drugs (Ren et al., 2007), DNA (Verma and Weitzman, 2005), and proteins (Lipin et al., 2008) to generate new materials, catalysts, and supply systems. Protein encapsulation has focused primarily on introducing fluorescent proteins into protein nanostructures, with the green fluorescent protein (GFP) being the most widely used model due to its easy detection (Günther et al., 2001; Abbing et al., 2004; Minten et al., 2010; O'Neil et al., 2012; Villagrana-Escareño et al., 2019).

VLPs are small nanoparticles with finite volume, in which the actual number of enzyme molecules per nanoparticle could be low, but because of the high confinement is translated into high molar concentrations. The reported internal enzyme concentrations, from the limited number of VLP systems in which the enzyme concentration is known, vary from 0.14 to 5.74 mM (Table 1), representing a few to a hundred enzyme molecules per virus capsid. These concentrations are far higher than those usually assayed in the lab with non-encapsulated and free enzymes. This high enzyme concentration in nanoreactors affects the equilibrium, mainly when the enzyme concentration is much higher than the substrate concentration. Recently, we have discussed the

Table 1
Enzyme and protein confinement in different VLP-based enzymatic nanoreactors.

VLP Capsid diameter	Confined enzyme and molecular weight	Concentration of confined enzyme (mM)	Reference
Brome mosaic virus (BMV) 29.4 nm	Galactose-1-phosphate uridylyl transferase (GALT) β -glucocerebrosidase	3.7	Gama et al. (2021)
Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) 28 nm	Glucose oxidase 160 kDa	0.14	Chauhan et al., (2022)
	Glucose oxidase and glucokinase 160/43.4 kDa	0.28	Brasch et al., (2017)
	Horse radish peroxidase 44 kDa	0.14	Comellas-Aragonès et al., 2007
	Heme domain Cytochrome P450 54 kDa	4.9	Sánchez-Sánchez et al., (2014)
	Luciferase 62 kDa	1.16	Fiedler et al. (2018)
Bacteriophage Q β 28 nm	Heme domain cytochrome P450 71.5 kDa	3.14	Sánchez-Sánchez et al., (2015), Tapia-Moreno et al. (2017)
Bacteriophage P22 53.8 nm	Heme domain cytochrome P450 71.5 kDa	1.88	González-Davis et al., (2020)
	Green fluorescent protein 25 kDa	5.74	O'Neil et al., (2012)
	Red fluorescent protein 26 kDa	4.84	O'Neil et al., (2012)
	FRET pair (GFP/mCherry) 51 kDa	2.26	O'Neil et al., (2012)
	γ -glutamylcysteine 87.8 kDa	4.26	Wang et al., (2020)
	γ -glutamylcysteine + glutathione synthase 95.4 kDa	4.92	Wang et al., (2020)

catalytic considerations for highly confined enzymes, as in the case of VLP-based enzymatic nanoreactors (Chauhan et al., 2021). We mention three main conditions in VLP-confined enzymes that are different than those used in laboratory assays with diluted enzymes. First, a high enzyme concentration in the nanoparticle compartment does not fill the conditions for the well-known Michaelis-Menten kinetics. In addition, this molecular crowding of the encapsulated enzyme makes that not all active sites are solvent exposed and able to interact with the substrate molecules. This enzyme crowding could also affect the molecule mobility needed for catalytic activity. Finally, in the case of nanoreactors that preserve their integrity during the catalytic process, the substrate and product diffusion through the capsid pores limit the mass transfer. Thus, it appears that the kinetics for nano-sized enzymatic reactors differs from those for free and diluted components.

7. VLP-based enzymatic nanoreactors

Enzyme administration to the human body is limited due to their low half-life and instability, as well as by triggering an immune response. Therefore, enzyme encapsulation into VLPs is one of the most promising alternatives among the different strategies to overcome these boundaries. Furthermore, as discussed below, they can be modified to target specific cells (Koudelka et al., 2015). As mentioned before, VLPs are empty virus capsids, usually from bacteriophages or plant viruses, and their ability to enter mammalian cells without being able to replicate makes them a promising tool for therapeutic applications. Encapsulated enzymes inside VLPs are nanosized bioreactors. Through pores on the VLPs, substrates and products can easily enter and exit, and the inside of the VLPs acts as an isolated reaction chamber where multiple

reactions can occur in conjunction (Sánchez-Sánchez et al., 2014; Selivanovitch et al., 2021). Furthermore, they can be modified to target specific cells (Koudelka et al., 2015), as it is discussed below. There is a diversity of enzyme encapsulation strategies discussed below.

7.1. Enzyme encapsulation strategies

7.1.1. By complementary charges

To encapsulate negatively charged nucleic acids, virus capsids must have a positive charge in the interior. This charge complementarity has been used to encapsulate negatively charged enzymes, such as horseradish peroxidase (Comellas-Aragonès et al., 2007), cytochrome P450 (Sánchez-Sánchez et al., 2014), galactose-1-phosphate uridylyl-transferase (GALT) (Gama et al., 2021), and β -glucocerebrosidase (GCase) for the potential treatment of the Gaucher disease (Chauhan et al., 2022).

An osmolyte-mediated enzyme encapsulation was reported by Glasgow et al. (2012). Alkaline phosphatase from *E. coli* was encapsulated in a VLP derived from the bacteriophage MS2 with the aid of the osmolyte trimethylamine N-oxide (TMAO). MS2 coat protein dimers reassemble, randomly encapsulating the enzyme; however, encapsulation efficiency was low (<10%). Therefore, the authors added a large acidic peptide to the C-terminus of alkaline phosphatase, which resulted in an increased encapsulation efficiency.

The enzyme surface could be modified to increase the interaction with the interior of VLPs. Enzyme co-encapsulation was obtained by the chemical attachment of single- and complementary-stranded DNA tags to the exterior of chosen enzymes, resulting in negatively charged conjugates that induce the co-encapsulation inside cowpea chlorotic mottle virus CCMV capsids (Brasch et al., 2017). On the other hand, enzymatic nanoreactors containing the enzyme thymidine phosphorylase based on virus-like particles derived from the brome mosaic virus were designed and synthesized (Hernández González, 2021). The enzyme was functionalized with fluorescein isothiocyanate (FITC) with a dual purpose, improving the negative surface charge of TP and the enzyme loading, and monitoring the mito-direction of the capsids by confocal microscopy.

7.1.2. By directed linker

A directed capsid assembly based on a heterodimeric coiled-coil linker has been performed by Minten et al. (2011a). In this method, the enzyme of interest attaches to the CCMV capsid protein dimers using the coiled-coil motif before VLP formation. To achieve this, the authors genetically modified *Pseudozyma antarctica* lipase B with the E-coil monomer of the heterodimeric coiled coil, while the complementary K-coil was genetically attached to the capsid protein. Afterward, both were mixed, resulting in the formation of the coiled-coil. The advantages of the applied method include significantly increased encapsulation efficiency and control over the average number of encapsulated enzyme molecules. Another directed enzyme encapsulation into VLPs from CCMV was performed by adding an N-terminal block consisting of an elastin-like polypeptide (ELP) to the CCMV capsid resulting in the formation of the ELP-CCMV block co-polymer, which was able to form T = 1 capsids upon an increase of the salt concentration or temperature at pH 7.5. In contrast, non-modified capsid proteins could not form capsids under the same conditions. Then, applying a chemo-enzymatic coupling strategy based on Sortase A (SrtA), the authors were able to construct an enzyme-ELP-CCMV conjugate that led to the encapsulation of the enzyme lipase CalB with high efficiency. Besides, encapsulated CalB demonstrated equal activity compared to free CalB, and the capsid protected it against proteases (Schoonen et al., 2016).

7.1.3. By fusion protein

In *Salmonella typhimurium* bacteriophage P22, an SP is required for procapsid assembly but is not present in the mature virion. Thus, researchers found an easier and faster way to encapsulate enzymes into

VLPs using this protein. The P22 capsid is composed of 420 copies of a 46.6 kDa coat protein (CP) and, with the aid of 100–330 copies of a 33.6 kDa scaffolding protein (SP), assembles into a $T = 7$ icosahedral capsid (Botstein et al., 1973). An enzyme of interest can easily be encapsulated into P22 VLPs by genetically attaching it to the SP to form a fusion protein and heterologously expressing them together with the CP. The nanoreactors are formed *in vivo* self-assembly of the P22 VLPs containing the catalyst. Using this strategy, Trevor Douglas et al. encapsulated the enzymes alcohol dehydrogenase (AdhD) (Patterson et al., 2012a), CelB glycosidase (Patterson et al., 2012b), and NADH oxidase (NOX) (Patterson et al., 2014) into P22 VLPs. They confirmed the VLPs stability and the improved enzymatic activity even at elevated temperatures. On the other hand, a fusion between SP and cytochrome P450 was encapsulated inside P22 VLPs for prodrug activation (Sánchez-Sánchez et al., 2015).

A similar method was used to encapsulate peptidase E and luciferase into VLPs derived from the bacteriophage Qb (Fiedler et al., 2010). This phage forms icosahedral VLPs with 180 copies of a 14.3 kDa CP (Kozlovskaya et al., 1993; Golmohammadi et al., 1996) and packages its RNA genome through an interaction between a hairpin structure and interior-facing residues of CP (Witherell and Uhlenbeck, 1989). These RNA aptamer sequences were used to bind a peptide tag (fused to the enzyme to be encapsulated) to CP residues in the interior of the capsid.

On the other hand, Inoue et al. (2008) engineered simian virus 40 (SV 40) VLPs to encapsulate the prodrug-modifying enzyme yeast cytosine deaminase (yCD) and demonstrated the successful conversion of the prodrug 5-fluorocytosine (5-FC) to 5-fluorouracil (5-FU), a highly cytotoxic compound that is routinely used in cancer chemotherapy. The SV 40 capsid is composed of 72 copies of the VP1 major coat protein and 72 copies of the minor coat protein VP2/3. The deaminase was encapsulated into the SV 40 VLPs by its fusion to the CP VP2/3 and, after co-expression, VLPs self-assembled into their icosahedral form. Targeting the same prodrug, Kaczmarczyk et al. (2011) developed VLPs based on an avian retrovirus to encapsulate cytosine deaminase fused with uracil phosphorybosyltransferase (Fcy:Fur). The capsid of this retrovirus consists of the VSV-G envelope and the Gag-polypolypeptide; therefore, the fused enzymes were fused to Gag, which resulted in the formation of VLPs containing Gag-Fcy:Fur. The cytotoxic effect of these VLPs was determined using the prostate cancer cell line PC3 and caused up to 80% reduction in tumor cell viability.

7.2. Cascade reactions

Enzymatic cascade reactions are highly coordinated catalytic reactions of multienzymatic systems in which more complex reactions can be reached consecutively. A key issue of these highly efficient enzyme pathways is the cooperative and spatial organization of enzymes to ensure the sequential conversion of substrates (Agapakis et al., 2012; Chauhan et al. 2020, 2021). This approach reduces the laborious extraction and purification of intermediate products of each step, thus reducing unit operations, shorter cycle times, and improved yields promoting economical, sustainable, and environmentally benign synthesis.

