



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**VIROMIMÉTICA: DESARROLLO Y ESTUDIO DE NANOPARTÍCULAS TIPO VIRUS ARTIFICIAL
COMO SISTEMAS DE ENTREGA DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

DAVID SILVERIO MORENO GUTIÉRREZ

TUTOR PRINCIPAL:

**DR. ARMANDO HERNÁNDEZ GARCÍA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**DRA. LAURA ALICIA PALOMARES AGUILERA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

**DR. JOSÉ UTRILLA CARRERI
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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 titular de los Derechos de Autor.

Jurado revisor

Presidente:

Dra. Leticia Moreno Fierros

Vocales:

Dr. José Arcadio Farias Rico

Dra. Alejandra Hernández Santoyo

Dr. Ismael Bustos Jaimes

Secretario:

Dr. Armando Hernández García

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca: 662246 y al programa UC MEXUS-CONACyT (CN-19-118) por el apoyo durante mi estancia en UCLA.

Al Instituto de Química por su apoyo para la realización de mi estancia en UCLA.

Al Dr. Armando Hernández García (Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, UNAM) por su asesoría durante el desarrollo de este proyecto y publicación de manuscritos derivados de éste.

A los miembros del comité tutor, Dra. Laura A. Palomares (Instituto de Biotecnología) y Dr. José Utrilla Carreri (Centro de Ciencias Genómicas) por todo su apoyo, sus críticas y discusiones sobre mi trabajo a lo largo de todo el doctorado.

A los miembros del jurado: Dra. Leticia Moreno Fierros, Dra. Alejandra Hernández Santoyo, Dr. José Arcadio Farias Rico y Dr. Ismael Bustos Jaimes, por sus críticas y discusiones sobre el trabajo.

A los técnicos del Instituto de Química, M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz, M. en C. Lucía del Carmen Márquez, M. en C. Teresa Ramírez Apan, Dra. Adriana Romo Pérez y Q. María de la Paz Orta Pérez.

Al Dr. Federico del Río Portilla, Dr. Enrique García Hernández, Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig, Dr. Roberto Arreguín Espinosa, Dr. Jorge Peón Peralta, Dr. Arturo Jiménez Sánchez y Dr. Fatuel Tecuapetla, por sus recomendaciones y préstamo de reactivos y equipos.

Al Dr. Luis Vaca Domínguez y su equipo de trabajo, el Dr. Jesús Zepeda Cervantes y la Dra. Alicia Sampieri.

A la Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez, y su equipo de trabajo, Dra. Rosa Cárdenas Guerra, Dra. Karla Rodríguez Hernández y Técnico Ignacio Martínez Martínez.

A la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Biomédicas, al Dr. Mauricio Trujillo Roldán, la Dra. Adriana Valdés Cruz y al Técnico Diego Rosiles Becerril.

Al Dr. William Gelbart (UCLA) y su grupo de trabajo por su asesoría y apoyo durante mi estancia en su laboratorio.

A todos los compañeros del laboratorio y del IQ con los que coincidí por su enorme apoyo y tiempos felices compartidos.

A mi familia que siempre me ha apoyado y motivado para seguir.

Contenido

Lista de abreviaturas	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tablas	xi
Resumen	1
1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	5
2.1 Entrega de ácidos nucleicos	5
2.2 Vectores para la entrega de ácidos nucleicos	5
2.2.1 Vectores virales	6
2.2.2 Vectores no virales	8
2.3 Viromimética	10
2.4 Proteínas CSB	15
2.4.1 Modificaciones a las proteínas tipo virus artificial	17
3. Justificación	20
4. Hipótesis	21
5. Objetivos	21
6. Objetivos específicos	21
7. Materiales y métodos	22
7.1 Oligonucleótidos y plásmidos.....	22
7.2 Modificación de CSB mediante técnicas de DNA recombinante.....	22
7.3 Generación de cepas de levadura recombinantes	24
7.4 Producción de las proteínas CSB	25
7.5 Purificación de las proteínas CSB	26
7.6 Caracterización de las proteínas CSB	27
7.7 Formación de AVLPs.....	28
7.8 Ensayo del cambio de la movilidad electroforética	28
7.9 Caracterización morfológica de las AVLPs.....	29
7.10 Dispersión dinámica de luz	29
7.11 Ensayo de estabilidad con Heparina	30
7.12 Pruebas de estabilidad.....	30
7.13 Pruebas de inmunogenicidad de las AVLP	30
7.14 Detección de anticuerpos específicos contra las AVLPs o vVAA.....	31
7.15 Conjugación química de Tf y CSB	32
7.16 Evaluación de la entrada de AVLPs a células	33

7.17	Análisis de la distribución intracelular de las AVLPs	34
7.18	Ensayo de citotoxicidad de las AVLPs	34
7.19	Evaluación de eficiencia de transfección de AVLPs con mRNA.....	35
7.20	Producción de mRNA replicante.....	35
7.21	Cuantificación de mRNA en células transfectadas con AVLPs	36
7.22	Análisis estadístico.....	36
8.	Resultados y discusión	37
8.1	Producción, purificación y caracterización de proteínas modulares	37
8.2	Formación de AVLPs con pDNA.....	38
8.3	Caracterización morfológica de AVLPs con pDNA.....	39
8.4	Diámetro hidrodinámico y potencial ζ de las AVLPs	40
8.5	Evaluación de la estabilidad de las AVLPs	42
8.6	Evaluación de la respuesta inmune humoral de las AVLPs	45
8.7	Modificación de los módulos de CSB mediante clonación.....	51
8.8	Producción y purificación de proteínas modificadas	56
8.9	Formación de AVLPs con Tf-CSB.....	58
8.10	Formación de AVLPs con Tf mediante conjugación química	65
8.11	Estudio preliminar de la entrega de ácidos nucleicos con Tf-CSB	67
8.12	Formación de AVLPs con Au-CSB y Au-CB.....	68
8.13	Caracterización morfológica de las AVLPs	69
8.14	Evaluación de la estabilidad de AVLPs	70
8.15	Entrega de ácidos nucleicos a células con las AVLPs	73
8.16	Localización intracelular de las AVLPs	77
8.17	Citotoxicidad de las AVLPs	78
8.18	Eficiencia de transfección de AVLPs con mRNA.....	79
9.	Discusión general.....	83
10.	Conclusiones.....	89
11.	Perspectivas.....	90
12.	Referencias	91
13.	Producción científica:.....	103

Lista de abreviaturas

Ady	Adyuvante
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AOX	Gen de la alcohol oxidasa
Au	Aureína 1.2
Au-CB	Fusión recombinante de aureína 1.2 y CB
<i>Au-CB</i>	Gen codificante para la fusión Au-CB
Au-CSB	Fusión recombinante de aureína 1.2 y CSB
<i>Au-CSB</i>	Gen codificante para la fusión Au-CSB
AVLPs	Partículas tipo virus artificiales
BCA	Ensayo de ácido bicinconínico
<i>CB</i>	Gen de CB
CFDA	China Food and Drug Administration
CICUAL	Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
<i>CSB</i>	Gen de CSB
D _H	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMEM	Medio Eagle modificado de Dubelcco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dsDNA	DNA de doble cadena
DTT	1,4-Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eGFP	Proteína verde fluorescente mejorada
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción acoplado a enzimas
EMA	European Medicines Agency
EMSA	Ensayo del cambio de la movilidad electroforética
eYFP	Proteína amarillo fluorescente mejorada
FDA	U.S. Food and Drug Administration
gc	Copias genómicas
HEP	Heparina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-sulfónico
IDT	Integrated DNA technologies
IFC	Instituto de Fisiología Celular
MALDI-TOF	Espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz
MD	Medio mínimo con dextrosa
MFDS	Ministry of Food and Drug Safety de Korea
MGY	Medio mínimo con glicerol
MI	Medio mínimo de inducción
MPM	Marcador de peso molecular
mRNA	RNA mensajero
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difenil tetrazolio
MWCO	Punto de corte de peso molecular

N/P	Relación molar entre las cargas positivas de los grupos amino de las lisinas del bloque B de las proteínas CSB o CB con respecto a las cargas negativas de los grupos fosfatos del ácido nucleico.
NEB	New England Biolabs
OD	Densidad óptica
Opti-MEM	Medio esencial mínimo de suero reducido
PA	Probabilidad de azar
PANAM	Poli(amidoamina)
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCC	Coeficiente de colocación de Pearson
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
pDNA	DNA plasmídico
PDVF	Fluoruro de polivinilideno
PE	Probabilidad experimental
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
qPCR	Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
rTf-CSB	Fusión recombinante de transferrina y CSB
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en geles de acrilamida
SFB	Suero Fetal Bovino
siRNA	RNA de silenciamiento
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato)
SV40	Virus 40 vacuolado del simio
TAT	Transactivador de transcripción
TCEP	Tris (2-carboxietil) fosfina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Tf	Transferrina
<i>Tf</i>	Gen de transferrina
Tf-CSB	Fusión de transferrina y CSB
<i>Tf-CSB</i>	Gen codificante para la fusión recombinante TF-CSB
TMB	3,3',5,5"- tetrametilbendicina
TMV	Virus del mosaico del tabaco
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U.A.	Unidades de absorbancia
vAAV	Vector de virus adeno-asociado
vAdV	Vector de adenovirus
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
vVHA	Vector de Virus de Herpes Simple
WB	Western-Blot
YNB	Base de nitrógeno de levadura
YPD	Medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa

Índice de figuras

Figura 1. Ejemplos de viromimética.....	13
Figura 2. Diseño de proteínas viromiméticas CSB.....	17
Figura 3. Diseño de los plásmidos para la producción recombinante de las fusiones Tf-CSB y Au-CSB.....	24
Figura 4. Producción de proteínas en <i>K. phaffii</i>	37
Figura 5. Determinación del peso molecular de las proteínas modulares mediante espectrometría de masas.....	38
Figura 6. Formación de AVLPs con pDNA.....	39
Figura 7. Caracterización morfológica de AVLPs de CB y CSB con pDNA.....	40
Figura 8. Análisis de AVLPs mediante dispersión dinámica de luz.....	41
Figura 9. Estabilidad de AVLPs en heparina.....	42
Figura 10. Estabilidad de las AVLPs formadas con CB o CSB y pDNA en medio de cultivo Opti-MEM, DMEM o DMEM suplementado con SFB al 5 %.....	44
Figura 11. Estabilidad de las AVLPs formadas con CB o CSB y pDNA en medio de cultivo DMEM suplementado con altos porcentajes de SFB.....	44
Figura 12. Estandarización de la concentración de antígeno adsorbido a la placa en el ensayo de ELISA.....	47
Figura 13. Comparación de inducción de producción de anticuerpos IgG entre las AVLPs y vVAA.....	48
Figura 14. Producción de anticuerpos IgG contra AVLPs tras la inmunización con altas dosis.....	49
Figura 15. Títulos de anticuerpos de sueros de ratones inmunizados con AVLPs o vVAA.....	50
Figura 16. Detección de CSB y CB mediante WB con los sueros de ratones inmunizados con altas dosis de proteína de CSB o AVLPs.....	51
Figura 17. Esquema de las modificaciones propuestas a las proteínas CSB para facilitar su entrada a las células.....	52
Figura 18. Diseño mediante bloques de las modificaciones a las proteínas.....	52
Figura 19. Productos de PCR para la fusión <i>Tf-CSB</i>	53
Figura 20. Análisis de PCR del plásmido pPIC9- <i>Tf-CSB</i>	54
Figura 21. Productos de PCR con los cebadores para adicionar la secuencia del bloque Au a CSB y CB.....	54

Figura 22. Perfil de digestión de plásmidos pPIC9- <i>Au-CSB</i> y pPIC9- <i>Au-CB</i> con las enzimas de restricción XhoI y NotI.....	55
Figura 23. Análisis de las colonias de <i>K. phaffii</i> transformadas con el plásmido pPIC9- <i>Tf-CSB</i>	56
Figura 24. Análisis de colonias de <i>K. phaffii</i> transformadas con pPIC9- <i>Au-CSB</i> o pPIC9- <i>Au-CB</i>	56
Figura 25. Producción y purificación de las proteínas recombinantes modificados.	58
Figura 26. Efecto de la adición del módulo Tf a CSB sobre la formación de AVLPs.	59
Figura 27. Ensayo de desensamble de complejos Tf-CSB con pDNA.	60
Figura 28. Formación de AVLPs con Tf-CSB en condiciones de desnaturalización de nucleasas	61
Figura 29. Formación de AVLPs con mezclas de Tf-CSB y CSB.	62
Figura 30. Inmuno detección de transferrina en las AVLPs mediante AFM.....	64
Figura 31. Conjugación química de AVLPs de CSB con Tf.....	66
Figura 32. AVLPs conjugadas con Tf.....	67
Figura 33. Comparación de eficiencia de transfección de AVLPs de Tf-CSB formadas con la fusión recombinante (R-Tf-CSB) o mediante conjugación química (Q-Tf-CSB).	68
Figura 34. Formación de AVLPs con Au-CSB y Au-CB. Se formaron AVLPs con un dsDNA de 742 pb.	69
Figura 35. Caracterización morfológica de las AVLPs.....	71
Figura 36. Ensayo de estabilidad de AVLPs en presencia de heparina..	72
Figura 37. Ensayo de estabilidad de AVLPs en medio Opti-MEM.	73
Figura 38. Entrada de AVLPs a células U251.	74
Figura 39. Exploración de la ruta de entrada de AVLPs a células.	76
Figura 40. Distribución intracelular de las AVLPs.....	78
Figura 41. Efecto de las AVLPs sobre la viabilidad celular.....	78
Figura 42. mRNA replicón.....	79
Figura 43. Formación de AVLPs con mRNA replicón.....	80
Figura 44. Ensayo de protección de mRNA en AVLPs contra RNasa A.	80
Figura 45. Transfección AVLPs formadas con replicón.....	82

Índice de tablas

Tabla 1 Oligonucleótidos utilizados en para la clonación de las proteínas CSB.	23
Tabla 2. Dosis de vVAA y AVLPs utilizadas en los experimentos de inmunización.	46
Tabla 3. Análisis estadístico de la detección de transferrina en las AVLPs mediante AFM.....	64

Resumen

El desarrollo de partículas viromiméticas es una alternativa para el diseño de vectores de ácidos nucleicos que sean eficientes y seguros. En este sentido se trata de imitar las propiedades virales involucradas en el proceso de entrega de material genético a las células. En 2014, Hernandez-Garcia y colaboradores reportaron el diseño de una proteína que forma partículas tipo virus artificial (AVLPs). Esta proteína fue diseñada de forma modular por tres bloques de péptidos que permiten imitar las propiedades fisicoquímicas de las partículas virales: estabilidad coloidal, autoensamblaje cooperativo y unión a ácidos nucleicos. De aquí surgió el nombre para denominar a esta proteína como CSB (*Colloidal stability, Self-assembly, Binding to nucleic acids*). En este trabajo se aborda el potencial de CSB como vector para la entrega de ácidos nucleicos mediante (i) la adición de bloques funcionales que permitan a las partículas de CSB entrar a las células y (ii) estudiar la seguridad del uso de las partículas de CSB mediante un análisis comparativo de su inmunogenicidad contra vectores virales usados en humanos.

