



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



DISEÑO DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRALES BIOCATALÍTICAS

Lorena Sánchez-Sánchez, Laura Palomares Aguilera, Rafael Vázquez-Duhalt
Instituto de Biotecnología, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Cuernavaca CP. 62210,
lsanchez@ibt.unam.mx

Palabras clave: Nanomedicina, partículas pseudovirales, CYP450.

Introducción. Hoy en día la utilización de enzimas como agentes terapéuticos es un área de desarrollo importante dentro del área farmacéutica (1). Un grupo de enzimas médicamente relevantes son los citocromos P450 (CYP450), debido a que son los responsables de la activación de profármacos quimioterapéuticos (2). Sin embargo las proteínas como biofármacos presentan ciertas limitaciones, dentro de las que se encuentran, la susceptibilidad a degradación por proteasas y la inhabilidad de éstas para ser dirigidas y entrar a las células deseadas.

Es por ello que en el presente proyecto encapsulamos, dentro de partículas pseudovirales derivadas de la proteína de cápside VP6 de rotavirus (3), a un CYP450, con el fin de aprovechar las características de estas nanopartículas, en particular la gran capacidad de carga que poseen y la propiedad de ser dirigidas hacia células determinadas, como un modelo para el diseño de nanovehículos para el transporte de enzimas con aplicaciones médicas.

Metodología. Se llevó a cabo la expresión y purificación del CYPBM3 "21B3" de acuerdo al protocolo publicado por Cirino y Arnold, 2003 (4). Se realizó el desensamblaje de VP6 con 500 mM de CaCl_2 y se agregó un exceso de 500 CYP por cada nanotubo de proteína viral, posteriormente se re-ensambló VP6 en presencia de la enzima eliminando por diálisis los iones de calcio. Se llevó a cabo una cromatografía de filtración en gel en HPLC del encapsulamiento y se midió la actividad contra 2,6-DMP de cada una de las fracciones colectadas. Finalmente se observaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM) las nanoestructuras generadas.

Resultados. El CYPBM3 a ser encapsulado dentro de las nanoestructuras de VP6 fue expresado en *E. coli* y purificado obteniendo 50 mg por litro de cultivo.

Al evaluar la formación de partículas pseudovirales con el biocatalizador (Fig. 1), se encontró actividad peroxigenasa en la fracción correspondiente al tiempo de retención de las nanoestructuras de VP6 (4 min), lo que nos indica que el CYP se encuentra asociado a estas partículas pseudovirales.

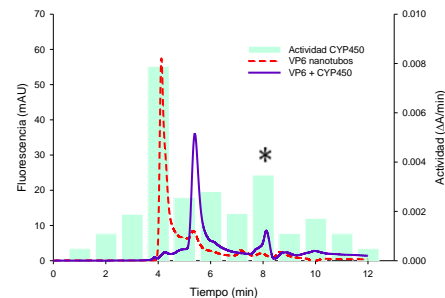


Fig. 1. Cromatografía de filtración en gel del ensayo de encapsulamiento (Ex = 270, Em= 350). (* actividad del CYP450 libre).

Las nanoestructuras generadas después del ensayo de encapsulamiento (Fig. 2) corresponden a partículas esféricas de alrededor de 75 nm de diámetro con la enzima en su interior.

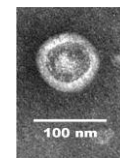


Fig. 2. TEM de las nanoestructuras esféricas de VP6 generadas al encapsular el CYP. (Tinción negativa 3% acetato de uranilo). 140 000 X

Conclusiones. Se ha logrado purificar el CYPBM3 "21B3", enzima modelo que se ha utilizado para ser encapsulada en nanoestructuras de VP6. Se ha logrado encapsular a este CYP dentro de partículas pseudovirales derivadas de VP6, encontrando actividad en la fracción correspondiente a nanoestructuras, y corroborando por microscopía de transmisión electrónica la formación de esferas de VP6.

Agradecimiento. Se agradece a CONACYT por la beca doctoral de L.S.S.

Bibliografía.

1. Wagner V, Dullart A, Bock A, Zweck A. (2006). *Nat. Biotechnol.* 24 (10): 1211-1217.
2. Huttunen K, Mahonen N, Raunio H, Rautio, J. (2008) *Curr. Med. Chem.* 15 (23): 2346-2365.
3. Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, Lepault J, Kohli E, Pothier P, Prasad V, Cohen J, Rey F. (2001). *EMBO J.* 20 (7): 1498-1497.
4. Cirino P, Arnold F. (2003). *Angew. Chem.* 42: 3299-3301.