There are a few reports of cascade reactions using VLPs. In a pioneering work, three enzymes forming a synthetic metabolon that comprised the hyperthermophile β -glucosidase, the ATP-dependent galactokinase, and the ADP-dependent glucokinase were encapsulated in P22 VLP's (Patterson et al., 2014). The nanoreactors were obtained by the co-expression of the coat protein gene and the multienzyme fusion gene containing the essential scaffold protein domain and the three enzymes. The cascade reaction started with the hydrolysis of beta-linked disaccharides by the β -glucosidase, followed by the phosphorylation of galactose to galactose-1-phosphate and glucose to glucose-6-phosphate by the ATP-dependent galactokinase and the ADP-dependent glucokinase, respectively. The authors claimed that this nanoreactor could be particularly interesting for biofuels production. Giessen and Silver (2016) used engineered MS2 phage capsid protein to encapsulate

multiple enzymes *in vivo*. SpyTag-SpyCatcher proteins were fused to MS2 that covalently bind to the multiple enzymes in the interior of the virus capsid. The enzyme-loaded nanoreactors could be easily purified and used *in vitro* suggesting the versatile production of highly stable cascade nanoreactors (Giessen and Silver, 2016). In another interesting work, lipid was introduced into synthetic scaffolds *in vivo* (Myhrvold et al., 2016). For such incorporation bacteriophage $\phi 6$ was chosen as it contains lipids and different other membrane proteins surrounding the nucleocapsid proteins. This new class of synthetic lipid-containing scaffolds (SLSs) was built in *E. coli* using two $\phi 6$ proteins: P9, the membrane protein and P12, the nonstructural protein required for particle formation. The two enzymes involved in indigo production were co-localized by fusion to the C-terminus of P9, which showed enhanced dye production. The study shows that the SLSs could be used to localize different enzymes if P9 fusion do not interfere with the enzymatic activity.

On the other hand, two different cascade reactions were performed by nanoreactors of VLPs from the cowpea chlorotic mottle virus (CCMV). In the first cascade system, the glucose oxidase transformed glucose into gluconic acid and hydrogen peroxide, which was then consumed by a complex obtained by the conjugation of hemin and a specific sequence of ssDNA (DNAzyme) that shows peroxidase activity. The second cascade reaction involved glucose oxidase to produce gluconic acid from glucose which was transformed in the presence of ATP by the co-encapsulated gluconokinase, producing D-gluconate-6-phosphate, which was then converted to ribulose-5-phosphate and NADPH by a 6-phosphogluconate dehydrogenase. The encapsulation strategy consisted of the chemical attachment of single- and complementary-stranded DNA tags to the exterior of chosen enzymes, resulting in negatively charged conjugates that induce the co-encapsulation inside CCMV capsids (Brasch et al., 2017).

VLPs derived from the bacteriophage P22 were used to obtain nanoreactors catalyzing the complete pathway for glutathione biosynthesis. The nanoreactors were produced by encapsulating essential glutamate cysteine ligase and glutathione synthetase (Wang et al., 2020). The strategy consisted of the expression of genes encoding fusion proteins of enzymes with the truncated scaffolding protein (SP) and controlled by different inducers. In another work, three enzymes, amylase, maltase, and glucokinase were confined in the T4 phage scaffold (Liu et al., 2020). Each enzyme was fused with the outer capsid protein Hoc through SpyTag-Spy Catcher pairing and assembled onto T4 phage. Finally, an enhanced peroxigenase CYP_{BMS21B3} was encapsulated into P22 VLPs that were functionalized with the glucose oxidase in order to generate *in situ* hydrogen peroxide, a necessary cofactor for CYP activity. The authors demonstrated the successful transformation of different important pollutants such as endocrine disruptor compounds (EDCs) (González-Davis et al., 2020). Further detailed descriptions on catalytic kinetic considerations, molecular tools, and recent updates on cascade nanoreactors could be found in our brief literature review (Chauhan et al., 2021).

8. VLP-based enzymatic nanoreactors for ERT

The use of VLPs could be an effective strategy for IEM diseases that could be treated by ERT. There are a few examples using VLPs as enzyme nanocarriers for potential ERT in the literature. The intrinsic compatibility with biological fluids gives VLPs a high potential for carrying and delivering enzymatic activity in ERT treatments. In addition, their particular stability and solubility, together with the possibility of surface functionalization to target specific organs or cell compartments, avoiding protease degradation, immune system recognition, and improving enzyme lifetime in the organism, make VLP-based enzymatic nanoreactors an interesting strategy to improve the efficiency of ERT.

Glucocerebrosidase, and α -galactosidase A, deficient enzymes in Gaucher and Fabry disease, respectively, were covalently encapsulated in VLPs from Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV), utilizing a Sortase

A-mediated coupling and stabilized with Elastin-like polypeptides. The external nanoreactor surface was conjugated with PEG to improve the overall biodistribution and functionalized with a mannose group to enhance the targeting to diseased cells. Cell internalization assays demonstrated that the functionalized VLP-based nanoreactors colocalized in the lysosomal compartment as observed by confocal microscopy and using a murine macrophage cell line as a model for lysosomal storage diseases (Oudmaijer, 2021).

Gama et al. (2021) encapsulated GALT enzyme in Brome Mosaic Virus (BMV) by charge complementarity. These virus-based GALT nanoreactors were effectively internalized into different human cell lines such as hepatocyte, fibroblast, and kidney cells as demonstrated *in vitro*.

Another study reported the encapsulation of the enzyme β -glucocerebrosidase in VLPs from BMV, and their surface was functionalized with mannose groups to be targeted to macrophages (Chauhan et al., 2022) as a potential ERT for Gauche disease. The VLP nanoreactors showed significant GCase catalytic activity and the enzyme stability under physiological conditions was enhanced 11-fold after encapsulation. This stabilization is beneficial because of a higher blood circulation half-life, which may reduce the cost of therapy by reducing the requirement for multiple intravenous injections. The mannose-targeted enzymatic nanoreactors showed enhanced internalization into macrophage cells.

Finally, these few examples strengthen the huge potential of VLPs as biocompatible nanocarriers to deliver enzyme activity. Substantial and innovative improvements in enzyme replacement therapies could be obtained in terms of stability, doses, and efficiency by using virus-like nanoparticles as enzyme carriers.

8.1. VLP-based enzymatic nanoreactors for cancer treatment

Even if there is no cancer treatment based on ERT, several VLP-based enzymatic nanoreactors have been proposed to improve the cancer chemotherapy treatments. Cancer is a serious health issue worldwide. The current treatment strategy for cancer treatment is surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy. Chemotherapy is generally prescribed during the early and last stages of cancer (Luo et al., 2017). However, it suffers from limitations like drug resistance and associated severe side effects at therapeutic doses. Most chemotherapeutic drugs are available as prodrugs that require metabolic activation by metabolic enzymes for profound action against cancer cells. Thus,

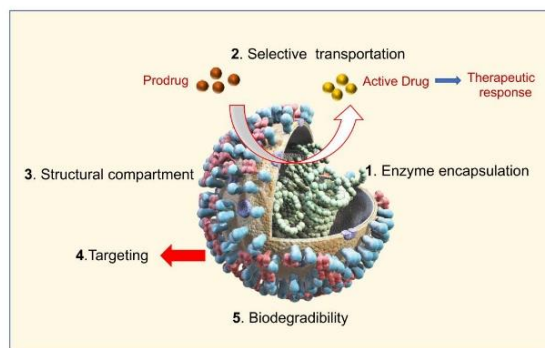


Fig. 4. Schematic representation of VLPs as nanovehicles for enzyme prodrug therapy. Nanoreactors possess features like hollow structures for encapsulation of the enzyme for the specific transformation of a prodrug to an active drug improving the therapeutic outcomes, structural compartment for various modifications, targeted delivery to the diseased site and high biodegradability, making it suitable for development of smart nanomedicines for cancer treatment.

enzymatic therapeutics have been applied for targeted cancer treatment, also known as enzyme prodrug therapy (EPT) (Fig. 4). The scope of enzyme therapeutics is widened by using nanoparticles as enzyme carriers (Chauhan et al., 2020; Mukerabigwi et al., 2018; González-Davis et al., 2019). These nanostructures provide stability against degradation by proteases and inactivation by the immune system, which is required for long blood circulation and half-life for effective accumulation in the tumor region. As discussed above, VLPs stand out as promising nanocarriers for therapeutic enzymes. Their porous structure allows efficient substrate diffusion to perform catalytic reactions in the form of nanoreactors without requiring enzyme release, which may improve the bioavailability of biocatalysts due to stabilization.

Various VLP-based nanoreactors are developed for prodrug activation by genetic and chemical modifications. An early example described the delivery of cytosine deaminase using SV40 VLPs to kidney fibroblast cells, CV-1. The nanoreactors transformed the chemotherapeutic drug 5-fluorocytosine (5-FC) to cytotoxic 5-fluorouracil (5-FU), causing cell death with similar efficiency as free 5-FU (Inoue et al., 2008). DePorter and McNaughton (2014) developed nanoreactors for prodrug activation by displaying enzymes on the exterior of M13 bacteriophages VLPs by genetically fusing a 12 amino acid peptide Ypep for prostate cancer cell recognition and penetration. The biotinylated phage was introduced with horseradish peroxidase (HRP), broadly used in bioimaging and therapy. The nanoreactors were able to oxidize the prodrug indole-3-acetic acid producing peroxy radicals *in situ* to kill cancer cells (DePorter and McNaughton, 2014). Various reports from our group also highlight the use of VLPs in chemotherapeutic prodrug activation (Sánchez-Sánchez et al., 2014; 2015; Tapia-Moreno et al., 2017; Chauhan et al., 2018). For instance, the self-assembly of the plant CGMV VLPs was used to encapsulate active cytochrome P450 (CYP) for the transformation of chemotherapeutic prodrugs like tamoxifen and resveratrol. In another report, the CYP was genetically fused to the viral SP of P22 bacteriophage to produce P22 nanoreactors encapsulating CYP (P22CYP) (Sánchez-Sánchez et al., 2015). These nanoreactors were also surface-functionalized with folic acid for cancer-cell-targeted delivery, which significantly improved tamoxifen transformation in cells leading to enhanced cytotoxicity at lower drug doses (Tapia-Moreno et al., 2017). The multivalency and versatility of VLPs were also evaluated by the design of P22CYP as a multimodality platform for targeted breast cancer therapy (Chauhan et al., 2018). The virus capsids integrated the virus-driven enzyme prodrug therapy and photodynamic therapy for combinatorial therapy. Functionalization with an estradiol derivative using polyethylene glycol as a linker improved the internalization in MCF-7 cells and lowered the immunogenic response of VLPs, significantly. The synergy between the PDT and EPT drastically enhanced the tamoxifen sensitivity *in vitro*, which showed the ability of VLPs to combine multiple components while retaining the structural integrity and activity of biocatalysts.