Por un lado, en un ensayo de análisis de la inducción de anticuerpos IgG en un modelo murino, se demostró que las AVLPs son altamente seguras al ser 3 órdenes de magnitud menos inmunogénicas que un vector de virus adeno-asociado, considerado uno de los vectores virales menos inmunogénicos y que es actualmente utilizado en terapia en humanos. Por otro lado, los bloques adicionados para favorecer la internalización celular son el péptido aureína y la proteína transferrina humana, los cuales son capaces de promover la entrada de partículas a células mediante modificaciones a la membrana de manera no específica o mediante endocitosis mediada por receptor, respectivamente. Ambos bloques se adicionaron mediante fusión genética. Además, también se exploró la fusión de transferrina mediante conjugación química a las partículas de CSB previamente formadas con DNA. Se analizó el efecto de la adición de estos bloques sobre las propiedades de autoensamblaje, estabilidad, morfología e internalización celular de las partículas. Estas modificaciones permitieron aumentar hasta 11 veces la eficiencia de entrada a células de las partículas respecto a las AVLPs sin modificar en estudios *in vitro*. Sin embargo, cuando se estudió la distribución intracelular de las partículas, se observó que la mayoría de ellas se encuentran atrapadas en endosomas. Además, en estudios de transfección con RNA mensajero (mRNA) para la producción de un gen reportero, no se observó la expresión del gen de interés. Esto puede estar relacionado con el hecho de que las AVLPs brindan una protección modesta contra RNAsas. Por lo cual, es también

importante pensar en estrategias para asegurar la protección de RNA contra su degradación.

En este trabajo demostramos que es posible modificar de manera específica y controlada las propiedades de las AVLPs mediante distintas estrategias: (i) La edición del contenido de bloques que conforman a CSB mediante el uso de estrategias de biología molecular. (ii) La conjugación química. (iii) El uso de distintos tipos de proteínas derivadas de CSB para formar las AVLPs. Lo anterior funge como una prueba de concepto de la capacidad de las AVLPs para ser programadas con distintos propósitos. En este sentido, las funciones o propiedades de las AVLPs pueden ser codificadas mediante el diseño de la composición de los bloques que componen a CSB, o en general a las AVLPs. Lo anterior resulta en la posibilidad de funcionalizar las AVLPs con una gran variedad de bloques bioactivos para hacer frente a las distintas barreras a la entrega de ácidos nucleicos. Finalmente, este estudio representa un acercamiento hacia el diseño de vectores miméticos virales que puedan ser programables y diseñados *ad hoc*.

1. Introducción

La mimética viral o viromimética es un campo reciente en la investigación científica que tiene como principal objetivo desarrollar nuevos sistemas que puedan emular las propiedades físicas y bioquímicas de los virus. El desarrollo de este campo de investigación ha sido impulsado principalmente por las atractivas características que ofrecen los virus en el contexto de la bionanotecnología (acarreadores de ácidos nucleicos, fármacos o proteínas, diagnóstico, diseño de vacunas, nano-reactores, etc.), aunado a la necesidad de sistemas más seguros (que no induzcan respuestas inmunes no deseadas, sin riesgo de oncogénesis) y maleables (fáciles de modificar y producir). En este sentido, la viromimética tiene como desafío el diseño de partículas tipo virus artificial (AVLPs) que iguallen o excedan los beneficios que aportan las partículas virales [1].

La viromimética ha sido particularmente relevante en el diseño de sistemas sintéticos de acarreadores de ácidos nucleicos. Lo anterior debido a que los virus han evolucionado como excelentes agentes de entrega de su material genético cuando infectan a su huésped. La unión específica a ácidos nucleicos, autoensamblaje, protección contra nucleasas, tropismo tisular, internalización celular, escape endosomal, desensamble responsivo y traslocación hacia el núcleo, son algunas de las cualidades que se han logrado mimetizar en el diseño de diversos vectores artificiales inspirados en virus [2–6]. Sin embargo, integrar todas estas características en una sola partícula viromimética aún es un reto. Uno de los acercamientos propuestos para hacer frente a esta problemática es el diseño modular [7]. En esta estrategia se fusionan bloques de secuencias de polipéptidos en una sola cadena, en donde cada polipéptido tiene su propia estructura y función, y cada una de éstas es independiente de la presencia de los bloques adyacentes.

Bajo el concepto de diseño modular, Hernández-García y colaboradores reportaron en 2014, la creación de la proteína viromimética denominada CSB, la cual tiene la capacidad de formar AVLPs que imitan las propiedades físicas de algunos virus como su autoensamblaje en presencia de ácidos nucleicos y morfología [8]. Naturalmente, se ha postulado el uso de CSB como acarreador para la entrega de ácidos nucleicos a células, en donde se han observado resultados modestos o con bajas eficiencias de transfección [9,10]. Lo anterior se ha atribuido a que el diseño actual de CSB no cuenta con módulos específicos para facilitar su interacción e internalización en células.

Con la finalidad de profundizar en el desarrollo de CSB como sistema de entrega, este proyecto ahonda en la caracterización y modificación de CSB enfocadas a la interacción de las AVLPs de CSB con sistemas biológicos. Por una parte, se evalúa la factibilidad de su uso para aplicaciones en biomedicina, particularmente para entrega de ácidos nucleicos, explorando propiedades como la estabilidad de estas AVLPs en medios que simulen condiciones biológicas y su inmunogenicidad medida en términos de respuesta humoral en un modelo murino al ser administradas vía intramuscular. Por otro lado, se adicionaron módulos funcionales a CSB para programar la entrada a células de las AVLPs. Estos resultados permiten visualizar la practicidad de las AVLPs y su diseño a partir de proteínas modulares que sientan las bases para futuras modificaciones que resulten en un sistema cada vez más cercano a un virus artificial.

2. Antecedentes

2.1 Entrega de ácidos nucleicos

El concepto de entrega de ácidos nucleicos se refiere a cualquier proceso en el que moléculas de ácidos nucleicos exógenas son introducidas a células. Esto tiene implicaciones importantes en investigación relacionada con las funciones de los genes o desarrollo de fármacos, y en biomedicina para el desarrollo de terapias génicas, ingeniería de tejidos, vacunas, etc. [11,12]. Particularmente, la terapia génica es la transferencia de material genético (transgén) a un paciente para combatir cierta enfermedad [13]. El objetivo de la terapia génica es obtener niveles de expresión terapéuticos del transgén de interés durante tiempos prolongados. El tipo de terapia génica puede clasificarse de varias maneras: por (i) el tipo de enfermedad, por ejemplo una enfermedad genética o bien un desorden complejo adquirido, (ii) la forma de administración, *in vivo* o *ex vivo*, o (iii) el tipo de estrategia de entrega de los ácidos nucleicos [14]. En el diseño de vacunas, generalmente se pretende que el gen de interés sea entregado a células presentadoras de antígenos. En esta aplicación se desea que se logren niveles de expresión adecuados para potenciar una respuesta inmune. A diferencia de la terapia génica, aquí no se requiere una expresión prolongada del transgén.

La entrega de ácidos nucleicos es un campo emergente con la necesidad inherente del desarrollo de novedosas estrategias para poder facilitar la entrega. Lo anterior se refleja en el hecho de que en los últimos años se ha registrado un incremento importante en el número de productos utilizados en la entrega de ácidos nucleicos para uso en humanos y que han sido aprobados por entidades regulatorias como la “U.S. Food and Drug Administration” (FDA), la “European Medicines Agency” (EMA), la “China Food and Drug Administration” (CFDA) y la “Ministry of Food and Drug Safety” (MFDS) de Corea [15,16].

2.2 Vectores para la entrega de ácidos nucleicos

Los vectores o acarreadores de ácidos nucleicos son formulaciones que protegen y facilitan el transporte y liberación del material genético en el interior de las células de interés [17]. Los vectores permiten hacer frente a las principales limitantes de la entrega de ácidos nucleicos, que son: (i) la susceptibilidad de los ácidos nucleicos a la degradación por nucleasas y (ii) los obstáculos biológicos presentes durante su trayectoria, los cuales se pueden clasificar en barreras extra- e intracelulares. Las barreras extracelulares hacen

referencia a las etapas en las que, dependiendo de la vía de administración, el vector tiene que llegar a la célula diana, evadiendo la actividad de proteasas, nucleasas, y el sistema fagocítico mononuclear. Por otro lado, las barreras intracelulares abarcan los procesos de internalización del vector en la célula, transporte intracelular y liberación del material genético en la región subcelular donde se espera ejecute su actividad [18].

Los acarreadores de ácidos nucleicos se pueden clasificar de manera general con base en su composición en vectores virales y no virales. Sin embargo, cualquier vector utilizado en la entrega de ácidos nucleicos debe cumplir con ciertos criterios de calidad para su uso en la clínica. En general, las propiedades que un vector necesita tener son baja toxicidad, estabilidad coloidal, estabilidad en las condiciones de operación, protección al ácido nucleico, biocompatibilidad, biodegradabilidad y liberación controlada. Otras propiedades están relacionadas con la practicidad de su uso, como el hecho de que su aplicación sea segura y sencilla, una relación costo/beneficio favorable, capacidad de producción en gran escala y almacenamiento y esterilización sean sencillos [13,18].

2.2.1 Vectores virales

Los vectores virales son herramientas que se obtienen a través de la manipulación y modificación de virus para obtener partículas no infecciosas, generalmente mediante la eliminación parcial o total del genoma viral, el cual se reemplaza por el material genético de interés que será entregado a las células diana. Los vectores virales son el tipo de acarreador que ha tenido un mayor grado de éxito para terapia génica tanto *in vivo* como *ex vivo* [19,20]. Lo anterior se debe a que los virus son entidades que han evolucionado a lo largo de millones de años para infectar diversos organismos con el objetivo de poder replicarse. Son parásitos obligados que requieren de la maquinaria celular para poder multiplicarse y de transportar y entregar su genoma a la célula blanco.

Las ventajas de los vectores virales son que, de forma natural, cuentan con los mecanismos moleculares que les permiten tener un tropismo específico, penetrar en las células, transporte intracelular y liberación de su material genético. Todos estos procesos ocurren de manera regulada respondiendo a estímulos bioquímicos del ambiente intracelular para asegurar una infección eficiente [21–23]. Además, existen ya estrategias para su producción de forma recombinante, la cual permite su escalamiento [24–27]. Sin embargo, las principales desventajas de los vectores virales están relacionadas con la seguridad de su uso, ya que generalmente son altamente inmunogénicos y citotóxicos [28–30]. La respuesta inmune inducida por los vectores virales puede limitar la eficiencia de

transducción, es decir la capacidad de entregar el transgén en la células de interés, así como favorecer la eliminación de las células que han sido transducidas, lo que limita la expresión del transgén a largo plazo [31]. Además, existen vectores que están basados en virus que se han distribuido naturalmente en la población humana, como virus adeno-asociado y adenovirus, y por lo tanto, algunos individuos cuentan con la preexistencia de anticuerpos neutralizantes contra el vector [32]. En este sentido, existe un ejemplo de un vector de adenovirus en donde la inducción de respuestas inflamatorias adversas, posiblemente relacionadas con la preexposición del individuo al virus, resultó en la muerte [33]. Por otro lado, algunas estrategias hacen uso de vectores que tienen la capacidad de integrar el transgén terapéutico dentro del genoma del paciente, tal es el caso de los vectores lentivirales, en donde la inserción aleatoria del transgén puede activar proto-oncogenes y resultar en tumorigénesis [29,34,35]. Además, los vectores virales tienen restricciones con respecto al tamaño y tipo de transgén que pueden entregar. A pesar de que se han implementado estrategias como evolución dirigida y mutagénesis al azar para obtener vectores virales con nuevas y mejoradas propiedades, la ingeniería de los vectores virales es difícil debido a que la relación entre su secuencia, estructura y función es muy compleja [30,36,37].

A continuación, se listan ejemplos de los vectores virales más utilizados y que cuentan con ejemplos que han sido aprobados por entidades regulatorias en todo el mundo. Se especifica el nombre del producto “®”, la compañía farmacéutica, entidad regulatoria y año de aprobación [15,16]:

- Vectores de Virus Adeno-Asociado (vVAA): Glybera® (Uniqure, EMA en 2012)[38], LUXTURNA® (Spark Therapeutics, FDA en 2017 y EMA en 2018) y Zolgensma® (Avexis, FDA y EMA en 2019)[39].
- Vectores de Adeno Virus (vAdV): Gendicine® (Shenzhen SiBiono GeneTech, CFDA en 2003) y Oncorine® (Shanghai Sunway Biotech, CFDA en 2006)[40].
- Vectores Retrovirales: Strimvelis® (GlaxoSmith Kline, EMA en 2016)[41], YESCARTA® (Kite Pharma, FDA en 2017 y EMA en 2018)[42], Invossa® (Kolon Life Science, MFSD en 2017) y Zalmoxis (MolMed, EMA en 2016).
- Vectores Lentivirales: Zynteglo® (Bluebird Bio, EMA-2019)[43] y KYMRIAH® (Novartis Pharmaceuticals, FDA en 2017 y EMA en 2018)[44].

- Vectores de Virus de Herpes Simple (vVHS): IMLYGIC® (Amgen, FDA y EMA en 2015)[45].

