

DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS PROTEÍICAS INSPIRADAS EN CÁPSIDES VIRALES Y SU USO COMO SISTEMAS DE ENTREGA DE DNA

David Silverio Moreno-Gutiérrez¹, Ximena del Toro-Ríos¹, Natalia J. Martínez-Sulvaran¹, Mayra B. Pérez-Altamirano¹ & Armando Hernández-García¹, ¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04100. Correo: armandohg@iquimica.unam.mx

Palabras clave: virus artificiales, viromimetismo, sistemas de entrega

Introducción. Las partículas virales son altamente eficientes para entregar ácidos nucleicos a células, por lo que contar con una nanopartícula viromimética tendría muchas aplicaciones potenciales(1). Previamente diseñamos una proteína sintética “CSB” inspirada en la proteína de cápside del Virus del Mosaico del Tabaco. CSB une a DNA y se ensambla con ella en nanorodillos(2), sin embargo transfecta células humanas muy ineficientemente(3). Inspirados en el funcionamiento de los virus, rediseñamos la proteína CSB para poder transfectar de manera eficiente y específica células humanas.

En este trabajo programamos la transfección celular eficiente de la proteína CSB mediante su fusión con transferrina o el péptido aureína, los cuales son conocidos por permitir la entrada de nanopartículas (NPs) a células humanas (4).

Metodología. Se produjeron en *P. pastoris* las proteínas CSB, CB, Aur-CSB y Aur-CB (fusionadas a Aureína) (4) y se purificaron mediante precipitación fraccionada. La proteína CSB se conjugó químicamente a la proteína Transferrina para obtener Tf-CSB. Usando electroforesis se evaluó su unión a DNA y su estabilidad en distintos medios biológicos. Con microscopía de fuerza atómica y electrónica de transmisión se caracterizaron las NPs formadas. Usando microscopía de fluorescencia (epi- y confocal) se evaluó *in vitro* la eficiencia de transfección de las NPs en línea tumoral de glioblastoma U251.

Resultados. Se diseñaron y produjeron 3 proteínas Aur-CSB, Aur-CB y Tf-CSB (Fig. 1) las cuales unen a DNA de manera eficiente y forman NPs tipo rodillo. Con dsDNA de 742 pb los nanorodillos tuvieron una longitud entre 133 y 168 nm para CSB, Tf-CSB y Aur-CSB, mientras que fue de 301-340 nm para CB y Aur-CB. Las NPs solo se desensamblan en presencia de heparina a concentración mayor a la presente en suero (1-2 ng/uL). Mas del 80% de las NP de Au-CB, Au-CSB, CB, CSB y Tf-CSB se desensamblaron an heparina > a 1.5, 2, 3, 4 y >8 ng/uL, respectivamente. No se observó desensamble ni daño al DNA cuando las NP fueron incubadas 24h en medio Opti-MEM.

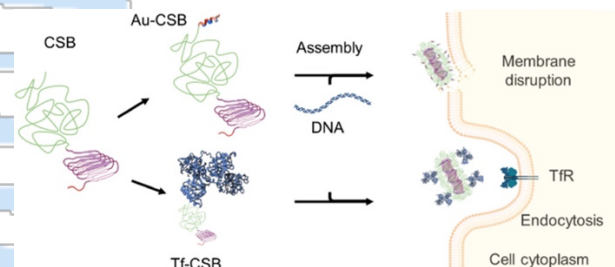


Fig. 1. Diseño de las proteínas que forman NP con DNA y que internalizan células mamíferas de manera programada vía módulos de direccionamiento (4).

La NP formadas con Aur-CSB, Tf-CSB y Aur-Tf-SCB mostraron mayor transfección celular que CSB (Fig. 2). Aur-CSB mejoró 7.5 veces la entrada respecto a CSB, Tf-CSB 6 veces y la Aur-Tf-CSB 8 veces. Este último trasfectó hasta 70% de las células observadas, especialmente 1h despues de incubación.

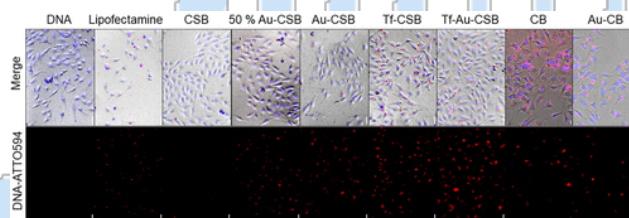


Fig. 2. Transfección de células U251 despues de 24h de incubación con las NP formadas con proteína y dsDNA 749 pb marcado con Atto594. Imágenes de microscopía de epi-fluorescencia (4).

Conclusiones. Diseñamos proteínas inspiradas en virus con alta capacidad programada de entrada / transfección *in vitro* de células mamíferas vía la adición de péptidos y/o proteínas de direccionamiento.

Agradecimiento. CONAHCyT Frontera de la Ciencia 2019 (160671) y UC MEXUS-CONACyT Collaborative Research Grant 2019 (CN-19-118).

Bibliografía.

1. Mastrobattista, E, et. al. (2006). *Nature Rev. Drug Discov.* 5:115-121.
2. Hernandez-Garcia A, et. al. (2014). *Nat Nanotechnol.* 9: 698-702.
3. Shehrazade J. et. al. (2017). *Nucleic Acid Ther.* 27(3): 159-167.
4. Moreno-Gutierrez D, et. al. (2023). *Biomacromolecules.* 24(4): 1563-1573.