In a study by Díaz-Barriga et al. (2021), the authors reported the genetically directed encapsidation of asparaginase (ASNase) in P22 VLPs to develop nanoreactors for acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment. ASNase is a biopharmaceutical for ALL treatment. The study's objective was to address the existing shortcomings of ASNase, like degradation by proteases, immunogenicity, and short blood circulation half-life. Even though the nanoreactor enzymatic efficiency and thermostability were lower than the commercial enzyme, the nanoreactors were functional under physiological conditions and in human blood serum for up to 24 h. The cytotoxicity analysis in the leukemic cell line, MOLT-4, showed concentration-dependent cell inhibition. Thuenemann et al. (2021) tested VLPs and smaller core-like particles (CLPs) based on the Bluetongue virus for delivery of thymidine kinase (TK) for prodrug conversion therapy. Their VLPs were constructed with TK fused to the inner capsid protein and could be produced in plants with high yields. The TK-VLPs could effectively inhibit the human glioblastoma cells, while TK-CLPs were ineffective due to the entrapment in the endosomal compartment, a phenomenon commonly observed with synthetic

nanoparticles. Thus, VLPs were beneficial for endosomal escape delivering TK protein for cancer treatment using systemic prodrug, ganciclovir. Recently, Hartzell et al. (2020) created a modular design of hepatitis B (HBV) VLPs as a delivery and biosensing agent that could be easily produced in *E. coli* with high yields. Smart HBV nanodevices were obtained by the SpyCatcher/SpyTag system offering a tunable delivery vehicle with controlled bioconjugation. This ability to tune the decoration density allowed highly modular control of signal amplification, cellular internalization efficiency, and breast cancer cell toxicity using delivered yeast cytosine deaminase (yCD), a cancer suicide enzyme, for activation of 5-FC to 5-FU (Hartzell et al., 2020). These examples highlight the versatility of VLPs to be modified genetically or chemically for targeted delivery of enzymes for improved cancer chemotherapy.

9. VLP functionalization and targeting

One of the main advantages of using VLPs as enzyme carriers is the possibility of modifying the viral capsid proteins to target specific tissues or cells. Thus, by directing the distribution of nanoparticles to specific targets, one can increase the desired catalytic action *in situ* while drastically reducing side effects (Schoonen and Van Hest, 2014; Rees et al., 2019). Therefore, the choice of the used ligand is usually based on target receptor characteristics, the biodistribution of the nanoparticle, and whether internalization is possible or desirable (Pearce and O'Reilly, 2019).

Modifications are typically accomplished by attaching targeting groups to the outer surface of VLPs to increase the binding avidity between nanoparticles and target receptors (Obermeyer et al., 2014). These modifications can range from chemical modifications to genetic programming; however, a wide array of targeting moieties cannot be attached by genetic engineering (antibody fragments, proteins, nucleic acids, small molecules, etc.). Thus, functionalization is mainly carried out via covalent conjugation of specific ligand molecules on coat protein amino acids like lysine, tyrosine, aspartic or glutamic acids, and ones that are genetically introduced like cysteine (Sanità et al., 2020; Koyani et al., 2017; Large et al., 2019; Yoo et al., 2019; González-Davis et al., 2019) (Fig. 5). One of the early examples by Gillitzer et al. (2002) described the generalized methods for chemical modification of CCMV

and quantified the degree of modification by coupling fluorophores to surface exposed amines, carboxylic acids, and engineered thiol residues. The space-filling model depicted 11 carboxylate groups and six amino groups per subunit, while two surface-exposed thiol groups per subunit were introduced genetically, counting up to 1980, 1080, and 360 potential sites for chemical modifications.

Although chemical functionalization tends to be favored, difficulties arise when specificity is required, and therefore, recombinant methods are employed in order to introduce unique reactive groups (Stephanopoulos and Francis, 2011). While genetic fusion has been successful, it remains a time-consuming trial-and-error approach as modifications often lead to capsid protein misfolding, which impairs VLP assembly or stability (Brune et al., 2016).

An excellent example of capsid protein genetic engineering was accomplished by Vervoort et al. (2021). They fused an elastin-like polypeptide motif to the N-terminus of the CCMV capsid proteins and discovered that by doing so, one of the cysteine residues on the capsid surface became accessible for chemical modification. They then incorporated a second handle on the capsid surface by substituting a lysine for a noncanonical amino acid azido-phenylalanine using the amber suppression method previously reported to modify the surface of MS2 and tobacco mosaic virus capsids (Tong et al., 2009; Wu et al., 2014). Finally, the cell-penetrating peptide TAT was conjugated to the capsids using the exposed cysteine while employing a copper-free, strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC) reaction to conjugate a sulfo-DBCO-Cyanine5 fluorophore to the noncanonical amino acid and track the particles in HeLa cells.

Brune et al. (2016) genetically fused SpyCatcher to the N-terminus of the viral coat protein of the RNA bacteriophage AP205. This peptide was engineered to form an irreversible isopeptide bond to its protein partner SpyTag under a wide range of conditions (pH, buffer, temperature) (Zakeri et al., 2012). Although their aim was not to target the VLPs to a specific tissue, they established a robust platform for simple, rapid, and stable linking of antigens to virus-like particles for immunization which can be easily modified to attach specific targeting ligands.

Traditional modification reactions involve lysine and cysteine residues to attach new functional groups to proteins. Aspartic and glutamic acid are often activated with carbodiimides; however, they usually

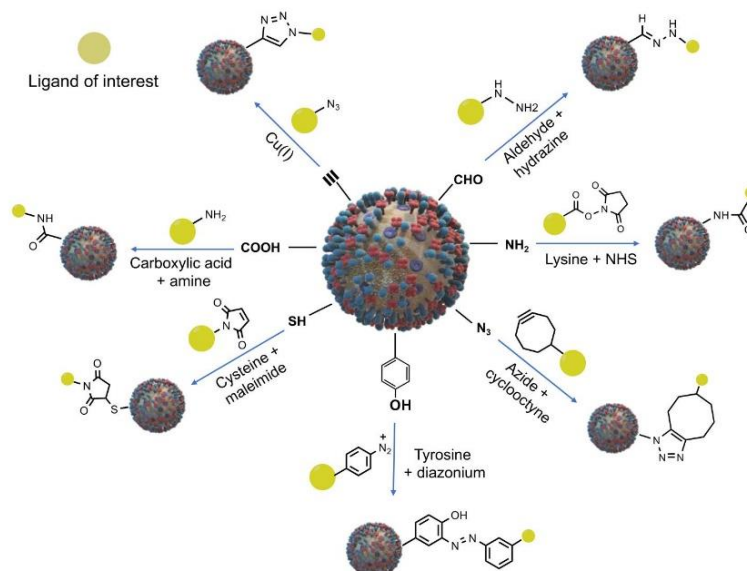


Fig. 5. Schematic diagram of common strategies for chemical functionalization on VLPs.

require a significant excess of reagents to achieve high yields (Ding et al., 2018). Traditional modification reactions involve lysine and cysteine residues to attach new functional groups to proteins. The simplest and most widely used strategy is NHS ([N-hydroxysuccinimide) esters acylation involving carbodiimide crosslinking of surface-exposed amines with carboxylates (Gillitzer et al., 2002). However, they usually require a significant excess of reagents to achieve high yields (Ding et al., 2018). Moreover, this strategy comes at the cost of lacking control over the number and location of the modifications.

Ashley et al. (2011) functionalized MS2 VLPs with a heterobifunctional cross-linker containing a 9.5 nm PEG spacer reactive toward amine and sulfhydryl groups. This linker was first conjugated to surface lysines present in the MS2 capsid and then reacted with a synthesized peptide containing a C-terminal cysteine residue. Similarly, Tapia-Moreno et al. (2017) covalently attached heterofunctional PEG with folic acid and succinimide moieties to the surface of bacteriophage P22 solvent-exposed free amino groups using succinimide-activated esters.

Maleimide-thiol Michael-type couplings are commonly used in cysteine-targeted functionalization. On the other hand, there are instances in which the desired modification cannot be accomplished as these residues are common in the active sites of many enzymes, and post-encapsulation modifications could accidentally hinder cargo enzymes (Aanei and Francis, 2018; Stephanopoulos and Francis, 2011; Ding et al., 2018). Our group has successfully used this approach in the past to couple 17- β -estradiol on the surface of bacteriophage P22 VLPs. A hetero-functional polyethylene glycol (PEG) with succinimidyl ester and the maleimide group (NHS-PEG4-Mal) at the distal ends was employed to enable selective conjugation of ESTAm via amide bonding giving PEG(EST), while the maleimide site was free to conjugate with the capsids (Chauhan et al., 2018).

Francis's group focused on modifying amino acids not commonly targeted for modification, such as tryptophans and tyrosines. In addition to naturally occurring amino acids, they have also used unnatural amino acid residues in oxidative coupling reactions. For instance, using amber codon suppression technology, the side chain aniline group of *p*-aminophenylalanine (pAF) was modified with *o*-aminophenol-containing DNA aptamers that bind to tyrosine kinase 7 (PTK-7), a receptor found on Jurkat T-lymphocytes and many other cancer cells (Tong et al., 2009). They later used the same pAF residue to attach full-length antibodies and target the epidermal growth factor receptor overexpressed by numerous types of cancer cells (Elsahly et al., 2015).

These amino acids may be incorporated into VLPs for click chemistry conjugation, enabling site-specific modification and stable linkage; however, the increased complexity of protein expression, side-reactions of certain azide/alkyne/tetrazine groups, and the increased frequency of misreading of unnatural amino acid codons mean there is still room for improvement (Brune et al., 2016).

Hydrazone ligation is another approach that provides chemoselective bioconjugation of VLPs. Brunel et al. employed the hydration ligation technique to develop multifunctional CPMV assembly for cell imaging and tumor targeting. First, benzaldehyde was introduced on VLPs surface and then, the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 1 ligand and fluorescent PEGylated peptide equipped with a hydrazide group were coupled via hydrazone ligation in a stepwise manner (Brunel et al., 2010). Like click chemistry, this strategy is also biorthogonal. On the other hand, hydrazone ligation shows absorption at ~350 nm, which may allow quantification of the degree of modification.

10. Challenges and perspectives

Enzyme use as biopharmaceuticals is well documented for enzyme replacement therapy and prodrug activation. These macromolecular catalysts are highly specific and offer high therapeutic outcomes with minimal side effects. The bioavailability, stability, and immunogenic response can be significantly addressed by using nanocarriers that may

lead to improved blood circulation half-life of biocatalysts. Virus-like particles are especially promising candidates as the construction of VLP nanoreactors does not require harsh conditions. At the same time, the stable and permeable proteinaceous nanocages could work as nanoreactors without the need for enzyme release giving added stability and protection to encapsulated enzymes. Moreover, their high-water solubility, homogeneity, and flexibility for different chemical and genetic modifications make them suitable for combining other components like targeting and imaging. This review summarizes the design, construction, and working of VLP nanoreactors for therapeutic applications. First, different diseases caused by enzyme deficiency are addressed, then the physicochemical parameters of VLPs, followed by their design and construction, are briefly discussed. Finally, the use of VLP nanoreactors for enzyme replacement therapy and prodrug activation, as well as the VLP functionalization for targeting strategies are discussed.

Without a doubt, the VLP technology combined with enzyme catalysis holds great potential in biomedicine, especially for the variety of illnesses originated from the lack of enzymatic activity. However, this area is still in its early stages, and most studies are limited to *in vitro* analysis. VLPs can stimulate efficient cellular and humoral immune responses, however, these characteristics become problematic when the goal is the delivery of specific cargo such as enzymes, in which case efficient camouflage and targeting is essential. A comprehensive *in vivo* understanding of VLP behavior, including biodistribution, clearance rates, immunogenicity, and toxicology is vital for the development of biomedically useful VLPs. Thus, future studies require extensive *in vivo* experiments to gain deeper knowledge on biodistribution, degradation, targeting efficiency, immunogenic response, and clearance rates. Thus, this area still holds space for more development while highlighting the potential for clinical translation.

CCRediT authorship contribution statement

Oscar González-Davis: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Roles, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Maria V. Villagrana-Escareño:** Investigation, Roles, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Mario A. Trujillo:** Investigation, Roles, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Pedro Gama:** Investigation, Roles, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Kanchan Chauhan:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Supervision, Validation, Roles, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Rafael Vázquez-Duhalt:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Supervision, Validation, Roles, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work has been supported by the National Autonomous University of México. UNAM (PAPIIT IN209722 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CF-MI-2019-6357).