2.2.2 Vectores no virales

Los vectores no virales son formulaciones sintéticas que permiten la entrega de ácidos nucleicos. Estos generalmente involucran el uso de lípidos, polipéptidos, polisacáridos, dendrímeros, lípidos catiónicos y nanopartículas inorgánicas [46]. En comparación con los vectores virales, los vectores no virales se han caracterizado por ser más seguros, flexibles y programables [13]. Particularmente se ha observado que los vectores no virales son menos inmunogénicos, lo cual, a diferencia de los vectores virales, facilita el diseño de terapias que requieran de dosis repetidas cuando es difícil mantener por tiempos prolongados la expresión del gen de terapéutico [47–49]. Sin embargo, la gran limitante de los vectores no virales es que son menos eficientes que los virus para entregar genes en aplicaciones *in vivo* [46,50] y en algunos casos se han tenido problemas con respecto a la reproducibilidad de su eficiencia [51].

A continuación, se enlistan los principales componentes utilizados en el diseño de vectores no virales, sus principales características, ventajas, desventajas y ejemplos:

- Lípidos: Generalmente se hace uso de lípidos ionizables catiónicos que permiten formar complejos con los ácidos nucleicos [52]. A estos complejos se les ha denominado comúnmente como “lipoplejos” [13]. Sin embargo, las formulaciones más recientes hacen uso también de fosfolípidos, lípidos esteroides, y combinaciones de lípidos con otro tipo de polímeros como polietilenglicol (PEG), lo cual permite un mayor control sobre el ensamblaje de estos complejos obteniendo estructuras como liposomas o nanopartículas de lípidos [53]. Dentro de los sistemas no virales, los lípidos son los más eficientes y seguros. Sin embargo, tienen baja especificidad y estabilidad [53]. Actualmente, formulaciones de lípidos catiónicos son el referente para estudios de transfección *in vitro* [54]. Además, existen ya aplicaciones del uso de lípidos para uso humano en terapia génica y como vacunas de ácidos nucleicos [16,53,55–58].
- Polímeros: Se ha denominado como “poliplejos” a los complejos de polímeros catiónicos (a pH fisiológico) con ácidos nucleicos en nano- o micro-partículas [59]. En general, el uso de polímeros permite la obtención de complejos menos inmunogénicos y económicos. Sus principales desventajas son baja eficiencia

de entrega, complejidad para controlar su grado de polimerización, citotoxicidad y generalmente no biodegradables [53,59]. Ejemplos de los polímeros más utilizados para la entrega de ácidos nucleicos son: poli-lisina (PLL), polietilenimina (PEI) quitosano, PEG etc. [52,60,61]

- Dendrímeros: Son moléculas poliméricas complejas con configuración bien definida dividida en tres regiones: (i) núcleo (uno o varios átomos con propiedades similares), (ii) capas de ramificaciones de unidades repetitivas que emergen desde el núcleo, y (iii) grupos funcionales terminales generalmente implicados en la interacción con ácidos nucleicos [52]. Estos polímeros permiten un mayor control sobre el tamaño de la partícula que los polímeros lineales y pueden ser fácilmente conjugados con distintos tipos de moléculas. Entre los ejemplos más comunes se encuentran poli(amidoamina) (PANAM) y poli(propilenimina) [62].
- Péptidos: Una gran variedad de péptidos derivados de virus, bacterias o diseñados *de novo* han sido utilizados para el diseño de vectores no virales. Los péptidos son naturalmente biodegradables y permiten un control preciso sobre propiedades como tamaño, carga, hidrofobicidad y geometría [63]. Generalmente se hace uso de péptidos penetradores de células que dirigen la internalización de diversas moléculas a través de la membrana celular. El ejemplo más común es el péptido derivado del transactivador de transcripción del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) normalmente conocido como péptido TAT. Los péptidos generalmente se utilizan para funcionalizar otro tipo de nanomateriales [64,65]. La gran diversidad de péptidos permite también el diseño de acarreadores formados por: péptidos (i) catiónicos, ricos en lisina o arginina, que ayudan a condensar los ácidos nucleicos y formar complejos denominados “peptidejos” [7], (ii) entrecruzantes (ricos en cisteínas) o (iii) hidrofóbicos (ayudan a brindar estabilidad a la partícula) [63].
- Nanopartículas metálicas: Varios tipos de nanopartículas han sido estudiadas como acarreadores mediante su conjugación con ácidos nucleicos. Entre las más estudiadas están las nanopartículas de oro, de hierro, plata y platino [66–68]. Las nanopartículas pueden ser fácilmente fusionadas a distintos tipos de moléculas, se puede tener un control preciso sobre su tamaño y además algunas tienen propiedades interesantes como capacidad fototérmica y

magnetismo [52]. Sus principales desventajas son su propensión a aglomerarse, toxicidad, y la necesidad de estrategias para asegurar la integridad del ácido nucleico [52,69].

Los vectores no virales más actuales utilizan combinaciones de estos componentes para aprovechar las distintas propiedades y ventajas de cada tipo de molécula [70–72]. Esto ha resultado en vectores más complejos y más eficientes. Sin embargo, a excepción del uso de lípidos, aún no se han reportado ejemplos que hayan sido aprobados para su uso en humanos [51].

2.3 Viromimética

La viromimética es un área emergente que tiene como principal objetivo desarrollar nuevos sistemas que puedan emular las propiedades físicas y bioquímicas de los virus. Las motivaciones por el desarrollo de sistemas viromiméticos son: (i) investigación básica relacionada con el estudio de los mecanismos moleculares de los virus en sus distintas etapas del ciclo viral, así como un mayor grado de comprensión sobre su origen y evolución y (ii) desarrollo de acarreadores que mimeticen los mecanismos moleculares que permiten a los virus tener altas eficiencias de entrega de material genético a células [73]. Ésta última particularmente requiere del entendimiento de los mecanismos y estrategias que utilizan los vectores virales para traspasar las barreras extra- e intracelulares a la entrega de ácidos nucleicos y adaptarlas a los vectores no virales [50,74–76].

El desarrollo de vectores viromiméticos implica el diseño de sistemas que sean capaces de auto-ensamblarse en nanopartículas con estructura ordenada y definida mediante la unión específica con ácidos nucleicos, brindar protección al ácido nucleico, facilitar su transporte hasta su destino en el interior de la célula blanco y el desensamble cuando se reconocen ciertas señales bioquímicas [77,78]. También se pretende que estos sistemas sean más seguros que los vectores virales, tengan alta flexibilidad para ser programados para la entrega de genes a distintos tipos de células y presentar baja inmunogenicidad [1,79–83].

Los vectores miméticos virales pueden estar conformados por moléculas de distinta naturaleza como lípidos, polímeros, dendrímeros y péptidos [76,84]. Sin embargo, el uso de péptidos ofrece la posibilidad de una amplia gama de estructuras secundarias y terciarias mediante el control sobre la secuencia de aminoácidos, lo que permite manipular propiedades como carga, hidrofobicidad y geometría [63]. Además el uso de péptidos ofrece

ciertas ventajas como alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad, y la posibilidad de una producción recombinante y escalable [7].

Los ejemplos de partículas viromiméticas podrían clasificarse en dos grandes grupos. Los primeros son aquellos enfocados principalmente en imitar las propiedades físicas y estructurales de las cápsides virales mientras que los segundos se enfocan en imitar las propiedades biológicas de los virus (Fig. 1).

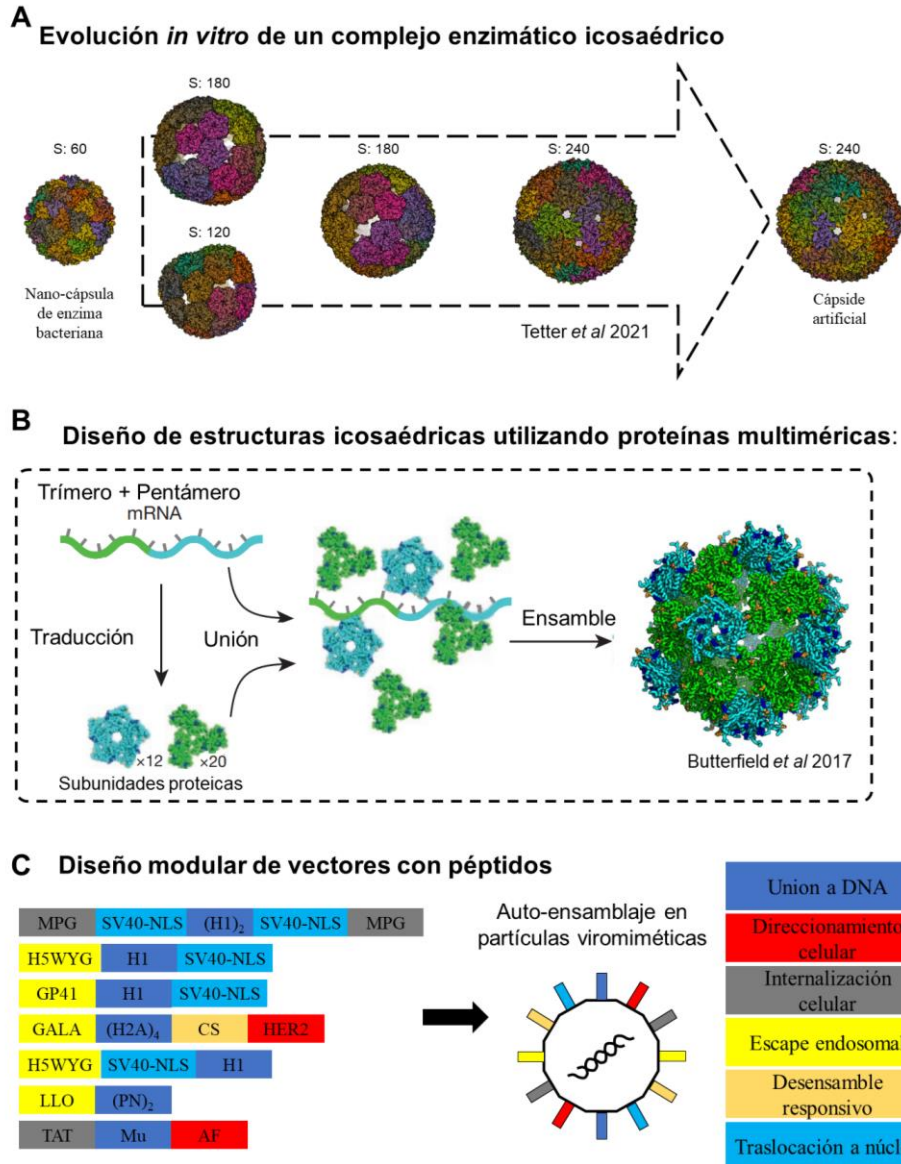
El primer grupo de ejemplos tiene como eje central el diseño de partículas que estructuralmente sean muy similares a los virus (Fig. 1.A y B). Sus principales objetivos han sido imitar las propiedades fisicoquímicas de los virus que resultan en partículas ordenadas, con estructura definida, y que son capaces de encapsular su propio genoma. La manera más sencilla de poder realizar esto es utilizar como base proteínas que naturalmente se auto ensamblan en nanocomplejos similares a las estructuras de los virus. Algunos ejemplos son las nanopartículas de ferritina, proteínas de choque térmico, encapsulinas, y algunas enzimas bacterianas como la lumazina sintasa de *Aquifex aeolicus* [85–87]. Estas proteínas han servido como andamios para la entrega de ácidos nucleicos mediante la fusión con péptidos como TAT, el cual tiene actividad fusogénica y RGD, el cuál puede se utiliza para direccionamiento a receptores de integrinas, e incluso la incorporación de anticuerpos dirigidos hacia receptores celulares. Mediante ingeniería de proteínas se ha logrado que estas estructuras tengan desensamble responsivo a pH [86]. En otro ejemplo, se logró la producción de una cápside artificial utilizando como base la nano-cápsula formada por la enzima bacteriana lumazina sintasa de la bacteria *Aquifex aeolicus*, a la cual se le modificó la carga de su superficie interna, se fusionó al péptido λ N⁺ rico en argininas, y se sometió a un proceso de evolución dirigida *in vitro* para obtener partículas que pudieran unir y encapsular específicamente su propio RNA (Fig. 1.A) [88].

Por otro lado, la estructura icosaédrica de los virus también puede ser simulada utilizando proteínas no virales multiméricas [89,90]. Para ello, se ha estudiado el repertorio de proteínas naturales que son capaces de formar dímeros, trímeros o pentámeros, para utilizarlas como bloques de construcción en nanoestructuras tipo cápsides virales artificiales (Fig. 1.B). Este enfoque consiste en la fusión de los monómeros de estos bloques de construcción en una forma específica y orientada que resulte en la formación de estructuras icosaédricas. En esta estrategia, la predicción *in silico* de la estructura de las proteínas de fusión es de fundamental importancia [90]. Así, existen varios ejemplos de nanocápsulas artificiales que tienen estructuras muy similares a las de las partículas virales y que han sido

modificadas para conferirles algunas otras propiedades como el desensamble responsivo a ciertos estímulos como cambios en el pH o como una respuesta alostérica [91,92]. Además, estos ejemplos también se han sometido a procesos de evolución *in vitro* con el objetivo de obtener partículas que sean capaces de encapsular a su propio genoma [93].

En estos ejemplos, la mimética de la estructura de las partículas juega un rol central, y mientras que se han logrado adicionar algunas otras propiedades como direccionamiento específico, desensamble responsivo e incluso la encapsulación de su propio genoma, no ha sido posible unir todas estas propiedades en un solo sistema. Estos ejemplos utilizan proteínas evolucionadas de forma natural como bloques de construcción, y pequeñas modificaciones en su secuencia primaria tiene implicaciones importantes en su estructura [8,73,93–95]. En estas estrategias, la reprogramación de su estructura y función suele ser un reto grande que involucra el uso de grandes recursos computacionales para la predicción de su estructura y de métodos de alto rendimiento para su producción, purificación y análisis *in vitro*. Además, en algunos casos estas partículas suelen contener poros lo suficientemente grandes como para permitir la permeabilización de nucleasas que degradan el ácido nucleico de interés, lo cual disminuye la eficiencia del uso de estas partículas como vectores.

El segundo grupo de partículas viromiméticas involucra esencialmente el uso de péptidos sintéticos. La ventaja de utilizar péptidos es que es posible diseñarlos de forma modular, es decir, fusionar pequeños motivos o bloques de construcción con propiedades y funciones independientes en una sola cadena polipeptídica (Fig. 1.C).



Majidi *et al.* 2016; Alipour *et al.* 2016; Wang *et al.* 2009; Sadeghian *et al.* 2012; Kim *et al.* 2015; Govindarajan *et al.* 2012.