References

- Aanei, L.L., Francis, M.B., 2018. Dual surface modification of genome-free MS2 capsids for delivery. In: W., C., L., G. (Eds.), *Virus-Derived Nanoparticles for Advanced Technologies. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY, New York, NY, pp. 629–642.
- Abbing, A., Blaschke, U.K., Grein, S., Kretschmar, M., Stark, C.M.B., Thies, M.J.W., Walter, J., Weigand, M., Woith, D.C., Hess, J., Reiser, C.O.A., 2004. Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via

- recombinant polyomavirus like particles. *J. Biol. Chem.* 279, 27410–27421. <https://doi.org/10.1074/JBC.M313612200>.
- Agapakis, C.M., Boyle, P.M., Silver, P.A., 2012. Natural strategies for the spatial optimization of metabolism in synthetic biology. *Nat. Chem. Biol.* 8, 527–535. <https://doi.org/10.1038/NCHEMBO.975>.
- Alegra, T., Vairo, F., de Souza, M.V., Krug, B.C., Schwartz, I.V.D., 2012. Enzyme replacement therapy for Fabry disease: a systematic review and meta-analysis. *Genet. Mol. Biol.* 35, 947–954. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600009>.
- Anderson, S., 2018. GALT deficiency galactosemia. *MCN Am. J. Matern./Child Nurs.* 43, 44–51. <https://doi.org/10.1097/NMC.0000000000000388>.
- Arnold, G.L., 2018. Inborn errors of metabolism in the 21st century: past to present. *Ann. Transl. Med.* 6 <https://doi.org/10.21037/ATM.2018.11.36>, 467–467.
- Ashley, C.E., Carnes, E.C., Phillips, G.K., Duffee, P.N., Buley, M.D., Lino, C.A., Padilla, D. P., Phillips, B., Carter, M.B., Willman, C.L., Brinker, C.J., Caldeira, J.D.C., Chackerian, B., Wharton, W., Peabody, D.S., 2011. Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles. *ACS Nano* 5, 5729–5745. <https://doi.org/10.1021/nl201397z>.
- Aumiller, W.M., Uchida, M., Biner, D.W., Miettinen, H.M., Lec, B., Douglas, T., 2018. Stimuli responsive hierarchical assembly of P22 virus-like particles. *Chem. Mater.* 30, 2262–2273. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMMATER.7B04964>.
- Ansar, S.F., Foubert, T.R., Hudson, M.H., Vedvick, T.S., Middaugh, C.R., 2006. Conformational stability and disassembly of norwalk virus like particles: effect of pH and temperature. *J. Biol. Chem.* 281, 19478–19488. <https://doi.org/10.1074/JBC.M603313200>.
- Bertolotti Giarlet, A., White, L.J., Chen, R., Prasad, B.V.V., Estes, M.K., 2002. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J. Virol.* 76, 4044–4055. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.4044-4055.2002>.
- Beutler, E., Kay, A., Saven, A., Garver, P., Thurston, D., Dawson, A., Rosenbloom, B., 1991. Enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Blood* 78, 1183–1189. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V78.5.1183.1183>.
- Botstein, D., Waddell, C.H., King, J., 1973. Mechanism of head assembly and DNA encapsulation in Salmonella phage p22. I. Genes, proteins, structures and DNA maturation. *J. Mol. Biol.* 80 [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90204-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90204-0).
- Brasch, M., Putri, R.M., De Ruiter, M.V., Luque, D., Koay, M.S.T., Castón, J.R., Cornelissen, J.J.L.M., 2017. Assembling enzymatic cascade pathways inside virus-based nanocages using dual-tasking nucleic acid tags. *J. Am. Chem. Soc.* 139, 1512–1519. <https://doi.org/10.1021/JACS.6B10948>.
- Brune, K.D., Leneghan, D.B., Brian, L.J., Ishizuka, A.S., Bachmann, M.F., Draper, S.J., Biswas, S., Howarth, M., 2016. Plug-and-Display: decoration of virus-like particles via isopeptide bonds for modular immunization. *Sci. Rep.* 6 <https://doi.org/10.1038/SREP19234>.
- Brunel, F.M., Lewis, J.D., Destito, G., Steinmetz, N.F., Manchester, M., Stuhlmann, H., Dawson, P.E., 2010. Hydrazine ligation strategy to assemble multifunctional viral nanoparticles for cell imaging and tumor targeting. *Nano Lett.* 10, 1093–1097. <https://doi.org/10.1021/NL1002526>.
- Brunk, N.B., Twarock, R., 2011. Percolation theory reveals biophysical properties of virus-like particles. *ACS Nano* 5 (8), 12988–12995. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c01882>, 2021.
- Bundy, B.C., Swartz, J.R., 2011. Efficient disulfide bond formation in virus-like particles. *J. Biotechnol.* 154, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.04.011>.
- Cadena-Nava, R.D., Comas-García, M., Garmann, R.F., Rao, A.L.N., Knobler, C.M., Gelbart, W.M., 2012. Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: requirement for a specific high protein/RNA mass ratio. *J. Virol.* 86, 3318–3326. <https://doi.org/10.1128/jvi.06566-11>.
- Caldeira, J.C., Peabody, D.S., 2011. Thermal stability of RNA phage virus-like particles displaying foreign peptides. *J. Nanobiotechnol.* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-22>.
- Chauthan, K., Hernandez-Meza, J.M., Rodríguez-Hernández, A.G., Juárez-Moreno, K., Sengar, P., Vazquez-Duhalt, R., 2018. Multifunctionalized biocatalytic P22 nanoreactor for combinatory treatment of ER+ breast cancer. *J. Nanobiotechnol.* 16 <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0345-2>.
- Chauthan, K., Sengar, P., Juárez-Moreno, K., Hirata, G.A., Vazquez-Duhalt, R., 2020. Camouflaged, activatable and therapeutic tandem bionanoreactors for breast cancer theranosis. *J. Colloid Interface Sci.* 580, 365–376. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2020.07.043>.
- Chauthan, K., Zárate-Romero, A., Sengar, P., Medrano, C., Vazquez-Duhalt, R., 2021. Catalytic kinetics considerations and molecular tools for the design of multienzymatic cascade nanoreactors. *ChemCatChem* 13, 3732–3748. <https://doi.org/10.1002/CCTC.202100604>.
- Chauthan, K., Olivares Medina, C.N., Villagrana Escareño, M.V., Juárez-Moreno, K.O., Cadena-Nava, R.D., Rodríguez-Hernández, A.G., Vazquez-Duhalt, R., 2022. Targeted enzymatic VLP nanoreactors with β -glucocerebrosidase activity as potential enzyme replacement therapy for Gaucher's disease. *ChemMedChem*, e202200384. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200384>.
- Chen, C., Daniel, M.C., Quinkert, Z.T., De, M., Stein, B., Bowman, V.D., Chipman, P.R., Rotello, V.M., Kao, C.C., Dragnea, B., 2006. Nanoparticle-templated assembly of viral protein cages. *Nano Lett.* 6, 611–615. <https://doi.org/10.1021/nl0600878>.
- Chrony, L.R., Pipas, J.M., Garcea, R.L., 2003. Chaperone mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10477–10482. <https://doi.org/10.1073/pnas.1832245100>.
- Coelho, A.L., Lourenço, S., Trabuco, M., Silva, M.J., Oliveira, A., Gaspar, A., Diogo, L., Tavares De Almeida, I., Vicente, J.B., Rivera, I., 2015. Functional correction by antisense therapy of a splicing mutation in the GALT gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 23, 500–506. <https://doi.org/10.1038/EJHG.2014.149>.
- Coelho, A.L., Rubio Gozalbo, M.E., Vicente, J.B., Rivera, I., 2017. Sweet and sour: an update on classic galactosemia. *J. Inher. Metab. Dis.* 40, 325–342. <https://doi.org/10.1007/S10545-017-0029-3>.
- Comellas Aragones, M., Engelkamp, H., Claessen, V.I., Sommerdijk, N.A.J.M., Rowan, A.E., Christianen, P.C.M., Maan, J.C., Verduin, B.J.M., Cornelissen, J.J.L.M., Nolte, R.J.M., 2007. A virus based single-enzyme nanoreactor. *Nat. Nanotechnol.* 210 2, 635–639. <https://doi.org/10.1038/nanno.2007.299>, 2007.
- Concolino, D., Deodato, F., Parini, R., 2018. Enzyme replacement therapy: efficacy and limitations. *Ital. J. Pediatr.* 44, 117–126. <https://doi.org/10.1186/S13052-018-0562-1/TABLES/1>.
- Cornode, D.P., Skajaa, T., Fayad, Z.A., Mulder, W.J.M., 2009. Nanotechnology in medical imaging: probe design and applications. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 992–1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.165506>.
- Cortines, J.R., Weigle, P.R., Gilcrease, E.B., Casjens, S.R., Teschke, C.M., 2011. Decoding bacteriophage P22 assembly: identification of two charged residues in scaffolding protein responsible for coat protein interaction. *Virology* 421, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.09.005>.
- Cox Brinkman, J., Boelens, J.J., Wraith, J.E., O'Meara, A., Veys, P., Wijburg, F.A., Wulffraat, N., Wynn, R.F., 2006. Haematopoietic cell transplantation (HCT) in combination with enzyme replacement therapy (ERT) in patients with Hurler syndrome. *Bone Marrow Transplant.* 38, 17–21. <https://doi.org/10.1038/SJ.BMT.1705401>.
- Crooke, S.N., Zheng, J., Ganewatta, M.S., Guldberg, S.M., Reineke, T.M., Finn, M.G., 2019. Immunological properties of protein-polymer nanoparticles. *ACS Appl. Bio Mater.* 2, 93–103. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00418>.
- Dahal, Y.R., Schmit, J.D., 2018. Ion specificity and nonmonotonic protein solubility from salt entropy. *Biophys. J.* 114, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.10.040>.
- de Ruiter, M.V., van der Hee, R.M., Driessen, A.J.M., Keurhorst, E.D., Hamid, M., Cornelissen, J.J.L.M., 2019. Polymorphic assembly of virus-capsid proteins around DNA and the cellular uptake of the resulting particles. *J. Contr. Release* 307, 342–354. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.019>, Aug 10.
- Delnoy, B., Coelho, A.L., Rubio Gozalbo, M.E., 2021. Current and future treatments for classic galactosemia. *J. Personalized Med.* 11, 1–14. <https://doi.org/10.3390/JPM11020075>.
- Demirbas, D., Coelho, A.L., Rubio-Gozalbo, M.E., Berry, G.T., 2018. Hereditary galactosemia. *Metabolism* 83, 188–196. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2018.01.025>.
- DePorter, S.M., McNaughton, B.R., 2014. Engineered M13 bacteriophage nanocarriers for intracellular delivery of exogenous proteins to human prostate cancer cells. *Bioconjugate Chem.* 25, 1620–1625. <https://doi.org/10.1021/BC500339K>.
- Desnick, R.J., Schuchman, E.H., 2012. Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 13, 307–335. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENOM-090711-163739>.
- Díaz-Barriga, C., Villanueva-Flores, F., Queter, K., Zárate-Romero, A., Cadena-Nava, R. D., Huerta-Saquero, A., 2021. Asparaginase-phage P22 nanoreactors: toward a bioterror development for acute lymphoblastic leukemia treatment. *Pharmaceutics* 13, 604. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13050604>.
- Ding, X., Liu, D., Booth, G., Gao, W., Lu, Y., 2018. Virus-like particle engineering: from rational design to versatile applications. *Biotechnol. J.* 13 <https://doi.org/10.1002/BIOT.201700324>.
- Douglas, T., Young, M., 2006. Viruses: making friends with old foes. *Science* 312, 873–875. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1123223>.
- Durán-Meza, A.L., Escamilla-Ruiz, M.L., Segovia-González, X.F., Villagrana-Escareño, M. V., Vega-Acosta, J.R., Ruiz-García, J., 2020. Encapsulation of different plasmidic gold nanoparticles by the CCMV CP. *Molecules* 25, 2628. <https://doi.org/10.3390/molecules25112628>.
- Duran-Meza, A.L., Villagrana-Escareño, M.V., Ruiz-García, J., Knobler, C.M., Gelbart, W. M., 2021. Controlling the surface charge of simple viruses. *PLoS One* 16, e0255820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255820>, 1371.
- Effio, C.L., Hubbuch, J., 2015. Next generation vaccines and vectors: designing downstream processes for recombinant protein-based virus-like particles. *Biotechnol. J.* 10, 715–727. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201400392>.
- Elshohly, A.M., Netirojanakul, C., Aanei, L.L., Jager, A., Bendall, S.C., Farkas, M.E., Nolan, G.P., Francis, M.B., 2015. Synthetically modified viral capsids as versatile carriers for use in antibody-based cell targeting. *Bioconjugate Chem.* 26, 1590–1596. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.5B00226>.
- Fiedler, J.D., Brown, S.D., Lau, J.L., Finn, M.G., 2010. RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 49, 9648–9651. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201005243>.
- Fiedler, J.D., Fishman, M.R., Brown, S.D., Lau, J., Finn, M.G., 2018. Multifunctional enzyme packaging and catalysis in the Q β protein nanoparticle. *Biomacromolecules* 19, 3945–3957. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.8B00885>.
- Finn, A.M., Gennery, A.R., 2018. Adenosine deaminase deficiency: a review. *Orphanet J. Rare Dis.* 13 <https://doi.org/10.1186/S13023-018-0807-5>.
- Fooks, A.R., Johnson, N., Frenling, C.M., Wakeley, P.R., Banyard, A.C., McElhinney, L. M., Marston, D.A., Dastjerdi, A., Wright, E., Weiss, R.A., Müller, T., 2009. Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st Century. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 3, e380 <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0000530>.
- Fox, J.M., Wang, G., Speir, J.A., Olson, N.H., Johnson, J.E., Baker, T.S., Young, M.J., 1998. Comparison of the native CCMV virion with in vitro assembled CCMV virions by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *Virology* 244, 212–218. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1998.9107>.
- Fuenmayor, J., Gódia, F., Cervera, L., 2017. Production of virus like particles for vaccines. *N. Biotechnol.* 39, 174–180. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2017.07.010>.

- Fuller, M.T., King, J., 1982. Assembly in vitro of bacteriophage P22 procapsids from purified coat and scaffolding subunits. *J. Mol. Biol.* 156, 633–665. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90270-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90270-4).
- Gama, P., Cadena Nava, R.D., Juárez Moreno, K., Pérez Robles, J., Vazquez Duhalt, R., 2021. Virus based nanoreactors with GALT activity for classic galactosemia therapy. *ChemMedChem* 16, 1438–1445. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000999>.
- Garmann, R.F., Comas García, M., Koay, M.S., Cornelissen, J.J., Knobler, C.M., Gelbart, W.M., 2014. Role of electrostatics in the assembly pathway of a single-stranded RNA virus. *J. Virol.* 88, 10472–10479. <https://doi.org/10.1128/JVI.01044-14>.
- Garmann, R.F., Goldfain, A.M., Tanimoto, C.R., Beren, C.E., Vasquez, F.F., Villarreal, D. A.C.M., Gelbart, W.M., Manoharan, V.N., 2022. Single particle studies of the effects of RNA protein interactions on the self assembly of RNA virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119, e2206292119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2206292119>.
- Germain, D.P., Hughes, D.A., Nicholls, K., Bichet, D.G., Gagliardi, R., Wilcox, W.R., Feliciani, C., Shankar, S.P., Ezgu, F., Amartino, H., Bratkovic, D., Feldt-Rasmussen, U., Nedd, K., Sharaf El Din, U., Lourenco, C.M., Banikazemi, M., Chawrow, J., Dasouki, M., Finegold, D., Giraldo, P., Goker Alpan, O., Longo, N., Scott, C.R., Torra, R., Tuffaha, A., Jovanovic, A., Waldek, S., Packman, S., Ludington, E., Vireck, C., Kirk, J., Yu, J., Benjamin, E.R., Johnson, F., Lockhart, D. J., Skuban, N., Castelli, J., Barth, J., Barlow, C., Schiffmann, R., 2016. Treatment of Fabry's disease with the pharmacologic chaperone miglustat. *N. Engl. J. Med.* 375, 545–555. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA150198>.
- Giessen, T.W., Silver, P.A., 2016. A catalytic nanoreactor based on in vivo encapsulation of multiple enzymes in an engineered protein nanocompartment. *ChemBiochem* 17, 1931–1935. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600431>.
- Gillitzer, E., Willis, D., Young, M., Douglas, T., 2002. Chemical modification of a viral cage for multivalent presentation. *Chem. Commun.* 2, 2390–2391. <https://doi.org/10.1039/B207853H>.
- Glasgow, J.E., Capehart, S.L., Francis, M.B., Tullman-Ereck, D., 2012. Osmolyte-mediated encapsulation of proteins inside MS2 virus capsids. *ACS Nano* 6, 8658–8664. <https://doi.org/10.1021/NN302183H>.
- Golmohammadi, R., Fridborg, K., Bundule, M., Vålegård, K., Liljas, L., 1996. The crystal structure of bacteriophage Q β at 3.5 Å resolution. *Structure* 4, 543–554. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00060-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00060-3).
- González-Davis, O., Chauhan, K., Vazquez-Duhalt, R., 2019. Biocatalytic nanoreactors for medical purposes. In: Grundwald, P. (Ed.), *Pharmaceutical Biocatalysis*, Chapter 18. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., Singapore, ISBN 9789814800617, pp. 637–671.
- González-Davis, O., Chauhan, K., Zapian-Merino, S.J., Vazquez-Duhalt, R., 2020. Bi-enzymatic virus-like bionanoreactors for the transformation of endocrine disruptor compounds. *Int. J. Biol. Macromol.* 146, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.IJBIOMAC.2019.12.272>.
- Grabowski, G.A., Leslie, N., Wenstrup, R., 1998. Enzyme therapy for Gaucher disease: the first 5 years. *Blood Rev.* 12, 115–133. [https://doi.org/10.1016/S0268-960X\(98\)90023-6](https://doi.org/10.1016/S0268-960X(98)90023-6).
- Grewal, S.S., Wynn, R., Abdenur, J.E., Burton, B.K., Gharib, M., Haase, C., Hayashi, R.J., Shenoy, S., Silence, D., Tiller, G.E., Dudek, M.E., Van Royen-Kerkhof, A., Wraith, J. E., Woodard, P., Young, G.A., Wulffraat, N., Whitley, C.B., Peters, C., 2005. Safety and efficacy of enzyme replacement therapy in combination with hematopoietic stem cell transplantation in Hurler syndrome. *Genet. Med.* 7, 143–146. <https://doi.org/10.1097/01.GIM.0000154299.22120.6A>.
- Grgacic, E.V.L., Anderson, D.A., 2006. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* 40, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.018>.
- Groothuis, T., Neefjes, J., 2006. The ins and outs of intracellular peptides and antigen presentation by MHC class I molecules. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 300, 127–148. https://doi.org/10.1007/3-540-28007-3_6.
- Günther, S., Weisner, B., Roth, A., Grewing, T., Asper, M., Drosten, C., Enmerich, P., Petersen, J., Wilczek, M., Schmitz, H., 2001. Lassa fever encephalopathy: lassa virus in cerebrospinal fluid but not in serum. *J. Infect. Dis.* 184, 345–349. <https://doi.org/10.1086/322033>.
- Hartman, E.C., Lobba, M.J., Favor, A.H., Robinson, S.A., Francis, M.B., Tullman-Ereck, D., 2019. Experimental evaluation of coevolution in a self assembling particle. *Biochemistry* 58, 1527–1538. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00948>.
- Hartzell, E.J., Lieser, R.M., Sullivan, M.O., Chen, W., 2020. Modular hepatitis B virus-like particle platform for biosensing and drug delivery. *ACS Nano* 14, 12642–12651. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b08756>.
- Hernández González, A., 2021. Mitochondria-targeted Bionanoreactors Containing Thymidine Phosphorylase Activity for the Potential Treatment of Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy Syndrome (MNGIE). Master Thesis. CICESE, Mexico. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3642>.
- Hooker, J., Datta, A., Botta, M., Raymond, K., Francis, M., 2007. Magnetic resonance contrast agents from viral capsid shells: a comparison of exterior and interior cargo strategies. *Nano Lett.* 7, 2207–2210. <https://doi.org/10.1021/nl070512c>.
- Inoue, T., Kawano, M., Takahashi, R., Tsukamoto, H., Enomoto, T., Inai, 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, 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.12.006>.
- Jaballah, S.A., Bailey, G.D., Desfosses, A., Hyun, J., Mitra, A.K., Kingston, R.L., 2017. In vitro assembly of the Rous sarcoma virus capsid protein into hexamer tubes at physiological temperature. *Sci. Rep.* 7, 2913. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-02060-0>.
- Johnson, J.M., Willis, D.A., Young, M.J., Zlotnick, A., 2004. Interaction with capsid protein alters RNA structure and the pathway for in vitro assembly of cowpea chlorotic mottle virus. *J. Mol. Biol.* 335, 455–464. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.10.059>. PMID: 14672655.
- Johnson, J.M., Tang, J., Nyame, Y., Willis, D., Young, M.J., Zlotnick, A., 2005. Regulating self assembly of spherical oligomers. *Nano Lett.* 5, 765–770. <https://doi.org/10.1021/NI050274Q>.
- Kaczmarczyk, S.J., Sitarman, K., Young, H.A., Hughes, S.H., Chatterjee, D.K., 2011. Protein delivery using engineered virus-like particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 16998–17003.
- Kegel, W.K., Van Der Schoot, P., 2006. Physical regulation of the self assembly of tobacco mosaic virus coat protein. *Biophys. J.* 91, 1501. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYS.105.072603>.
- Kissmann, J., Ausar, S.F., Foubert, T.R., Brock, J., Switzer, M.H., Detzi, E.J., Vedvick, T. S., Middaugh, C.R., 2008. Physical stabilization of Norwalk virus like particles. *J. Pharm. Sci.* 97, 4208–4218. <https://doi.org/10.1002/JPS.21315>.
- Koudelka, K.J., Pitek, A.S., Manchester, M., Steinmetz, N.F., 2015. Virus-based nanoparticles as versatile nanomachines. *Annu. Rev. Virol.* 2, 379–401. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-100114-055141>.
- Koyani, R., Pérez Robles, J., Cadena Nava, R.D., Vazquez Duhalt, R., 2017. Biomaterial-based nanoreactors, an alternative for enzyme delivery. *Nanotechnol. Rev.* 6, 405–419. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0071>.
- Kozlovskaya, T.M., Gielens, I., Dreiling, D., Dislers, A., Baumanis, V., Ose, V., Pumpens, P., 1993. Recombinant RNA phage Q beta capsid particles synthesized and self assembled in *Escherichia coli*. *Gene* 137, 133–137. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90261-Z](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90261-Z).
- Kushnir, N., Streathfield, S.J., Yusibov, V., 2012. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* 31, 58–83. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2012.10.083>.
- Large, D.E., Soucy, J.R., Hebert, J., Auguste, D.T., 2019. Advances in receptor-mediated, tumor-targeted drug delivery. *Adv. Ther.* <https://doi.org/10.1002/adtp.201800091>.
- Lavelle, L., Gingery, M., Phillips, M., Gelbart, W.M., Knobler, C.M., Cadena Nava, R.D., Vega-Acosta, J.R., Pinedo-Torres, L.A., Ruiz-García, J., 2009. Phase diagram of self-assembled viral capsid protein polymorphs. *J. Phys. Chem. B* 113, 3813–3819. <https://doi.org/10.1021/jp8079765>.
- Le, D.T., Müller, K.M., 2021. In vitro assembly of virus-like particles and their applications. *Life* 11, 334. <https://doi.org/10.3390/11040334>, 2021.
- Le, D.T., Radukic, M.T., Müller, K.M., 2019. Adeno-associated virus capsid protein expression in *Escherichia coli* and chemically defined capsid assembly. *Sci. Rep.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54928-y>, 2019.
- Lenders, M., Stymann, J., Dünig, T., Schmitz, B., Brand, S.M., Brand, E., 2016. Serum-mediated inhibition of enzyme replacement therapy in Fabry disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 256–264. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014121226>.
- Levy, H.L., Hammersen, G., 1978. Newborn screening for galactosemia and other galactose metabolic defects. *J. Pediatr.* 92, 871–877. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(78\)80351-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(78)80351-5).
- Li, M., 2018. Enzyme Replacement therapy: a review and its role in treating lysosomal storage diseases. *Pediatr. Ann.* 47, e191–e197. <https://doi.org/10.3928/19382359-20180424-01>.
- Li, L., Xu, C., Zhang, W., Secundo, F., Li, C., Zhang, Z.-P., Zhang, X.-E., Li, F., 2019. Cargo-compatible encapsulation in virus-based nanoparticles. *Nano Lett.* 19, 2700–2706. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b00679>.
- Lipin, D.I., Chuan, Y.P., Lua, L.H.L., Middelberg, A.P.J., 2008. Encapsulation of DNA and non-viral protein changes the structure of murine polyomavirus virus-like particles. *Arch. Virol.* 153, 2027–2039. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0220-9>.
- Liu, J.L., Zabetakis, D., Breger, J.C., Anderson, G.P., Goldman, E.R., 2020. Multi-enzyme assembly on T4 phage scaffold. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 571. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00571/BIBTEX>.
- Luo, D., Carter, K.A., Miranda, D., Lovell, J.F., 2017. Chemophototherapy: an emerging treatment option for solid tumors. *Adv. Sci.* 4 <https://doi.org/10.1002/ADVS.201600106>.
- Lynch, A., Meyers, A.E., Williamson, A.L., Rybicki, E.P., 2012. Stability studies of HIV-1 Pr55gag virus-like particles made in insect cells after storage in various formulation media. *Virol. J.* 9, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-210>.
- Manolova, V., Place, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., Bachmann, M.F., 2008. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol.* 38, 1404–1413. <https://doi.org/10.1002/eji.200737984>.
- Marchetti, M., Faggiano, S., Mozzarelli, A., 2022. Enzyme replacement therapy for genetic disorders associated with enzyme deficiency. *Curr. Med. Chem.* 29, 489–525. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210526144654>.
- Marsian, J., Fox, H., Bahar, M.W., Kotecha, A., Fry, E.E., Stuart, D.I., Macadam, A.J., Rowlands, D.J., Lomonosoff, G.P., 2017. Plant made polio type 3 stabilized VLPs A candidate synthetic polio vaccine. *Nat. Commun.* 8, 245. <https://doi.org/10.1038/S41467-017-00090-W>.
- Mateu, M.G., 2013a. Introduction: the structural basis of virus function. *Subcell. Biochem.* 68, 3–51. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_1.
- Mateu, M.G., 2013b. Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Arch. Biochem. Biophys.* 531, 65–79. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2012.10.015>.
- Mellado, M.C.M., Mena, J.A., Lopes, A., Ramirez, O.T., Carrondo, M.J.T., Palomares, L. A., Alves, P.M., 2009. Impact of physicochemical parameters on in vitro assembly and disassembly kinetics of recombinant triple layered rotavirus like particles. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 674–686. <https://doi.org/10.1002/BIT.22430>.
- Minten, L.J., Nolte, R.J.M., Cornelissen, J.J.L.M., 2010. Complex assembly behavior during the encapsulation of green fluorescent protein analogs in virus derived protein capsules. *Macromol. Biosci.* 10, 539–545. <https://doi.org/10.1002/MABI.201000030>.