Figura 1. Ejemplos de viromimética. (A) Generación de cápsides artificiales a partir de evolución *in vitro* del complejo enzimático de la Lumazina sintasa de *Aquifex aeolicus* modificada mediante permutación circular y la adición del péptido $\lambda N+$ para encapsular su propio RNA. S: número de subunidades de cada nanoestructura. (B) Diseño de nanoestructuras icosaédricas utilizando proteínas multiméricas. Se muestra el uso de proteínas pentáméricas y triméricas fusionadas en una orientación específica para dar lugar a una cápside artificial. Estas partículas se fusionaron con el péptido de unión a DNA TAT derivado de VIH y se sometieron a evolución *in vitro* para generar partículas que encapsulan su propio genoma. (C) Ejemplos de diseño modular de péptidos utilizando bloques con funciones específicas y que se auto-ensamblan con ácidos nucleicos en partículas viromiméticas. La función de cada bloque esta codificada por colores. MPG: péptido penetrador de células derivado de la proteína GP41 de VIH. SV40-NLS: secuencia de localización nuclear del virus vacuolado de simio 40. H1: Dominio de unión a DNA de la histona 1. H5WYG: péptido fusogénico derivado del virus de influenza. GP41: Péptido fusogénico derivado de la glicoproteína 41 de VIH. GALA: péptido fusogénico. H2A: Dominio de unión a DNA de la histona 2. CS: Sitio de corte de la proteasa catépsina D. HER2: péptido sintético direccionado hacia el receptor HER2. LLO: proteína endosomolítica formadora de poros Listeriolisina O. PN: Protamina, péptido condensador de DNA. TAT: péptido TAT derivado de VIH. Mu: Dominio de unión a DNA. AF: afflicuerpo ZHER2 dirigido al receptor Her2.

Los primeros enfoques utilizando péptidos para entregar ácidos nucleicos se enfocaron en imitar las 3 propiedades básicas de las proteínas virales estructurales más sencillas: 1) unión a ácidos nucleicos, 2) autoensamblaje y 3) estabilidad coloidal [7]. El primer péptido sintético capaz de condensar DNA fue el péptido KALA, el cual forma estructuras tipo α -hélices anfipáticas que exponen residuos de lisina por un lado y leucinas en el otro. Las regiones ricas en lisinas son las responsables de la interacción con ácidos nucleicos, mientras que su naturaleza anfipática es la responsable de promover el autoensamblaje y facilitar la estabilidad coloidal. Posteriormente, de éste derivaron los péptidos RALA y GALA, los cuales presentan mejoras en cuanto la eficiencia de transfección, mayor biocompatibilidad, y desensamble responsivo a pH [96,97].

De manera similar, otros ejemplos de péptidos sintéticos utilizan secuencias catiónicas para unir ácidos nucleicos como PLL, secuencias ricas en arginina, e incluso algunos motivos de proteínas de unión a DNA como las histonas [98–100]. Para promover el autoensamblaje normalmente se usan secuencias derivadas de la seda, elastina o bloques de α -hélices anfipáticas [101–104].

Dado que la principal motivación para el diseño de este tipo de péptidos ha sido el desarrollo de nuevos vectores, se han imitado propiedades virales esenciales para la entrega de ácidos nucleicos como el direccionamiento específico, escape endosomal, desensamble responsivo a estímulos bioquímicos y transporte hacia el núcleo. Para dirigir a los vectores hacia cierto tejido específico se han incorporado péptidos dirigidos a receptores celulares como ligandos o fragmentos de anticuerpos [105–107]. Estas estrategias generalmente resultan en la internalización de los vectores mediante rutas endocíticas, por lo cual es necesario añadir ciertos elementos que le permitan a los vectores escapar del endosoma antes de ser degradados cuando el endosoma madure a lisosoma. Para ello se han utilizado péptidos fusogénicos que son capaces de desestabilizar la membrana del endosoma, o motivos catiónicos, generalmente ricos en histidinas, que son capaces de inducir el efecto de esponja de protones por su alta capacidad de amortiguación de pH y provocan la ruptura del endosoma [3,99,106,108]. Además, también se han incorporado secuencias que son capaces de dirigir al vector hacia el núcleo celular utilizando secuencias de localización nuclear que generalmente son derivadas de proteínas virales [3,98,99]. También se ha considerado el diseño de materiales que responden a estímulos bioquímicos como cambios en el pH a lo largo de la maduración del endosoma, el procesamiento del vector por parte de proteasas específicas de cierto tipo de tejido, e

incluso sistemas responsivos a cambios en el potencial redox intracelular [106,109]. Utilizando estas estrategias se ha logrado aumentar considerablemente la eficiencia de transfección de los vectores no virales. Si bien estos ejemplos han imitado algunas las propiedades biológicas funcionales de las partículas virales, no se han enfocado en formar partículas que presenten una morfología o el samblaje similar a la de los virus. Además, algunos ejemplos utilizan péptidos que son derivados de las proteínas estructurales de ciertos virus, como VIH y virus 40 vacuolado del simio (SV40), lo cual podría tener ciertas implicaciones con respecto a su inmunogenicidad y, por tanto, la seguridad de uso de estos vectores.

2.4 Proteínas CSB

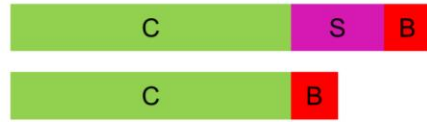
Este proyecto se enfoca en el estudio de un grupo de proteínas viromiméticas modulares, reportadas por Hernandez-Garcia en 2012 y 2014 [8,80], como plataformas para el diseño de acarreadores de ácidos nucleicos. Estas proteínas fueron diseñadas *de novo* y de forma racional para formar partículas morfológicamente similares al virus del mosaico del tabaco (TMV).

El diseño de la proteína CSB consta de tres bloques (Fig. 2.A), cada uno diseñado para imitar una propiedad específica de las proteínas estructurales de TMV [79]: (1) El bloque “C”, de “*Colloidal stability*”, brinda estabilidad coloidal a la partícula y corresponde a una secuencia derivada del motivo tipo colágeno GXY, en donde X y Y son aminoácidos hidrofílicos. Este bloque está compuesto por 396 aminoácidos y no forma ninguna estructura secundaria. (2) El bloque “S”, de “*Self-assembly and Stability*”, permite interacciones entre proteína-proteína y está constituido por 10 repeticiones de la secuencia del motivo tipo seda GAGAGAGQ. En su forma monomérica, este bloque no presenta alguna estructura secundaria, sin embargo, adopta una estructura tipo β -rol al momento de auto-ensamblarse [110]. Este bloque permite que el ensamblaje de las partículas DNA-proteína sea de forma cooperativa, de forma similar al ensamblaje de partículas virales, y por tanto brinda una mayor estabilidad a las AVLPs [79,111,112]. (3) El bloque “B”, de “*Binding*”, es responsable de la interacción con el esqueleto negativo de los ácidos nucleicos al estar conformado por 12 residuos de lisina que a pH neutro están cargados positivamente. En la figura 2.B se observa el esquema propuesto del proceso de formación de AVLPs con CSB [112]. La proteína CSB tiene una masa molar de 44.75 kDa.

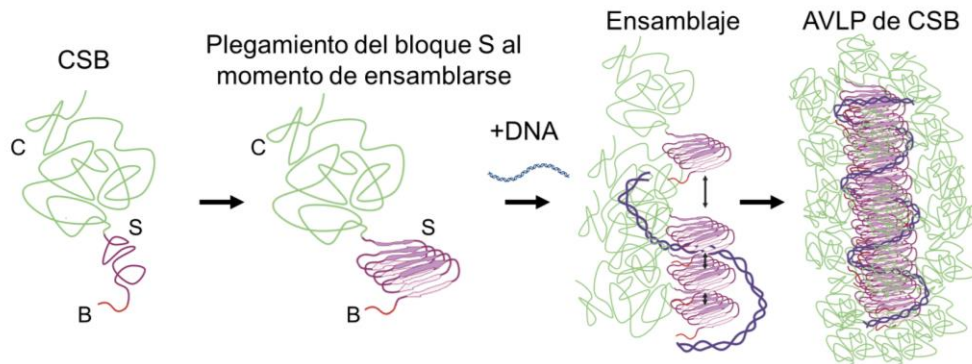
Previo al diseño de CSB, se reportó la proteína CB, la cual únicamente está conformada por los bloques “C” y “B” y por tanto tiene una masa molar de 38.4 kDa (Fig. 2.A) [80]. CB también tiene la capacidad de formar partículas en presencia de ácidos nucleicos, sin embargo, los mecanismos de ensamblaje, y la morfología de las partículas formadas por CB tienen propiedades distintas comparadas con CSB (Fig. 2.C y 2.D).

Estudios con estas proteínas han demostrado que son capaces de auto-ensamblarse y formar AVLPs utilizando distintos tipos de ácidos nucleicos como mRNA, DNA de doble cadena (dsDNA) y DNA plasmídico (pDNA) [113,114]. De ahí se deriva el planteamiento del uso de estas AVLPs como vectores para la entrega de ácidos nucleicos, para lo cual es necesario demostrar que tienen alta eficiencia de transfección y que son seguras [1]. Sin embargo, los primeros intentos de utilizar las AVLPs como vectores para entregar ácidos nucleicos a células *in vitro* reportaron que tienen eficiencias de entrega modesta o muy bajas [9,10,115]. Esto se ha atribuido a que en el diseño de estas proteínas no se consideró algún elemento que facilitara su interacción con células. Por otro lado, los motivos derivados de la seda y colágeno utilizados como base para el diseño de estas proteínas son altamente biocompatibles, sin embargo, se utilizaron patrones de aminoácidos no comunes en la naturaleza que alteran sus propiedades fisicoquímicas. Particularmente el bloque C, a diferencia de otras proteínas derivadas de colágena, no forma estructuras tipo cola super enrollada, lo anterior debido a la ausencia de prolina en su secuencia [116]. Estos cambios en su estructura podrían modificar su biocompatibilidad e inmunogenicidad. Tomando en cuenta todos estos factores, y con el propósito de profundizar en el estudio de CSB como sistema de entrega de ácidos nucleicos, este estudio se enfoca en al análisis de la estabilidad de las AVLPs en medios que mimeticen condiciones fisiológicas, su toxicidad, inmunogenicidad, así como buscar estrategias para mejorar su eficiencia de transfección.

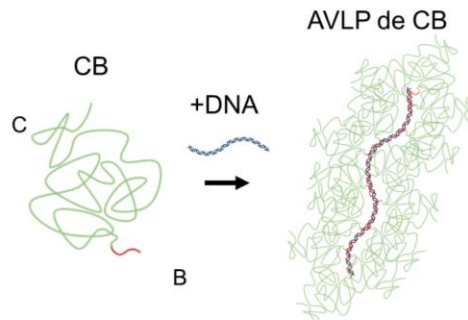
A Diseño de proteínas modulares



B Esquema de ensamblaje de AVLPs de CSB



C Esquema de ensamblaje de AVLPs de CB



D AVLPs de CB y CSB con DNA

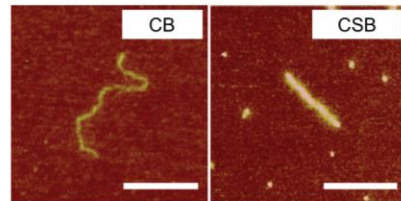


Figura 2. Diseño de proteínas viromiméticas CSB. (A) Esquema de secuencia primaria de las proteínas CSB y CB, mostrando el diseño de construcción por bloques. C: bloque de estabilidad coloidal, S: bloque de autoensamblaje y estabilidad, y B: bloque de unión a ADN. (B) Esquema de ensamblaje de AVLPs entre CSB y DNA. Modelo basado en y modificado de Marchetti *et al*, 2019. (C) Esquema del ensamblaje de AVLPs entre CB y DNA. (D) Imágenes de microscopía de fuerza atómica de AVLPs formadas por CB o CSB y un dsDNA de 850 nm. La barra de escala corresponde a 300 nm. Hernandez-Garcia *et al* 2014.

2.4.1 Modificaciones a las proteínas tipo virus artificial

La ingeniería de proteínas es un proceso limitado por la tolerancia de las proteínas a ser modificadas sin resultar en la pérdida de su estructura y función. En el caso de las proteínas estructurales virales, se ha observado que pequeñas modificaciones en su secuencia resultan en partículas menos estables o la pérdida de la capacidad de formar

partículas [117]. Por otro lado, el diseño de CSB involucra la unión de bloques conformados por repeticiones de motivos sencillos con secuencia, estructura y función definidas. Este tipo de diseño representa una ventaja sobre la flexibilidad de modificación y reprogramación de las proteínas modulares con respecto a las proteínas naturales. Bajo esta premisa, se planteó la modificación de CSB mediante la adición de bloques funcionales que les permitieran interactuar con células de una manera más eficiente.

En este proyecto se propuso la adición de dos módulos que permitieran la entrada de las AVLPS a células. Para el primero módulo se escogió el péptido aureína, el cuál tienen la capacidad de deformar membranas y, por tanto, inducir la entrada a células de manera inespecífica. Por otro lado, se planteó el uso de la proteína transferrina, la cuál es ligando del receptor de transferrina, y está involucrada en el abastecimiento de hierro a la célula.

Aureína es una familia de péptidos antimicrobianos derivados del organismo *Litoria aurea*. En específico, aureína 1.2 (Au) ha demostrado tener la capacidad de favorecer el escape endosomal cuando este es fusionado a proteínas reporteras [118]. Au es un péptido anfipático compuesto por la secuencia de aminoácidos GLFDIHKKIAESF, la cual forma hélices α que son capaces de interactuar principalmente con lípidos con carga negativa [119]. Au utiliza el mecanismo conocido como “alfombra” para deformar membranas, en donde varias moléculas del péptido interactúan con los lípidos, deformando y provocando invaginaciones en la membrana que, después de alcanzar cierto número de eventos, es capaz de romperla e inducir la formación de micelas invertidas [119,120].

Por otro lado, transferrina (Tf), o bien análogos que puedan ser capaces de interactuar con el receptor de Tf, han sido ampliamente utilizados en sistemas de entrega a distintos tipos de cáncer, los cuales, debido a su alta actividad metabólica, sobre expresan este receptor para contender con la demanda metabólica de hierro [121,122]. Por otra parte, el uso del receptor de Tf ha sido propuesto para dirigir fármacos a otros blancos de interés, tal es el caso del parásito *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, para la cual no existe un tratamiento seguro y eficaz [123].

El uso de Au y Tf como bloques para facilitar la entrada de las AVLPS a células permite la exploración de distintas rutas y mecanismos de internalización celular. Mientras que se espera que Au facilite la entrada de manera inespecífica, Tf deberá hacerlo mediante endocitosis mediada por receptor. Además, el uso de estas dos moléculas permite evaluar la versatilidad de las AVLPS de ser conjugadas con una amplia gama de módulos bioactivos,

ya que estos dos bloques cuentan con propiedades bioquímicas muy distintas. Mientras que Au es un péptido de apenas 1.48 kDa, Tf es de aproximadamente 80 kDa.

3. Justificación

Actualmente existe una alta demanda en el desarrollo de vectores que permitan la entrega de ácidos nucleicos a células, tanto para terapia génica como para el desarrollo de vacunas. Estos vectores deberán ser eficientes, seguros y versátiles para poder ser aplicados de forma exitosa en humanos. Las estrategias actuales involucran el uso de vectores virales, los cuáles son eficientes, pero tienen limitaciones relacionadas con la seguridad de su uso, particularmente relacionadas con su inmunogenicidad, y son difíciles de modificar. Por otro lado, los vectores no virales, aunque más seguros y versátiles, no son eficientes.

Una alternativa prometedora es el uso de partículas viromiméticas. Las proteínas CSB forman AVLPs en presencia de ácidos nucleicos, y tienen un diseño modular basado en secuencias sencillas que las hacen una alternativa atractiva para su funcionalización con módulos bioactivos.

Estudios previos han reportado que las AVLPs de CSB tienen baja eficiencia de transfección. Es por ello que este trabajo se enfoca en realizar modificaciones a las proteínas CSB o CB para (1) demostrar su versatilidad de ser programables, (2) aumentar su eficiencia de transfección. Por otro lado, este trabajo también plantea un estudio comparativo entre las AVLPs de CSB contra vectores virales utilizados en terapia para explorar su inmunogenicidad y tener un panorama más contundente sobre la seguridad del uso de las AVLPs. Estos estudios permitirán tener información relevante que servirá como base para futuras investigaciones relacionadas al potencial uso de las AVLPs como sistemas acarreadores de ácidos nucleicos.

4. Hipótesis

Las AVLPs de las proteínas CSB tienen propiedades de estabilidad, toxicidad e inmunogenicidad adecuadas para su uso como sistemas acarreadores de ácidos nucleicos. Por otro lado, el diseño modular de este sistema facilita su modificación/funcionalización con nuevos bloques funcionales, lo que permitirá aumentar su eficiencia de transfección.

5. Objetivos

Obtener AVLPs que sean seguras y que tengan bloques funcionales que faciliten su entrada a las células.

6. Objetivos específicos

1. Obtener AVLPs que desplieguen Au mediante la fusión de Au a las proteínas CSB.
2. Obtener AVLPs que desplieguen Tf mediante la fusión de Tf a las proteínas CSB.
3. Analizar el efecto de la adición de Au y Tf sobre el ensamblaje y morfología de las AVLPs.
4. Evaluar la estabilidad de las AVLPs en condiciones similares a las fisiológicas.
5. Evaluar la inmunogenicidad de las AVLPs en términos de respuesta humoral.
6. Comparar la eficiencia de entrega de ácidos nucleicos de las distintas AVLPs a células mediante ensayos de transfección *in vitro*.

7. Materiales y métodos

7.1 Oligonucleótidos y plásmidos

Todos los oligonucleótidos utilizados en este proyecto fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT, USA). Para la biosíntesis de las proteínas se utilizaron los plásmidos pPIC9 con las secuencias de los genes codificantes para CSB (*CSB*) y CB (*CB*). [8,80]. Estos mismos plásmidos fueron utilizados como moldes para la clonación de *CSB* y *CB* modificados con las secuencias de los genes codificantes para Tf (*Tf*) y Au (*Au*). La secuencia codificante para Tf de origen humano se obtuvo del plásmido pPIC9-*Tf* donado por Bunzo Mikami (Universidad de Kyoto, Japón) [124].

7.2 Modificación de CSB mediante técnicas de DNA recombinante.

Para la adición del bloque de Tf en el extremo N-terminal de CSB se diseñaron cebadores de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias codificantes de Tf y CSB a partir de los plásmidos pPIC9-*Tf* y pPIC9-*CSB* (tabla 1). En cada caso, estos cebadores adicionan los sitios de restricción de las enzimas XhoI y XbaI en el extremo 5' y 3' de *Tf* y de XbaI y NotI en los extremos 5' y 3' de *CSB*. Se realizaron PCR de cada fragmento utilizando la DNA polimerasa Q5 de alta fidelidad (New England Biolabs, NEB, USA) y posteriormente se digirieron con la enzima XbaI (NEB, USA). Los fragmentos obtenidos se sometieron a una electroforesis a partir de la cual se purificó la banda correspondiente a cada fragmento. Los fragmentos correspondientes a *Tf* y *CSB* se mezclaron en una reacción de ligación con la enzima DNA ligasa T4 (NEB, USA) incubando a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, la reacción de ligación se utilizó como sustrato de PCR con los cebadores directo de *Tf* e inverso de *CSB*. De esta forma se logró obtener suficiente cantidad del fragmento que corresponde a la fusión *Tf-CSB*. Posteriormente, el fragmento *Tf-CSB* y el plásmido pPIC9 se digirieron con las enzimas XhoI y NotI (NEB, USA), se purificaron del gel y se utilizaron en reacciones de ligación.

Para la fusión de las proteínas con aureína se diseñó un cebador que adiciona la secuencia de *Au* y el sitio de restricción de XhoI en el extremo 5' de *CSB* (tabla 1). Se realizó una PCR con este cebador y el cebador inverso de *CSB* con la enzima DNA polimerasa Q5 para obtener el fragmento *Au-CSB* y clonarlo en el vector pPIC9 entre los sitios de restricción de las enzimas XhoI y NotI, generando el vector pPIC9-*Au-CSB*. Esta

misma estrategia se utilizó con *CB* para producir la fusión *Au-CB* y el plásmido pPIC9-*Au-CB*.

Las reacciones de ligación de los plásmidos conteniendo las secuencias de las fusiones *Tf-CSB*, *Au-CSB* y *Au-CB* se utilizaron para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH10 β (Thermo Fisher Scientific, USA), las cuales pueden aceptar plásmidos de gran tamaño. Las colonias resultantes de las transformaciones se analizaron mediante PCR de colonia con cebadores que flanquean la secuencia del promotor y el terminador del gen de la alcohol oxidasa (AOX, cebador directo: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3', cebador reverso: 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3') y la enzima DNA polimerasa DreamTaq (Thermo Fisher Scientific, USA). Posteriormente se extrajo DNA plasmídico de las colonias positivas para PCR de colonia utilizando el kit ZymoPURE Plasmid Miniprep (Zymo Research, USA) y se analizaron mediante perfil de digestión con la enzima XbaI y secuenciación por el método de Sanger (Laragen, USA).

Tabla 1 Oligonucleótidos utilizados en para la clonación de las proteínas CSB.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Observaciones
F_XhoI_LEK_Tf	GGTCTCGAGAAGAGAGAAGCTGAAGCTT GTGGTCTCGGTGCTGGTGCAGTCCCTGA TAAAACTG	Cebador directo para <i>Tf</i>
R_Tf-Linker-XbaI	CCATCTAGAAGATCCGGCTCCAGATCCA GGTCTACGGAAAGT	Cebador inverso para <i>Tf</i>
F_XbaI_linker_CSBC	TCTTCTAGAGGTCTCGGTGCTGGTGCACC C	Cebador directo para <i>CSB</i> en la adición de <i>Tf</i>
R_CSB-NotI	TTCGCGGCCGCCCTAGGGAATTCTTAGG CACCCCTTCTT	Cebador reverso para <i>CSB</i>
F-XhoI-LEK-Au-Linker-CSB	GTAICTCGAGAAGAGAGAAGCTGAAGCTT GTTTATTTGATATTATTAATAAAAAATTGCTG AATCATTTGGTCTCGGTGCTGGTGCACCC	Cebador directo para <i>CSB</i> en la adición de <i>Au</i>

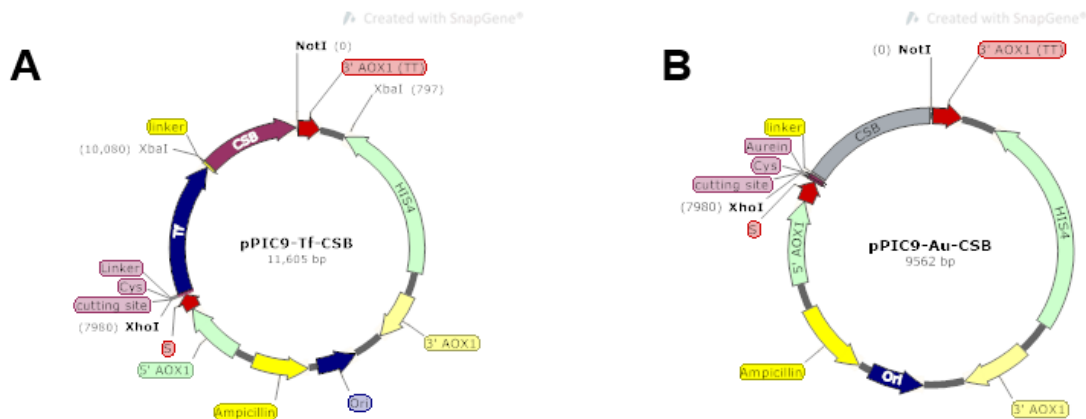


Figura 3. Diseño de los plásmidos para la producción recombinante de las fusiones Tf-CSB y Au-CSB. (A) plásmido pPIC9 con la secuencia de *Tf-CSB* entre los sitios de restricción de XhoI y NotI. (B) plásmido pPIC9 con la secuencia de *Au-CSB* entre los sitios de restricción de XhoI y NotI.

7.3 Generación de cepas de levadura recombinantes

Una vez obtenidos los plásmidos pPIC9 recombinantes es necesario generar las cepas de *Komagataella phaffii* recombinantes, anteriormente conocida como *Pichia pastoris* [125]. En este trabajo se utilizó la cepa GS115, la cual tiene una mutación en el gen de la histidinol deshidrogenasa (*his4*), y por tanto es incapaz de producir histidina. El plásmido pPIC9 contiene el gen *HIS4* como complementación del gen *his4* mutado de GS115, de esta forma, al transformar con el plásmido pPIC9, las cepas recombinantes se pueden seleccionar por auxotrofia en un medio carente de histidina [126].

Los plásmidos con las secuencias codificantes para las variantes de CSB se linealizaron con la endonucleasa Sall (NEB, USA). Al utilizar el plásmido linealizado con esta enzima para transformar las levaduras se asegura un solo evento de recombinación/integración del gen de interés en el genoma de GS115 en la región AOX1.

Posteriormente se prepararon las células competentes de GS115. Para ello, se cultivaron células de GS115 en medio de extracto de levadura de peptona y dextrosa (YPD, Sigma Aldrich, USA) hasta llegar a una densidad óptica (OD) entre 1.2-1.5 U.A. Una vez alcanzada la OD, se realizaron 2 lavados con H₂O desionizada y un lavado con sorbitol 1 M (Sigma Aldrich, USA). Al final, las células se resuspendieron en un volumen mínimo de sorbitol 1 M y se mantuvieron en hielo en todo momento. La transformación se realizó inmediatamente después de resuspender las células. Se tomaron 80 µL de las células competentes y se adicionó entre 5-10 µg de plásmido linealizado en un volumen no mayor

a 10 μ L. La mezcla se incubó 5 minutos en una celda de electroporación en hielo y posteriormente se sometió a una descarga eléctrica. Inmediatamente después, las células se recuperaron con 500 μ L de sorbitol 1 M y se sembraron en cajas de medio mínimo con dextrosa (MD) (base de nitrógeno de levadura, YNB 1.34 %, biotina 4×10^{-5} %, glucosa 2%, agar 15 g/litro, Sigma Aldrich, USA). Las placas se incubaron a 30 °C por 3 días o hasta observar la formación de colonias blancas. Las colonias transformadas de GS115 se analizaron mediante PCR de colonia con los cebadores dirigidos a las regiones regulatorias del gen *AOX* y con cebadores específicos para las secuencias codificantes de las proteínas CSB. Posteriormente se realizaron pruebas de expresión a pequeña escala en matraz.

7.4 Producción de las proteínas CSB

La producción de las proteínas CSB se realizó de manera recombinante. Para ello se adaptó el protocolo definido por Hernandez-Garcia y colaboradores en 2012 [80]. Esta estrategia hace uso del sistema de expresión de la levadura *K. phaffii*. Este sistema ofrece varias ventajas para la producción de proteínas recombinantes que son difíciles de producir en bacterias, cómo es el caso de las proteínas CSB [127]. Además, al tratarse de una levadura, los costos de producción son menores y es más fácil de escalar su producción en comparación con sistemas de células de mamífero. La cepa GS115 permite la secreción de la proteína recombinante al medio extracelular y así, facilita el proceso de purificación. Esta cepa se transforma con el plásmido de expresión pPIC9, en el cual se inserta la secuencia del gen de interés en sentido con el marco de lectura de la secuencia del péptido señal de secreción, el factor α , y bajo el promotor inducible de *AOX* [128].

GS115 es una levadura metalotrófica capaz de utilizar metanol como única fuente de carbono. En esta estrategia, el gen de interés se inserta bajo el promotor de *AOX*, el cuál regula la expresión de una alcohol oxidasa que es la primer enzima involucrada en el metabolismo de metanol como fuente de carbono. Dado que la alcohol oxidasa utiliza O_2 para su reacción y a que tiene una baja afinidad por éste, la levadura compensa esta situación expresando grandes cantidades de la enzima en presencia de metanol, lo cual significa que el promotor de *AOX* es un promotor fuerte e inducible por metanol. De esta forma se utiliza este promotor para la expresión de proteínas recombinantes. Esta plataforma tiene la ventaja de utilizar el metanol como única fuente de carbono y a la vez, como inductor para la producción de la proteína recombinante. Esta levadura es capaz de crecer a altas densidades celulares lo cual genera altos rendimientos de proteína recombinante por litro de sobrenadante de cultivo [129].