- Minten, L.J., Claessen, V.I., Blank, K., Rowan, A.E., Nolte, R.J.M., Cornelissen, J.J.L.M., 2011a. Catalytic capsids: the art of confinement. *Chem. Sci.* 2, 358–362. <https://doi.org/10.1039/c0sc00407c>.
- Minten, L.J., Wilke, K.D., Hendriks, L.J., van Hest, J.C., Nolte, R.J., Cornelissen, J.J., 2011b. Metal ion induced formation and stabilization of protein cages based on the cowpea chlorotic mottle virus. *Small* 7, 911–919. <https://doi.org/10.1002/smll.201001777>.
- Mitchell, M.J., Billingsley, M.M., Haley, R.M., Wechsler, M.E., Peppas, N.A., Langer, R., 2021. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20, 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.
- Muenzer, J., Bodamer, O., Burton, B., Clarke, L., Frenking, G.S., Giugliani, R., Jones, S., Rojas, M.V.M., Scarpa, M., Beck, M., Harmatz, P., 2012. The role of enzyme replacement therapy in severe Hunter syndrome—an expert panel consensus. *Eur. J. Pediatr.* 171, 181. <https://doi.org/10.1007/s00431-011-1606-3>.
- Mukerabigwi, J.F., Ge, Z., Kataoka, K., 2018. Therapeutic nanoreactors as in vivo nanoplatforms for cancer therapy. *Chem. Eur. J.* 1–20. <https://doi.org/10.1002/chem.201801159>.
- Mukherjee, S., Pfeifer, C.M., Johnson, J.M., Liu, J., Zlotnick, A., 2006. Redirecting the coat protein of a spherical virus to assemble into tubular nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2538–2539. <https://doi.org/10.1021/ja056656f>.
- Myhrvold, C., Polka, J.K., Silver, P.A., 2016. Synthetic lipid-containing scaffolds enhance production by colocalizing enzymes. *ACS Synth. Biol.* 5, 1396–1403. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00141>.
- Naskalska, A., Pyrc, K., 2015. Virus like particles as immunogens and universal nanocarriers. *Pol. J. Microbiol.* 64, 3–13. <https://doi.org/10.33073/pjm-2015-001>.
- Natarajan, P., Lander, G.C., Shepherd, C.M., Reddy, V.S., Brooks, C.L., Johnson, J.E., 2005. Exploring icosahedral virus structures with VIPER. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 809–817. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1283>.
- Noad, R., Roy, P., 2003. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 11, 438–444. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00208-7).
- Nooraei, S., Bahrulolul, H., Hosceini, Z.S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A.J., Ahmadian, G., 2021. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J. Nanobiotechnol.* 19, 59. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7>.
- Núñez-Rivera, A., Fournier, P.G.J., Arellano, D.L., Rodríguez-Hernández, A.G., Vázquez-Duhalte, R., Cadena-Nava, R.D., 2020. Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein J. Nanotechnol.* 11, 372–382. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.28>.
- Obermeyer, A.C., Capehart, S.L., Jarman, J.B., Francis, M.B., 2014. Multivalent viral capsids with internal cargo for fibrin imaging. *PLoS One* 9, e100678. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0100678>.
- Ondmijer, E.J.M., 2021. Stabilized Cowpea Chlorotic Mottle Virus as a Platform for Targeted Enzyme Replacement Therapy. Master Thesis. Eindhoven University of Technology, Netherlands, p. 87.
- O’Neil, A., Prevelige, P.E., Basu, G., Douglas, T., 2012. Coconfinement of fluorescent proteins: Spatially enforced communication of GFP and mCherry encapsulated within the P22 capsid. *Biomacromolecules* vol. 13, 3907. <https://doi.org/10.1021/bm301347x>.
- Padilla-Meier, G.P., Gilcrease, E.B., Weigle, P.R., Cortines, J.R., Siegel, M., Leavitt, J.C., Teschke, C.M., Casjens, S.R., 2012. Unraveling the role of the C-terminal helix turn helix of the coat-binding domain of bacteriophage P22 scaffolding protein. *J. Biol. Chem.* 287, 33766. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.393132>.
- Patterson, D.P., Prevelige, P.E., Douglas, T., 2012a. Nanoreactors by programmed enzyme encapsulation inside the capsid of the bacteriophage P22. *ACS Nano* 6, 5000–5009. <https://doi.org/10.1021/nn300545z>.
- Patterson, D.P., Schwarz, B., El-Boubbou, K., van der Oost, J., Prevelige, P.E., Douglas, T., 2012b. Virus-like particle nanoreactors: programmed encapsulation of the thermostable CelB glycosidase inside the P22 capsid. *Soft Matter* 8, 10158. <https://doi.org/10.1039/c2sm26485d>.
- Patterson, D.P., McCoy, K., Fijen, C., Douglas, T., 2014. Constructing catalytic antimicrobial nanoparticles by encapsulation of hydrogen peroxide producing enzyme inside the P22 VLP. *J. Mater. Chem. B* 2, 5948. <https://doi.org/10.1039/c4tb00983e>.
- Pearce, A.K., O’Reilly, R.K., 2019. Insights into active targeting of nanoparticles in drug delivery: advances in clinical studies and design considerations for cancer nanomedicine. *Bioconjugate Chem.* 30, 2300–2311. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.9B00456>.
- Peixoto, C., Sousa, M.F.Q., Silva, A.C., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M., 2007. Downstream processing of triple layered rotavirus like particles. *J. Biotechnol.* 127, 452–461. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2006.08.002>.
- Perlmutter, J.D., Mohajerani, F., Hagan, M.F., 2016. Many molecule encapsulation by an icosahedral shell. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.14078>.
- Platt, F.M., d’Azzo, A., Davidson, B.L., Neufeld, E.F., Tiff, C.J., 2018. Lysosomal storage diseases. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4>.
- Prevelige, P.E., Thomas, D., King, J., 1993. Nucleation and growth phases in the polymerization of coat and scaffolding subunits into icosahedral procapsid shells. *Biophys. J.* 64, 824. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81443-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81443-7).
- Rees, P., Wills, J.W., Brown, M.R., Barnes, C.M., Summers, H.D., 2019. The origin of heterogeneous nanoparticle uptake by cells. *Nat. Commun.* 10, 2341. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10112-4>.
- Reguera, J., Carreira, A., Riolobos, L., Almendral, J.M., Mateu, M.G., 2004. Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2724–2729. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0307748101>.
- Ren, J., Nichols, C.E., Chamberlain, P.P., Weaver, K.L., Short, S.A., Chan, J.H., Klein, J. P., Stammers, D.K., 2007. Relationship of potency and resilience to drug resistant mutations for GW420867X revealed by crystal structures of inhibitor complexes for wild type, Lys100Ile, Lys101Glu, and Tyr188Cys mutant HIV-1 reverse transcriptases. *J. Med. Chem.* 50, 2301–2309. <https://doi.org/10.1021/JM061117M>.
- Riehemann, K., Schneider, S.W., Luger, T.A., Godin, B., Ferrari, M., Fuchs, H., 2009. Nanomedicine – challenge and perspectives. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 48, 872–897. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200802585>.
- Samandoulgon, I., Hammani, R., Rayas, R.M., Fliss, I., Jean, J., 2015. Stability of secondary and tertiary structures of virus like particles representing Noroviruses: effects of pH, ionic strength, and temperature and implications for adhesion to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7680–7686. <https://doi.org/10.1128/AEM.01278-15>.
- Samandoulgon, I., Fliss, I., Jean, J., 2021. Adhesion of Norovirus to surfaces: contribution of thermodynamic and molecular properties using virus like particles. *Food Environ. Virol.* 13, 368–379. <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09471-3>.
- Sánchez-Sánchez, L., Cadena-Nava, R., Palomares, L., Ruiz-García, J., Koay, M., Cornelissen, J., Vázquez-Duhalte, R., 2014. Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus like nanoparticles containing cytochrome P450. *Enzym. Microb. Technol.* 60, 24–31.
- Sánchez-Sánchez, L., Tapia-Moreno, A., Juárez-Moreno, K., Patterson, D.P., Cadena-Nava, R.D., Douglas, T., Vázquez-Duhalte, R., 2015. Design of a VLP-nanovehicle for CYP450 enzymatic activity delivery. *J. Nanobiotechnol.* 13, 66. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0127-z>.
- Sanità, G., Carrese, B., Lamberti, A., 2020. Nanoparticle surface functionalization: how to improve biocompatibility and cellular internalization. *Front. Mol. Biosci.* 7, 587012. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587012>.
- Santi, L., Huang, Z., Mason, H., 2006. Virus like particles production in green plants. *Methods* 40, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.05.020>.
- Schlesinger, N., Yasothan, U., Kirkpatrick, P., 2011. Pegloticase. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 17–18. <https://doi.org/10.1038/NRD3349>.
- Schoonen, L., Van Hest, J.C.M., 2014. Functionalization of protein-based nanocages for drug delivery applications. *Nanoscale* 6, 7124–7141. <https://doi.org/10.1039/c4nr00915k>.
- Schoonen, L., Nolte, R.J.M., Van Hest, J.C.M., 2016. Highly efficient enzyme encapsulation in a protein nanocage: towards enzyme catalysis in a cellular nanocompartment mimic. *Nanoscale* 8, 14467–14472. <https://doi.org/10.1039/C6NR04181G>.
- Schwarz, B., Douglas, T., 2015. Development of virus-like particles for diagnostic and prophylactic biomedical applications. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 7, 722–735. <https://doi.org/10.1002/wnan.1336>.
- Selivanovitch, E., LaFrance, B., Douglas, T., 2021. Molecular exclusion limits for diffusion across a porous capsid. *Nat. Commun.* 12, 2903. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23200-1>.
- Servid, A., Jordan, P., O’Neil, A., Prevelige, P., Douglas, T., 2013. Location of the bacteriophage P22 coat protein C-terminus provides opportunities for the design of capsid-based materials. *Biomacromolecules* 14, 2989–2995. <https://doi.org/10.1021/BM400796C>.
- Stephanopoulos, N., Francis, M.B., 2011. Choosing an effective protein bioconjugation strategy. *Nat. Chem. Biol.* 7, 876–884. <https://doi.org/10.1038/nchembio.720>.
- Stirmemann, J.O., Belmatoug, N., Camou, F., Serratrice, C., Froissart, R., Caillaud, C., Levade, T., Astudillo, L., Serratrice, J., Brassier, A., Rose, C., De Villemeur, T.B., Berger, M.G., 2017. A review of Gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 441. <https://doi.org/10.3390/IJMS18020441>.
- Stubbs, G., Kendall, A., 2012. Helical viruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 726, 631–658. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9>.
- Tang, M., Odejinni, S.I., Vankayalapati, H., Wierenga, K.J., Lai, K., 2012. Innovative therapy for classic galactosemia – tale of two HTS. *Mol. Genet. Metabol.* 105, 44–55. <https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2011.09.028>.
- Tapia-Moreno, A., Juárez-Moreno, K., González-Davis, O., Cadena-Nava, R.D.R.D., Vázquez-Duhalte, R., 2017. Biocatalytic virus capsid as nanovehicle for enzymatic activation of Tamoxifen in tumor cells. *Biotechnol. J.* 12, 1600706–1600713. <https://doi.org/10.1002/biot.201600706>.
- Tekoa, Y., Tzaban, S., Kizhner, T., Hairichson, M., Gantman, A., Golemo, M., Aviezer, D., Shaaltiel, Y., 2013. Glycosylation and functionality of recombinant β -glucocerebrosidase from various production systems. *Biosci. Rep.* 33, 771–781. <https://doi.org/10.1042/BSR20130081>.
- Teschke, C.M., McGough, A., Thuman-Commike, P.-A., 2003. Penton release from P22 heat-expanded capsids suggests importance of stabilizing penton-hexon interactions during capsid maturation. *Biophys. J.* 84, 2585–2592. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75063-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75063-2).
- Thranse, S., Janitzek, C.M., Agerbæk, M., Ditlev, S.B., Resende, M., Nielsen, M.A., Theander, T.G., Salanti, A., Sander, A.F., 2015. A novel virus-like particle based vaccine platform displaying the placental malaria antigen VAR2CSA. *PLoS One* 10, e0143071. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0143071>.
- Thmnenmann, E.C., Le, D.H.T., Lomonosoff, G.P., Steinmetz, N.F., 2021. Bluetongue virus particles as nanoreactors for enzyme delivery and cancer therapy. *Mol. Pharm.* 18, 1150–1156. <https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.0C01053>.
- Tong, G.J., Hsiao, S.C., Carrico, Z.M., Francis, M.B., 2009. Viral capsid DNA aptamer conjugates as multivalent cell targeting vehicles. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 11174–11178. <https://doi.org/10.1021/ja903857f>.
- Tuladhar, E., Bouwknecht, M., Zwietering, M.H., Koopmans, M., Duizer, E., 2012. Thermal stability of structurally different viruses with proven or potential relevance to food safety. *J. Appl. Microbiol.* 112, 1050. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2012.05282.X>.