La regulación de la producción de proteínas recombinantes bajo el promotor de AOX depende de la disponibilidad de las distintas fuentes de carbono en el medio. El promotor es reprimido en presencia de incluso pequeñas cantidades de glucosa, mientras que es activado en presencia de metanol. Por esta razón, cuando se desea producir proteínas recombinantes reguladas por este promotor, se evita el uso de glucosa como fuente de carbono. Por otro lado, la producción de proteínas recombinantes generalmente consta de dos fases; la fase de obtención de biomasa y la fase de inducción de la producción de la proteína recombinante. Durante la fase de generación de biomasa, se utiliza un medio de cultivo con glicerol como única fuente de carbono. El glicerol es una fuente de carbono que sustituye a la glucosa, es fácil de metabolizar y permite la generación de grandes cantidades de biomasa. Posteriormente la fuente de carbono del cultivo se cambia gradualmente por metanol para inducir la producción de proteína recombinante [130]. A continuación, se describe a detalle el protocolo seguido para la producción de las distintas proteínas en matraces bafleados.

Primero, se inocularon matraces de 250 mL con 50 mL de medio mínimo con glicerol (MGY, glicerol 1 %, YNB 1.34 %, biotina 4×10^{-5} %, Sigma Aldrich, USA) con aproximadamente 1 mL del banco de la cepa recombinante. El cultivo se incubó a 30 °C en agitación durante 72 h. Posteriormente, el cultivo se utilizó para inocular matraces bafleados de 2 L con 600 mL de medio mínimo de inducción (MI, metanol 0.5 %, glicerol 0.1%, YNB 1.34 %, biotina 4×10^{-5} %, fosfatos 100 mM pH 6.0, Sigma Aldrich, USA), a una OD ≥ 2 U.A. El cultivo se incubó a 30 °C. Posterior a 12 h, se adicionó nuevamente metanol al 0.5 % y a las 24 h y cada 12 h se añadió metanol al 1 % hasta las 96 h.

7.5 Purificación de las proteínas CSB

Las proteínas recombinantes se purificaron a partir del sobrenadante del cultivo. Primero se centrifugó el cultivo a 10 000 xg por 20 min. El sobrenadante se decantó y se le adicionó ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 50 mM (Thermo Fisher Scientific, USA) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM (Sigma Aldrich, USA), se ajustó el pH a 8.0 con NaOH (Thermo Fisher Scientific, USA) y finalmente se filtró con membranas de fluoruro de polivinilideno (PDVF) de 0.22 μ m (Merck Millipore, USA). Se agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma Aldrich, USA) a distintos porcentajes de saturación para cada tipo de proteína siendo 55 % para CSB, 50 % para CB y a 80 % para Tf-CSB, Au-CB y Au-CSB. Los sobrenadantes con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se almacenaron a 4 °C durante una noche para permitir la precipitación de las proteínas y posteriormente se centrifugaron a 30 000 xg por 20 min. El pellet se resuspendió

en 1/10 del volumen inicial del sobrenadante con agua desionizada o amortiguador de tris(hidroximetil)aminometano 20 mM pH 8.0 (Tris, Sigma Aldrich, USA), y se adicionó NaCl (JT Baker, USA) a una concentración final de 50 mM y acetona (Alta Pureza, Mex.) hasta el 40 %. Se centrifugó a 30 000 xg por 20 min. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó acetona hasta el 80 % de saturación, se centrifugó una vez más a 30 000 xg por 20 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se secó bajo campana o a 37 °C. El pellet se disolvió en agua desionizada o Tris 20 mM pH 8.0 para Tf-CSB y se dializó en agua o amortiguador Tris. Finalmente, las muestras dializadas se congelaron y liofilizaron.

7.6 Caracterización de las proteínas CSB

Las proteínas CSB se analizaron mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), Western-Blot (WB) y espectroscopía de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF). Para SDS-PAGE, típicamente se utilizaron muestras conteniendo 20 µg de proteína total, se cargaron en geles de 7.5 o 12 % de acrilamida y se corrieron a 120 V por 1.5 h. Los geles se tiñeron utilizando el colorante SimplyBlue SafeStain (Invitrogen). Para WB, se realizó la electro transferencia del gel de SDS-PAGE a membranas de PDVF utilizando un sistema semi seco trans blot Bio-Rad 200 a 25 V durante 45 min. Posteriormente la membrana se bloqueó durante toda la noche en una solución de leche libre de grasas al 5 % en PBS a 4 °C. Todos los lavados se realizaron en rondas de 3 con PBS suplementado con Tween-20 al 0.1 % (PBS-T) por 10 minutos. Las incubaciones con los anticuerpos se realizaron durante 2 h a temperatura ambiente. Como anticuerpos primarios se utilizaron los siguientes: (i) La detección de las proteínas CSB se realizó utilizando los sueros de la semana 8 post inmunización de ratones inmunizados con las AVLPs (detalles en la secciones 7.12 y 7.13), a una dilución 1:1000 en PBS suplementado con leche libre de grasas al 2 %. (ii) La detección de transferrina se realizó con el anticuerpo D9 (Santa Cruz) a una dilución 1:1000 en PBS-T. Para el anticuerpo secundario se utilizó en todos los casos un IgG anti-ratón acoplado a la enzima peroxidasa de rábano a una dilución 1:5000 en PBS-T. La detección se realizó con el sustrato de la peroxidasa Luminol y el equipo c300 Imaging System (Azure Biosystem).

La determinación del peso molecular de las proteínas se realizó mediante MALDI-TOF con un espectrómetro Microflex (Bruker). Se utilizó una matriz de ácido sinapínico y la calibración se realizó con el estándar Protein II (Bruker). Los datos se recolectaron en modo de operación lienal.

7.7 Formación de AVLPs

Durante este proyecto se utilizaron distintos tipos de ácidos nucleicos para la formación de las AVLPs. Como control de la morfología de las AVLPs se utilizó un fragmento de DNA lineal de doble cadena (dsDNA) de 1535 pb. También se utilizó el plásmido pAcGFP1-N1 de 4.7 kpb. Por otro lado, también se utilizó un fragmento de dsDNA de 742 pb que corresponde a un producto de PCR del plásmido pAcGFP1-N1 con los cebadores directo: 5'-ATGGTGAGCAAGGGCG-3' e inverso: 5'-/5ATTO590/TTATGATCTAGAGTCGCGGC-3', (IDT, USA), el cual se encuentra modificado en el extremo 5' con el fluoróforo ATTO590. Este fragmento es útil para evaluar la entrada de las AVLPs a las células blanco. También se realizaron algunos experimentos utilizando un oligonucleótido anti sentido (ASO) de 20 nt (5'-GTCCTCCCTTTCCGTGCTGT-3', IDT, USA) para evaluar la inmunogenicidad de las AVLPs. Finalmente se formaron partículas con mRNA que contiene el gen reportero de la proteína amarillo fluorescente eYFP (Laboratorio del grupo de Virus, UCLA, USA).

Para la formación de las AVLPs se tomó en cuenta la relación N/P, la cual se define como la relación molar entre las cargas positivas de los grupos amino de las 12 lisinas del bloque B de las proteínas CSB o CB, con respecto a las cargas negativas de los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos. Para los ensayos de formación de las partículas se tomaron 100 ng de ácidos nucleicos y se mezclaron con distintas cantidades de proteína en amortiguador de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-sulfónico (HEPES) 100 mM (IBI Scientific, USA), pH 7.4. Debido a que CSB cuenta con una cisteína única en su extremo amino-terminal, se adicionó 1,4-ditiotreitol (DTT) 1 mM (Thermo Fisher Scientific, USA) para asegurar tener las proteínas en forma de monómeros [111]. Las mezclas de ácido nucleico y proteínas se incubaron a 65 °C por 1 h y posteriormente a temperatura ambiente durante una noche. Finalmente, las muestras se analizaron mediante ensayos del cambio de la movilidad electroforética (EMSA) del ácido nucleico.

7.8 Ensayo del cambio de la movilidad electroforética

La presencia de AVLPs en mezclas de las proteínas y ácidos nucleicos se monitoreó mediante EMSA. Las muestras se mezclaron con 6x DNA loading buffer (Thermo Fisher Scientific, USA) y se cargaron en un gel de agarosa (Life Technologies, USA) al 0.8 %. Posteriormente se realizó la electroforesis a 90 V por 1 h. Las bandas correspondientes al DNA se visualizaron utilizando el agente SYBR Safe DNA Gel stain (Thermo Fisher

Scientific, USA) y un fotodocumentador Azure c300 Imaging System (Azure Biosystems, USA).

7.9 Caracterización morfológica de las AVLPs

La morfología de las partículas se analizó mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) utilizando un microscopio MultiMode 8-HR (Bruker, USA) acoplado a una punta SCANASYST-AIR (Bruker, USA). Posterior a la formación de las AVLPs, se tomaron 10 μL de muestra conteniendo 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de DNA y se depositaron en una mica para AFM. La muestra se depositó sobre la mica y se incubó durante 5 minutos, posteriormente se retiró el exceso de muestra con un lavado de agua desionizada de 0.5 mL. La mica se secó gentilmente con una corriente suave de aire comprimido. Finalmente, las micas preparadas se montaron en el microscopio y se obtuvieron micrografías utilizando el modo de escaneo en aire asistido a una velocidad de escaneo entre 0.75-1.0 Hz y 500-1000 puntos/línea. Finalmente, las imágenes fueron procesadas y analizadas utilizando el programa Nanoscope Analysis.

Las AVLPs también se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello se depositaron 6 μL de muestra conteniendo 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de ácido nucleico en forma de AVLPs sobre gradillas de cobre para TEM de malla de 300 poros recubiertas con Formvar y carbón (TED PELLA, USA). Las muestras se incubaron durante un minuto y posteriormente se secaron con ayuda de papel filtro. Las muestras se tiñeron utilizando 6 μL de una solución de acetato de uranilo (Thermo Fisher Scientific, USA) al 2 % durante 1 min. El exceso se eliminó con ayuda de un papel filtro y las muestras se dejaron secar para su análisis. Las muestras se visualizaron en un microscopio FEI T20 iCorr (EICNS, UCLA) y se tomaron fotografías a 55 000 x de magnificación.

7.10 Dispersión dinámica de luz

Las AVLPs se caracterizaron mediante el análisis de dispersión dinámica de luz (DLS), con el cuál es posible conocer el tamaño de partícula en solución acuosa, en términos de su diámetro hidrodinámico (D_H), y su movilidad electroforética con base en su potencial ζ , el cual está relacionado con la carga superficial de las AVLPs. Para lo anterior se prepararon muestras con 2×10^9 copias de pDNA/ μL o 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína con (N/P: 3) o sin pDNA en PBS pH 7.4. Las mediciones se realizaron en un equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK), a 25 °C y utilizando un ángulo de dispersión de 173°. Los

resultados se muestran como el promedio de 3 mediciones por muestra de 13 corridas cada una.

7.11 Ensayo de estabilidad con Heparina

Las AVLPs fueron sometidas a un ensayo de competencia con el polianión heparina. Debido a la densidad de carga negativa de la heparina, al combinarse con las partículas existirá una competencia con el DNA por la interacción electrostática con las proteínas. Para ello, se tomaron 10 μ L de AVLPs conteniendo 100 ng de ácido nucleico, se mezclaron con cantidades crecientes de heparina (PiSa, Méx.) y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Finalmente, la liberación del ácido nucleico se analizó mediante EMSA.

7.12 Pruebas de estabilidad

Se evaluó la estabilidad de las AVLPs en distintos medios de cultivo. Para ello, se tomó una muestra de AVLPs conteniendo 100 ng de DNA y se mezclaron en una relación 1:1 con medio esencial mínimo de suero reducido (Opti-MEM), medio Eagle modificado de Dubelcco (DMEM) o DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Gibco, USA). Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Como control de liberación, se adicionó heparina a una relación de 1 ng de heparina por ng de DNA posterior a las 24 h de incubación en medio de cultivo. La liberación del DNA de las AVLPs se analizó mediante EMSA.

7.13 Pruebas de inmunogenicidad de las AVLp

Se realizaron ensayos de inmunogenicidad en un modelo murino para evaluar la producción de anticuerpos específicos contra las AVLPs. Se realizaron tres experimentos independientes con 6 grupos de ratones BALBC (n = 3 o 5) hembras de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones se obtuvieron del bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC) – UNAM. Todos los ratones se mantuvieron aislados en cajas aireadas con filtro de acuerdo con el protocolo LVD138-18 aprobado por el Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del IFC-UNAM. Previo a las inmunizaciones, las muestras de AVLPs fueron diafiltradas utilizando centricones con corte de peso molecular (MWCO) de 30 kDa (Corning, USA) para eliminar el exceso de proteína monomérica en las muestras. Todas las inmunizaciones se administraron por la vía intramuscular. Como control de referencia, se estudiaron grupos de ratones inmunizados con un vector vVAA en el cual están basados varios vectores que se encuentran actualmente en ensayos clínicos o bien ya aprobados

para su uso terapéutico. Los vVAA utilizados en este proyecto fueron donados por el Dr. Fatuel Tecuapetla (Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México) y corresponden a cápsides de vVAA del serotipo 1. Particularmente, el vector pAAV.Syn.GCaMP6s.WPRE.SV40 contiene en su genoma el gen de la proteína verde fluorescente (eGFP).

En el primer experimento se comparó la producción de anticuerpos producidos cuando los ratones se inmunizaron con la misma dosis de masa de proteína de 54.5 ng de AVLPs o vVAA. La determinación de proteína total en las muestras de AVLPs o vVAA se realizó mediante el ensayo de ácido bicinconínico (BCA, Pierce Biotechnology, USA).

En el segundo experimento se evaluó la producción de anticuerpos cuando los ratones son inmunizados con una dosis de 10^{10} copias genómicas (gc), ya sea de las AVLPs o de vVAA. Para ello se utilizaron AVLPs formadas con el plásmido pACGFP1-N1 y el vVAA ya que ambos contienen el gen de eGFP. La cuantificación de gc en las muestras de AVLPs o vVAA se determinó mediante PCR cuantitativo (qPCR) con cebadores específicos para un fragmento de 117 pb del gen de eGFP (cebador directo: 5'-ATGGTGAGCAAGGGCG-3', cebador inverso: 5'-TTATGATCTAGAGTCGCGGC-3', IDT, USA) utilizando el kit SYBR Supermix (Bio-Rad, USA). La cuantificación se realizó mediante la comparación con una curva estándar con el plásmido pAcGFP1-N1. La reacción de qPCR se realizó en un termociclador Bio-Rad CFX96.