- Uchida, M., Manzo, E., Echeveria, D., Jiménez, S., Lovell, L., 2022. Harnessing physicochemical properties of virus capsids for designing enzyme confined nanocompartments. *Curr. Op. Virol.* 52, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.12.012>.
- Vashist, S.K., Venkatesh, A.G., Mitsakakis, K., Cziliwik, G., Roth, G., von Stetten, F., Zengerle, R., 2012. Nanotechnology based biosensors and diagnostics: technology push versus industrial/healthcare requirements. *Bionanoscience* 2, 115–126. <https://doi.org/10.1007/s12668-012-0047-4>.
- Vega Acosta, J.R., Cadena Nava, R.D., Gelbart, W.M., Knobler, C.M., Ruiz García, J., 2014. Electrophoretic mobilities of a viral capsid, its capsid protein, and their relation to viral assembly. *J. Phys. Chem. B* 118, 1984–1989. <https://doi.org/10.1021/jp407379i>.
- Verma, I.M., Weitzman, M.D., 2005. Gene therapy: twenty first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 711–738. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.74.050304.091637>.
- Vernon, H.J., 2015. Inborn errors of metabolism: advances in diagnosis and therapy. *JAMA Pediatr.* 169, 778–782. <https://doi.org/10.1001/JAMAPEDIATRICS.2015.0754>.
- Vervoot, D.F.M., Heiringhoff, R., Timmermans, S.B.P.E., Van Stevendaal, M.H.M.E., Van Hest, J.C.M., 2021. Dual site-selective presentation of functional handles on protein-engineered Cowpea chlorotic mottle virus-like particles. *Bioconjugate Chem.* 32, 958–963. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.1C00108>.
- Villagrana-Escareño, M.V., Reynaga-Hernández, E., Galicia-Cruz, O.G., Durán-Meza, A. L., De La Cruz-González, V., Hernández-Carballo, C.Y., Ruiz-García, J., 2019. VLPs derived from the CCMV plant virus can directly transfect and deliver heterologous genes for translation into mammalian cells. *BioMed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2019/4630891>, 2019.
- Wang, Y., Uchida, M., Waghwan, K., Douglas, T., 2020. Synthetic virus-like particles for glutathione biosynthesis. *ACS Synth. Biol.* 12, 3298–3310. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00368>.
- Whitacre, D.C., Lee, B.O., Milich, D.R., 2009. Use of hepatitis virus core proteins as vaccine platforms. *Expert Rev. Vaccines* 8, 1565. <https://doi.org/10.1586/ERV.09.121>.
- Witherell, G.W., Uhlenbeck, O.C., 1989. Specific RNA binding by Q beta coat protein. *Biochemistry* 28, 71–76. <https://doi.org/10.1021/B100427A011>.
- Wolf, D.A., Banerjee, S., Hackett, P.B., Whitley, C.B., McIvor, R.S., Low, W.C., 2015. Gene therapy for neurologic manifestations of mucopolysaccharidoses. *Expert Opin. Drug Deliv.* 12, 283–296. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.966682>.
- Wu, F.C., Zhang, H., Zhou, Q., Wu, M., Ballard, Z., Tian, Y., Tian, Y., Wang, J.Y., Huang, Y., 2014. Expanding the genetic code for site-specific labelling of tobacco mosaic virus coat protein and building biotin functionalized virus-like particles. *Chem. Commun.* 50, 4007–4009. <https://doi.org/10.1039/c3cc49137d>.
- Wynne, K., Devereaux, B., Dornhorst, A., 2019. Diabetes of the exocrine pancreas. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 34, 346–354. <https://doi.org/10.1111/JGH.14451>.
- Xu, Y., Ye, J., Liu, H., Cheng, E., Yang, Y., Wang, W., Zhao, M., Zhou, D., Liu, D., Fang, R., 2008. DNA templated CMV viral capsid proteins assemble into nanotubes. *Chem. Commun.* 49–51. <https://doi.org/10.1039/B715299J>, 2008.
- Xu, S., Lun, Y., Frascella, M., Garcia, A., Soska, R., Nair, A., Ponery, A.S., Schilling, A., Feng, J., Tuske, S., Valle, M.C. Della, Martina, J.A., Ralston, E., Gotschall, R., Valenzano, K.J., Puertollano, R., Do, H.V., Raben, N., Khanna, R., 2019. Improved efficacy of a next-generation ERT in murine Pompe disease. *JCI Insight* 4, e125358. <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.125358>.
- Xu, C., Zhu, W., Mao, H., Zhang, W., Yin, G. Q., Zhang, X. E., Li, F., 2020. Switch from polymorphic to homogenous self-assembly of virus-like particles of Simian virus 40 through double-cysteine substitution. *Small* 16, 2004484. <https://doi.org/10.1002/smll.202004484>.
- Yoo, J., Park, C., Yi, G., Lee, D., Koo, H., 2019. Active targeting strategies using biological ligands for nanoparticle drug delivery systems. *Cancers* 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11050640>.
- Zakeri, B., Fierer, J.O., Celik, E., Chittock, E.C., Schwarz-Linek, U., Moy, V.T., Howarth, M., 2012. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E690–E697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115485109>.
- Zeltins, A., 2013. Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol. Biotechnol.* 53, 92–107. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9598-4>.
- Zheng, X., Zhang, P., Fu, Z., Meng, S., Dai, L., Yang, H., 2021. Applications of nanomaterials in tissue engineering. *RSC Adv.* 11, 19041–19058. <https://doi.org/10.1039/D1RA01849C>.
- Zlotnick, A., 1994. To build a virus capsid: an equilibrium model of the self-assembly of polyhedral protein complexes. *J. Mol. Biol.* 241, 59–67. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1473>.

Anexo 5

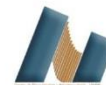
Contribución con el artículo “*Volviendo aliados a los pequeños enemigos*” y fotografía de portada en la Gaceta UNAM Ensenada No. 42.





Volviendo aliados a los pequeños enemigos

Pedro Antonio Garza López^{1,2}, Rafael Vázquez Dabalt¹
 CNYN-UNAM- Departamento de Bionanotecnología
¹ayogarza@cncias.unam.mx
²rvd@cnyunam.mx

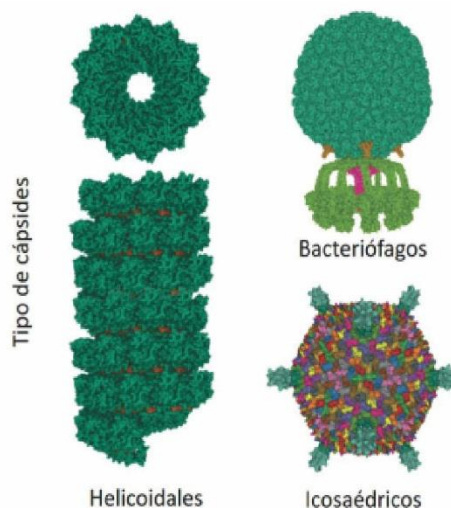


Mucho se ha discutido sobre el origen de los virus y su impacto en la biología de los seres vivos pues no se puede pasar desapercibido el alcance que representan algunos virus en la salud humana. En el camino para entender la naturaleza de los virus y poder desarrollar estrategias que contrarresten el peligro que representan a la salud pública, se han adquirido grandes conocimientos sobre la biología de estas pequeñas entidades. Con la invención del microscopio electrónico se han descubierto las fabulosas geometrías y caprichosos arreglos que yacen en la arquitectura intrínseca de los virus. El estudio de los virus ha traído grandes beneficios para la humanidad y ha dado luz a innovadoras aplicaciones tecnológicas en la nanomedicina.

Viruses: making friends with old foes, o “*Viruses: haciendo amigos a los viejos enemigos*” es el título de una publicación de Douglas Trevor y Mark Young en 2006 y ha sido motivación de esta publicación. Los autores proponen una nueva perspectiva al mundo de los virus para alumbrar las grandes propiedades y potencialidades que los virus aguardan. El presente texto está inspirado en la tecnología basada en virus y el beneficio que representa para la humanidad.

Los virus son entidades biológicas que han acompañado a los seres vivos en el planeta durante el sendero de la evolución, surgiendo de manera paralela un efecto de co-evolución. Al infectar, los virus toman la maquinaria celular para su replicación, produciendo múltiples copias con alta posibilidad de mutaciones que puede resultar en mayor potencial infeccioso. Por su parte, los organismos desarrollan mecanismos celulares para contrarrestar los efectos virales y sobrevivir. Los virus poseen gran plasticidad genética, pero son muy específicos con respecto a la especie, tipo de célula o tejido que infectan. No obstante, existe el fenómeno de zoonosis por virus, poco convencional, que ocurre cuando un virus migra de otro animal al humano. Sin embargo, no se han descrito virus que puedan saltar entre especies de diferentes reinos.

Los virus están formados por biomacromoléculas. Los ácidos nucleicos son su principal componente, en ellos yace la información genética configurada en ARN, ADN o ambas y la capacidad para replicarse e infectar las células hospederas. El material genético se almacena en una estructura hueca llamada cápside viral formada por proteínas. Las formas más comunes son las cápsides icosaédricas o cuasiesféricas, helicoidales y los bacteriófagos. Los virus son de tamaño nanométrico y la morfología depende de la especie. Algunas cápsides tienen recubrimiento membranoso de capas lipídicas y pueden tener proteínas ancladas en su superficie para el reconocimiento específico de la célula que infectan.



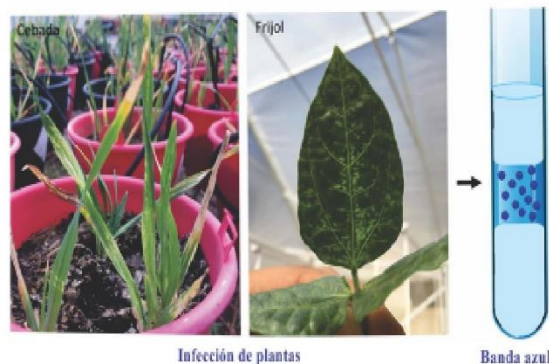
Biotechnológicamente, las cápsides virales o *Virus-Like Particles* (VLPs) han cobrado importancia en el campo de la nanotecnología y la bionanomedicina. Para aplicaciones biomédicas, las cápsides virales son aisladas del material genético eliminando el potencial infeccioso del virus original. Por tanto, las cápsides virales vacías resultan ser nanotenedores altamente seguros con la capacidad de albergar una amplia variedad de moléculas. Las vacunas son el uso más aprovechado de las VLPs. No obstante, se están utilizando las VLPs para encapsular materiales como, metales, medicamentos, catalizadores, biomoléculas, incluso algunas VLPs exhiben propiedades eléctricas.

Nuevas aplicaciones de las VLPs se están explorando gracias a su capacidad de contener moléculas en su estructura y funcionar como nanoplateforma. Las VLPs resultan ser altamente útiles para el acarreo de fármacos o moléculas de interés biomédico. Por ejemplo, para el acarreo de fármacos poco solubles o inestables en condiciones fisiológicas. También las cápsides virales pueden ser cargadas con macromoléculas como proteínas, o ácidos nucleicos útiles en la terapia génica. Además, las cápsides pueden ser funcionalizadas en su superficie externa para ser más afines a las células o tejidos donde se desea dirigir su actividad.

Actualmente, en el laboratorio de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM se están desarrollando nuevas tecnologías basadas en cápsides de virus de plantas. En este nicho de investigación, se están diseñando nuevos arreglos basados en las VLPs del BMV

(*Brome Mosaic Virus*) y CCMV (*Cowpea Chlorotic Mottle Virus*) para el acarreo de moléculas cargo de interés biomédico. Estas VLPs han demostrado ser altamente eficientes y seguras para el cargo de biomoléculas como enzimas, polipéptidos, ácidos nucleicos, y de pequeños compuestos hidrofóbicos, pro-fármacos y antibióticos. Sus aplicaciones se están focalizando principalmente en el desarrollo de terapias inteligentes para el tratamiento de cáncer y la terapia por reemplazo enzimático.

Para producir las VLPs del BMV y CCMV los investigadores de este laboratorio cultivan plantas de cebada y frijol (caupí) las cuales son infectadas con los virus BMV y CCMV, respectivamente. Tras la infección, el virus aumenta su población en las plantas. Cuando se alcanza un alto grado de infección, las hojas muestran manchas amarillas o clorosis. Los investigadores cosechan las hojas cloróticas y las llevan a un proceso de extracción de virus. Después, el virus extraído lo purifican, colocándolo sobre un gradiente de densidad de sacarosa en un tubo el cual se centrifuga, al finalizar la centrifugación el virus queda suspendido en la fase intermedia del gradiente. Para revelar la presencia del virus, en oscuridad incidiendo luz blanca, se observa la aparición de una fase azul incidiendo luz blanca, se observa la aparición de una fase azul en medio del tubo de centrifuga. La banda o fase azul es evidencia de la presencia del virus debido a que el BMV y el CCMV tienen la capacidad de dispersar la luz azul y este

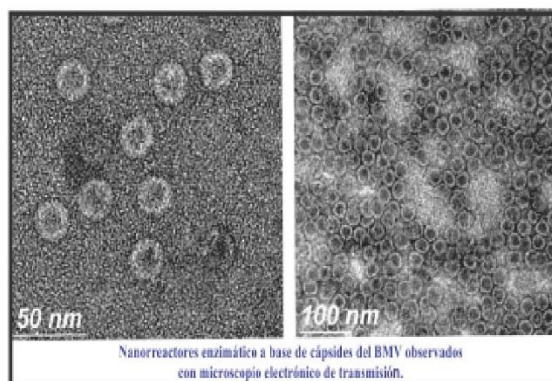


fenómeno se ilustra en la portada de esta edición.

Las cápsides del BMV y CCMV pueden albergar moléculas en su interior hueco, o tener anclados en su superficie agentes de interés. Dependiendo del sitio donde se desea compartimentalizar la molécula de interés se selecciona el mecanismo para el cargo de moléculas. El método de autoensamble es ampliamente utilizado para el cargo de moléculas en el interior de las cápsides. Está basado en la capacidad intrínseca de las cápsides para formarse de manera

espontánea al modular las condiciones de pH y concentración iónica del medio. Cuando las cápsides están desensambladas se combinan con las moléculas cargo y se llevan a condiciones de autoensamble, surgiendo así el fenómeno de atrapamiento. Las VLPs cargadas son llevadas a estrictos procesos de purificación para su posterior caracterización y descripción. Al derivar de virus de plantas, las cápsides del BMV y CCMV son altamente seguras y biocompatibles para el cargo y acarreo de moléculas de interés biomédico.

Las VLPs pueden contener enzimas activas en su interior y al arreglo resultante se le considera nanorreactor enzimático. Los nanorreactores enzimáticos pueden efectuar reacciones bioquímicas específicas y ser de gran utilidad en la biomedicina. En el sistema de VLPs se aprovecha la porosidad intrínseca de las cápsides para permitir el flujo de los elementos de la reacción. Los nanorreactores enzimáticos basados VLPs son biológicamente compatibles y reducen la degradación de las enzimas, incrementando su eficiencia. El potencial de los nanorreactores enzimáticos está cobrando auge en aplicaciones para combatir enfermedades como el cáncer o enfermedades relacionadas con la deficiencia de enzimas endógenas.



Finalmente, algunos virus pueden representar problemas en la salud pública. No obstante, estas entidades biológicas han convivido con los organismos en la historia de la evolución. El entendimiento de los virus ha proveído un nuevo panorama para resolver problemas de la actualidad. *Volviendo aliados a los pequeños enemigos* la tecnología basada en las cápsides virales ofrece un nuevo futuro de posibilidades. #

Referencias

- Douglas T. y Young M. (2006). Viruses: making friends with old foes. *Science*, 12:312(5775): 873-5.
- Wessner, D.R. (2010). The Origins of Viruses. *Nature Education* 3(9): 37.
- Nasir, A., Kim, K. M., & Caetano-Anollés, G. (2012). Viral evolution: Primordial cellular origins and late adaptation to parasitism. *Mobile genetic elements*, 2(5), 247-252.