En el tercer experimento se evaluó la producción de anticuerpos cuando los ratones son inmunizados con altas dosis de las AVLPs, para ello se utilizó una dosis de 50 μ g de proteína sola o en forma de AVLPs y posterior a dos semanas se administró un refuerzo de la misma dosis. Se estudiaron grupos control inmunizados con las AVLPs o el vVAA coadministrados con un adyuvante a base de alúmina Alhydrogel (Ady) (Invivogen, USA).

En todos los experimentos se recolectaron muestras de sangre de los ratones de la vena de la cola justo antes y cada dos semanas después de ser inmunizados. Los sueros se recolectaron al centrifugar las muestras de sangre recién tomadas a 3 000 xg por 15 minutos. Los sueros se guardaron a -20 °C hasta su análisis.

7.14 Detección de anticuerpos específicos contra las AVLPs o vVAA

Se realizaron ensayos de inmunoadsorción acoplado a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos específicos en los sueros de los ratones inmunizados con las AVLPs o vVAA. Para poder comparar la producción de anticuerpos inducida por los dos

distintos antígenos, AVLPs o vVAA, se estandarizó la cantidad de cada antígeno adsorbido a la placa. Para ello se incubaron microplacas de 96 pozos con 50 μ L de diluciones seriadas de CSB (de 10 μ g/mL a 1 ng/mL) o vVAA (de 0.5 μ g/mL a 16 ng/mL) en PBS por una noche. Posteriormente las placas se bloquearon utilizando una solución de leche libre de grasa al 5 % y se incubaron por 1 h a 37 °C. Se analizaron diluciones 1:100 en PBS con 5 % de leche libre de grasa de mezclas por partes iguales de los sueros de cada grupo. Particularmente, se analizaron los sueros de la semana 8 post inmunización de los ratones correspondientes a los grupos inmunizados con dos dosis de 50 μ g de CSB y adyuvante o con 54.5 ng de vVAA. Estos grupos fueron seleccionados ya que son los que presentaron una mayor señal para cada antígeno en un ensayo exploratorio previo. La incubación con las diluciones de suero se llevó a cabo durante 1 h y a 37 °C. Posteriormente se realizaron 5 lavados con 300 μ L de PBS con Tritón X-100 0.2 % (Bio-Rad, USA). La detección de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó utilizando un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (Sigma Aldrich, USA). Las placas fueron lavadas nuevamente 5 veces con 300 μ L de PBS-Tritón. Finalmente se utilizó 3,3',5,5"-tetrametilbencidina (TMB, Thermo Fisher Scientific, USA) como sustrato de la peroxidasa incubando los pozos en oscuridad durante 20 min. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico (Thermo Fischer Scientific, USA) a una concentración de 0.16 M. La actividad de la peroxidasa se determinó al medir la absorbancia de las placas a 450 nm en un lector de microplacas. El mismo protocolo se siguió para el análisis de la producción de IgG de todos los sueros fijando la concentración de antígeno adsorbido a la placa a 1 μ g/ μ L para CSB o 0.1 μ g/ μ L para vVAA.

La determinación de títulos de anticuerpos se realizó utilizando los sueros de la semana 8 post inmunización del experimento 3 y todos los sueros contra vVAA. Para ello, se mezclaron cantidades iguales de los sueros de los ratones correspondientes al mismo grupo y se analizaron en diluciones seriadas en PBS con leche libre de grasa al 5 % siguiendo el protocolo anterior. El título de anticuerpos se determinó como la dilución más alta de suero cuyo valor medio menos 3 desviaciones estándar fuera mayor al valor del umbral positivo/negativo determinado como el valor medio más 3 desviaciones estándar del control negativo (preimmune).

7.15 Conjugación química de Tf y CSB

Como una alternativa para la obtención de AVLPs conjugadas con Tf, se planteó el uso de una estrategia de funcionalización química. Para ello se utilizó el agente

entrecruzante sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato) (Sulfo-SMCC, Sigma Aldrich, USA), el cual permite la unión covalente de aminas primarias de las lisinas de Tf con el grupo tiol de la cisteína terminal de CSB. Para lo anterior se utilizaron AVLPs previamente formadas con CSB y un fragmento de dsDNA de 742 pb conjugado a ATTO590 a una N/P de 10 en HEPES 100 mM pH 7.4. De acuerdo con el protocolo del fabricante, la conjugación de las AVLPs se llevó a cabo con una relación molar de 1x de Tf : 20x de Sulfo-SMCC : 1x de CSB. Para lo anterior, se prepararon 300 μ L de una solución de 27 μ M de Tf y 540 μ M de Sulfo-SMCC. La reacción de activación de Tf con Sulfo-SMCC se incubó a 4 °C toda la noche. Posteriormente, para eliminar el exceso de Sulfo-SMCC que no reaccionó, la solución se dializó con PBS en 100 veces el volumen de reacción utilizando una membrana de 2 MWCO (Spectrum Labs, USA) durante 2 h. En el proceso de diálisis se realizaron tres recambios de amortiguador. Por otro lado, se incubaron 300 μ L de la solución de AVLPs conteniendo 27 μ M de CSB con 2.7 mM del agente reductor Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP, Sigma Aldrich, USA). Lo anterior para reducir el grupo tiol de la cisteína de CSB y que esté disponible para reaccionar con Sulfo-SMCC. La reacción de reducción se llevó a cabo durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente el exceso de TCEP se eliminó mediante diafiltración utilizando dispositivos Vivaspín de 50 kDa (Sartorius, Alemania). Al final, la muestra se recuperó en 300 μ L de PBS. Se mezclaron las soluciones de Tf activada con Sulfo-SMCC y las AVLPs. La mezcla se incubó toda la noche a 4 °C. Finalmente, las AVLPs conjugadas se lavaron utilizando los dispositivos Vivaspín de 100 kDa y PBS.

7.16 Evaluación de la entrada de AVLPs a células

La eficiencia de entrada de las AVLPs a células se evaluó mediante ensayos de transfección *in vitro* utilizando las líneas celulares U251 y HEK293. Las células U251 provienen de un tumor de glioblastoma y se ha demostrado que sobre expresan el receptor de transferrina. Las células HEK293 son derivadas de fibroblastos de riñón humano y expresan el receptor de transferrina en menor medida que las células U251 [131,132]. Las pruebas de transfección se realizaron en placas de 96 pozos, en donde se inocularon 5 x 10⁴ células por pozo y se incubaron durante 24 h en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB. Posteriormente las células se lavaron 3 veces con PBS y se expusieron a una mezcla de 25 μ L de las distintas AVLPs en HEPES 25 mM pH 7.4 y 25 μ L de Opti-MEM. En todas las condiciones se administró una cantidad de AVLPs correspondiente a 100 ng de dsDNA-ATTO590. En todos los experimentos se utilizó una mezcla de Lipofectamina

2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) con 100 ng de dsDNA-ATTO590 como control positivo. Tras 4 h de incubación, se adicionó 50 µL de DMEM suplementado con SFB al 10 % para asegurar la viabilidad de las células. Al finalizar el periodo de incubación, las células se lavaron 3 veces con 100 µL de PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2 % (Thermo Fisher Scientific, USA) y se tiñeron con el reactivo Hoechst 33342 (Pierce Biotechnology, USA) 5 µg/mL en PBS por 10 min. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con 100 µL de PBS y se evaluó la eficiencia de entrada mediante microscopía de fluorescencia y la detección del dsDNA-ATTO590 en un equipo Cytation 5.0 (Agilent Biotek, USA). Para indagar sobre los mecanismos de entrada de las AVLPs hacia las células se realizaron experimentos de transfección a 4 °C por 1 h. En estas condiciones se inhiben los procesos metabólicos que requieren energía como la endocitosis y, por tanto, únicamente las AVLPs que sean capaces de utilizar rutas alternativas de entrada podrán ser internalizadas en las células [133,134].

7.17 Análisis de la distribución intracelular de las AVLPs

Se utilizó microscopía confocal para estudiar en detalle la localización intracelular de las AVLPs. Para ello se realizaron experimentos de transfección en portaobjetos con cámaras de 8 pozos (Thermo Fisher Scientific, USA). Para ello se sembraron 200,000 células por pozo y se incubaron por 24 h a 37 °C. Las células se transfectaron con 200 ng de dsDNA-ATTO590 en forma de AVLPs y se incubaron por 4 h a 37 °C y atmósfera de 5 % de CO₂. Posteriormente, las células se tiñeron añadiendo LysoTracker 100 nM (Thermo Fisher Scientific, USA) a cada pozo y se incubó por 30 min a 37 °C. Finalmente las células se lavaron con PBS y se tiñeron con Hoechst 33342 1 µg/mL. Se adquirieron imágenes en 3D utilizando un microscopio confocal Leica Sp5 (IFC, UNAM). Las imágenes se analizaron mediante el análisis del coeficiente de correlación de colocación de Pearson (PCC) utilizando el plugin Coloc2 de la herramienta ImageJ.

7.18 Ensayo de citotoxicidad de las AVLPs

La citotoxicidad de las AVLPs se evaluó en términos de la actividad enzimática de las células viables utilizando la línea celular U251. Para lo anterior se sembraron 7,500 células por pozo en placas de 96 pozos. Las células se trataron en las mismas condiciones que los experimentos de transfección. Las células se incubaron por 24 h con AVLPs (100 ng de dsDNA-ATTO590 en forma de AVLPs) en medio Opti-MEM. Posteriormente las células se lavaron 3 veces con 100 µL de PBS y se incubaron con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-

il)-2,5,-difenil tetrazolio (MTT) 0.5 mg/mL en PBS por 4 h a 37 °C. Durante la incubación, las células se protegieron de la luz. Se retiró el sobrenadante y los cristales de formazán formados se disolvieron con 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, USA). Finalmente se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (Agilent Biotek, USA).

7.19 Evaluación de eficiencia de transfección de AVLPs con mRNA

La eficiencia de transfección de las AVLPs se analizó mediante ensayos de transfección *in vitro* utilizando un mRNA autoreplicante que expresa eYFP. Se utilizó la línea celular BHK-21, derivada de fibroblastos de riñón de hámster bebé. Se sembraron 6.5×10^4 células por pozo en placas de 96 pozos y se incubaron durante 24 h en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB. Posteriormente las células se lavaron 3 veces con PBS y se expusieron a una mezcla de 25 µL de las distintas AVLPs en HEPES 25 mM pH 7.4 y 25 µL de Opti-MEM. En todas las condiciones se administró una cantidad de AVLPs correspondiente a 100 ng de mRNA. Para el control positivo se utilizaron 100 ng de mRNA y 0.1 µL de Lipofectamina 2000. La expresión de eYFP se analizó mediante microscopia de epifluorescencia y con un lector de microplacas Tecan M1000 utilizando longitudes de onda de 485 y 535 nm para emisión y excitación.

7.20 Producción de mRNA replicante

Se realizaron experimentos de transfección con las AVLPs utilizando como molde un mRNA autorreplicante (replicón). Este mRNA contiene el gen de la RNA polimerasa dependiente de RNA del Virus Nodamura (RdRp) y el gen reportero de eYFP. El uso de este mRNA ha permitido obtener niveles de expresión del transgén de hasta un orden de magnitud mayor en comparación con la expresión de mRNA no replicativos [135]. El replicón se sintetiza mediante transcripción *in vitro* a partir del plásmido pDNA_NR_eYFP, el cuál fue previamente reportado por Biddlecome *et al* 2019 [135]. El plásmido pDNA_NR_eYFP se digiere con la endonucleasa XbaI y posteriormente se utiliza como sustrato en reacciones de transcripción *in vitro* utilizando el kit mMessage mMachine T7 (Thermo Fisher Scientific). El rendimiento y pureza del mRNA producido se evaluó midiendo su absorbancia y en geles de agarosa al 0.8 %.

7.21 Cuantificación de mRNA en células transfectadas con AVLPs

Se prepararon AVLPs utilizando como molde el replicón a una N/P de 5. Posteriormente, las AVLPs se utilizaron para transfectar células BHK-21 en placas de 24 pozos sembrando 100 000 células BHK-21 por pozo 24 h previo al tratamiento. Posteriormente las células se transfectaron con 200 ng de RNA en forma de AVLPs o en complejos con Lipofectamina 2000. Posterior a 1 h de transfección, las células se recuperaron mediante tripsinización y el RNA se extrajo utilizando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). El rendimiento y pureza del RNA se analizaron mediante absorbancia a 260 y 280 nm. Posteriormente se utilizó 1 µg de RNA total de cada muestra en reacciones de transcripción reversa con la enzima M-MuLV (NEB) y el cebador reverso Rv_qPCR_eYFP (5'- TGGTAGCTCAGGTAGTGGTT-33') para obtener el DNA complementario (cDNA) correspondiente al replicón. La cuantificación de replicón en las muestras de RNA extraído de las células se realizó con ayuda de una curva estándar de replicón la cual fue sometida a reacciones de transcripción reversa en las mismas condiciones que las muestras. La cuantificación de cDNA se realizó mediante qPCR con los cebadores directo Fw_qPCR_eYFP (5'- TCAAGATCCGCCACAACATC – 3') y reverso Rv_qPCR_eYFP que generan un fragmento de 117 pb y el kit SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) en un termociclador de tiempo real CFX364 (Bio-Rad).

7.22 Análisis estadístico

Todos los resultados se reportan como el promedio \pm desviación estándar de al menos 3 réplicas biológicas. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante análisis de dos vías de varianza (ANOVA) seguido del test de Tukey. Los niveles de diferencia significativa corresponden a valores de: * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$. Todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 8.

8. Resultados y discusión

8.1 Producción, purificación y caracterización de proteínas modulares

La producción de las proteínas modulares se realizó utilizando el sistema de expresión en levadura *K. phaffii*. El protocolo utilizado es una adaptación de la metodología utilizada por Hernandez-Garcia y colaboradores en 2014 con algunas variaciones descritas en la sección de métodos [79]. En la figura 4.A se muestra la cinética del crecimiento de cultivo de la levadura para la producción de cada una de las proteínas. Utilizando esta estrategia se obtuvieron rendimientos de 10.26 ± 1.55 y 5.89 ± 0.44 mg/L para CB y CSB respectivamente (fig. 4.B).

En la figura 4.C se muestran los geles de SDS-PAGE donde se observa que las proteínas se obtienen con porcentajes de pureza por encima del 95 %. El peso molecular teórico de cada proteína es de 38.407 kDa para CB y 44.749 kDa para CSB. Estos valores no coinciden con lo observado por SDS-PAGE dado que las proteínas contienen un alto porcentaje de aminoácidos hidrofílicos y, por tanto, no interaccionan eficientemente con el SDS. La verificación el peso molecular de las proteínas se realizó mediante el análisis de espectrometría de masas (fig. 5), en donde se observaron valores de peso molecular de 38.422 y 44.786 kDa, los cuáles son muy cercanos a los valores teóricos para cada proteína.

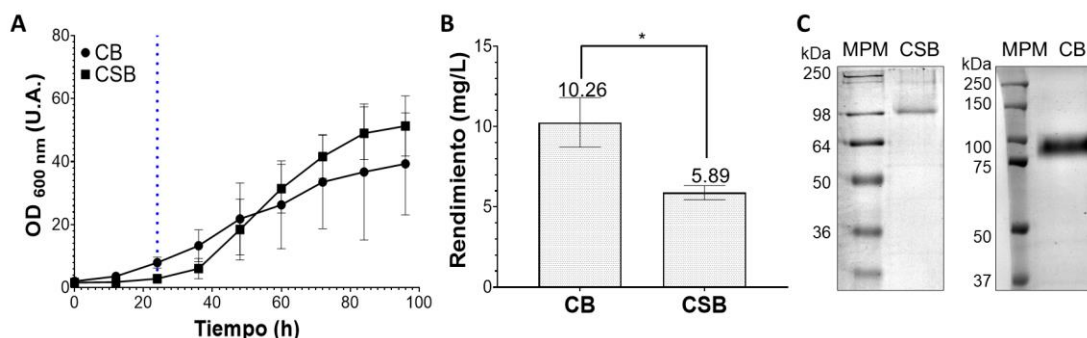


Figura 4. Producción de proteínas en *K. phaffii*. (A) Cinética de crecimiento microbiano de *K. phaffii* durante la producción de: CB (●) y CSB (■). La línea punteada azul indica el punto de inicio de inducción con metanol al 1 % cada 12 h. (B) Rendimiento de la producción y purificación de las proteínas (C) SDS-PAGE de proteínas purificadas.

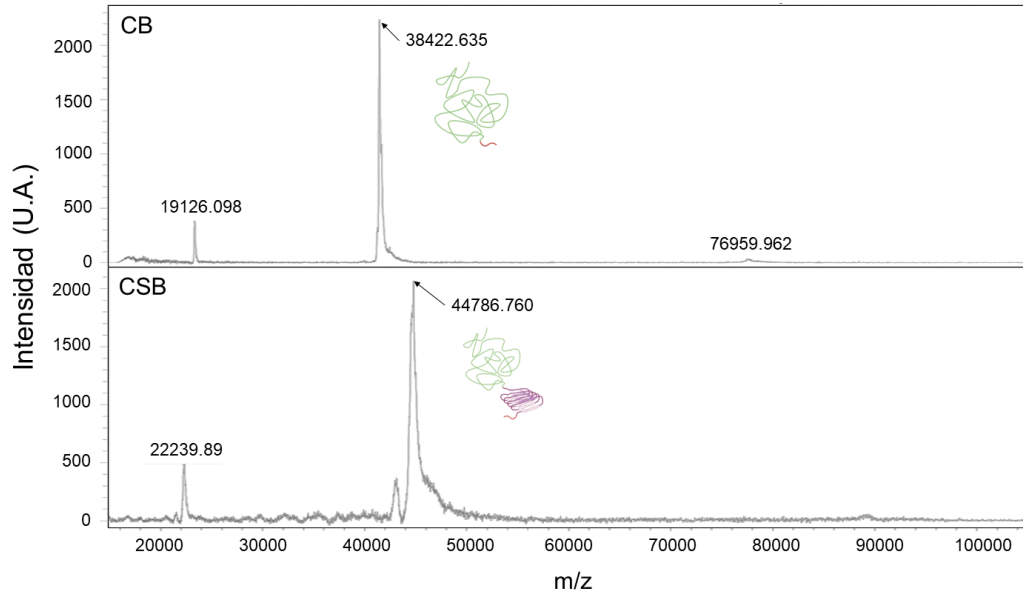


Figura 5. Determinación del peso molecular de las proteínas modulares mediante espectrometría de masas. Las muestras se analizaron mediante MALDI-TOF en una matriz de ácido sinapínico. La adquisición se realizó operando en modo lineal.

8.2 Formación de AVLPs con pDNA

En estudios previos a este trabajo se ha explorado la formación de AVLPs con ácidos nucleicos de distinta naturaleza, tales como dsDNA y RNA en forma mRNA y RNA de silenciamiento (siRNA) [9,10,79,136]. Sin embargo, el uso de pDNA es una estrategia atractiva para la entrega de genes funcionales a células. Por lo cual, se estudió a detalle la formación de AVLPs con las proteínas CB o CSB y pDNA. Primero exploramos la unión de las proteínas al pDNA mediante EMSA. Este ensayo permite observar de una manera rápida la formación de complejos entre las proteínas y el pDNA al observar el retraso en la migración del pDNA como resultado de la neutralización de su carga negativa cuando éste interacciona con las proteínas. En la figura 6.A se muestra el gel de EMSA en donde se observa como a valores crecientes de N/P la migración del pDNA en el gel se va retrasando hasta neutralizarse completamente, esto ocurrió aproximadamente a una N/P de 3 para ambas proteínas. En la figura 6.B se observa el gráfico de la fracción de pDNA libre en función de la N/P en donde se observa que CSB neutralizó al pDNA a valores de N/P menores comparado con CB. Lo anterior es debido al diseño de las proteínas. CSB contiene el bloque "S" que brinda interacciones entre proteína-proteína, y por tanto facilita el ensamblaje de las AVLPs siguiendo un modelo cooperativo [79,112].

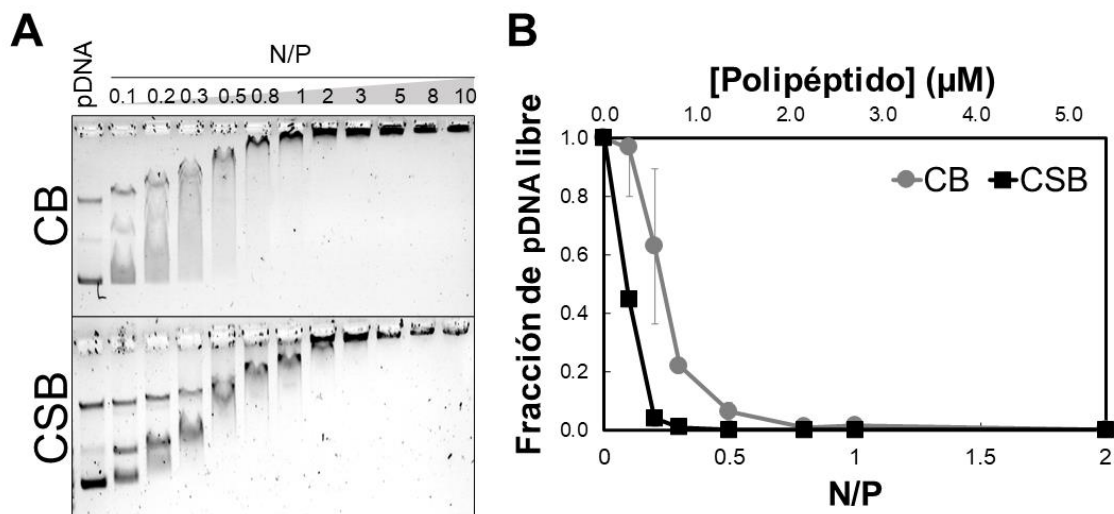


Figura 6. Formación de AVLPs con pDNA. (A) EMSA de la formación de AVLPs con las proteínas CB y CSB con pDNA a diferentes valores de N/P. (B) Gráfico de la fracción de pDNA libre en función de la N/P utilizada para formar AVLPs.

8.3 Caracterización morfológica de AVLPs con pDNA

Posteriormente se analizó la morfología de las AVLPs formadas por las proteínas y pDNA mediante AFM. Para ello se formaron AVLPs a una N/P = 5. En la figura 7 se muestran las imágenes de AFM de estas partículas. Las AVLPs formadas con CB tienen una morfología parecida a la del plásmido solo, con una longitud de contorno promedio de 1425 nm y una altura de 1.5 nm. Esto sugiere que CB únicamente decora al pDNA sin condensarlo, tal y como se ha observado en estudios anteriores con AVLPs formadas con dsDNA [79,80].

Las AVLPs formadas con CSB tienen una morfología tipo rodillo, la cual ha sido previamente reportada para estas AVLPs y es resultado de la formación de fibras del bloque "S" al momento del autoensamblaje [112]. Se observó que además hay una coexistencia de dos poblaciones con longitudes alrededor de 250 nm y 500 nm (figura 7.D), sin embargo, ambas poblaciones tienen una altura aproximada de 3.5 nm (figura 7.F). Tomando en cuenta que el DNA tiene un tamaño de 3.4 nm cada 10 pb, que en previos estudios se ha sugerido que CSB condensa al DNA en partículas de aproximadamente 1/3 el tamaño del DNA y que el pDNA utilizado es de 4726 pb, se esperaría obtener partículas de alrededor de 535 nm. Por lo cual, la población de AVLPs con tamaño aproximado a 500 nm podría corresponder a AVLPs formadas con el plásmido linealizado, mientras que la población con

tamaño de aproximadamente 250 nm correspondería a AVLPs formadas con plásmido circular, asumiendo que, por su geometría, es probable que el plásmido pueda acomodarse en la mitad de la longitud del rodillo de las AVLPs. Sin embargo, experimentos en los cuales se logre aislar estas dos poblaciones y extraer el pDNA de las AVLPs podría corroborar esta hipótesis.

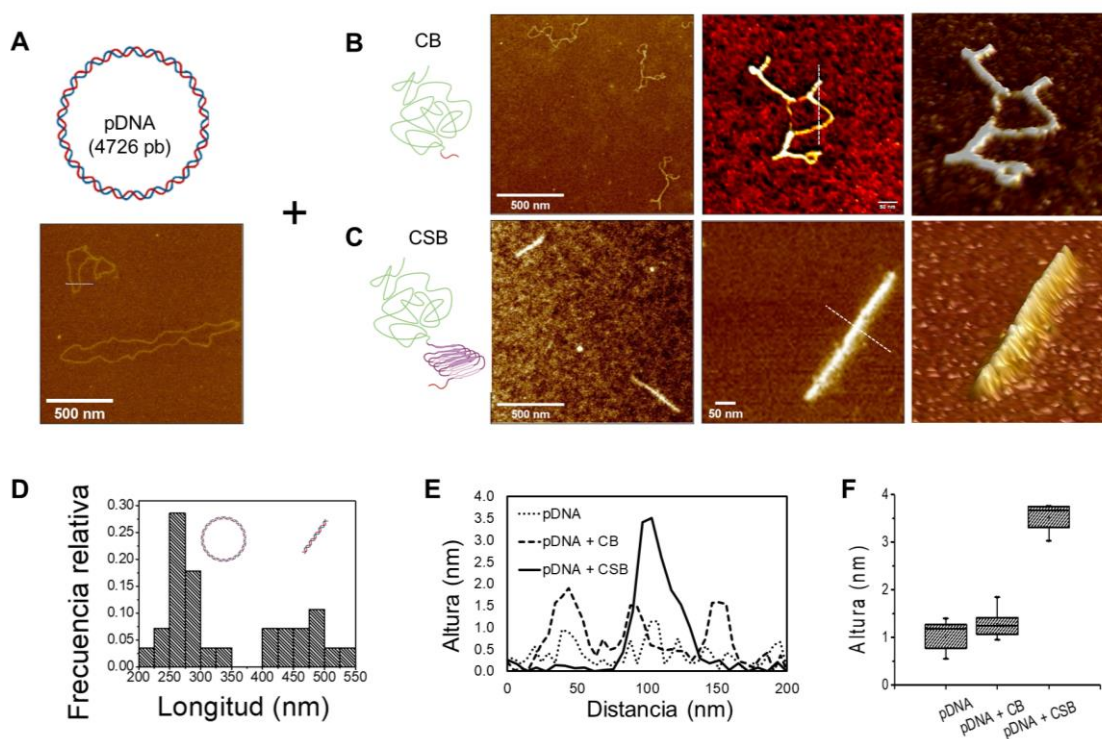


Figura 7. Caracterización morfológica de AVLPs de CB y CSB con pDNA. (A) Imagen de AFM de pDNA. (B) y (C), esquemas de CB y CSB e imágenes representativas de las AVLPs formadas con CB o CSB respectivamente. Las barras de escala corresponden a 500 nm (izquierda) y 50 nm (centro). (D) Histograma de la frecuencia relativa de longitud de las AVLPs de pDNA y CSB. (E) Perfiles de altura de pDNA y las AVLPs de CB y CSB. Los perfiles corresponden a las líneas punteadas en las figuras A, B y C para cada muestra. (F) Dispersión de altura de las AVLPs determinada mediante análisis de AFM.

8.4 Diámetro hidrodinámico y potencial ζ de las AVLPs

El análisis de tamaño de partícula mediante DLS muestra que las proteínas tienen un D_H de aproximadamente 10 nm, y el pDNA de 450 nm (figura 8.A). Al formar AVLPs entre las proteínas y el pDNA se observan diversas poblaciones con tamaños de partícula que van desde los 70 hasta los 800 nm aproximadamente. Sin embargo, los tamaños de partículas obtenidos mediante DLS son el resultado de un ajuste de los datos experimentales a un modelo de difusión que considera que las partículas observadas tienen morfología esférica [137]. Dado que las AVLPs tienen forma irregular, en el caso de CB y

de rodillo para el caso de CSB, los valores de D_H no necesariamente reflejan las dimensiones observadas por AFM y, por ende, los valores observados mediante DLS únicamente indican la formación de complejos más grandes cuando se mezclan CB o CSB con pDNA en comparación con los componentes individuales.

El análisis de movilidad electroforética mostró que el pDNA tiene un potencial ζ de -19.97 ± 1.95 mV, mientras que el de las AVLPs es de -5.85 ± 0.68 mV para CSB y -5.89 ± 2.2 mV para CB (fig. 8.B). En contraste, las proteínas solas presentaron un potencial ζ de -3.19 ± 0.75 para CSB y -3.39 ± 1.49 para CB. Estos resultados evidencian la neutralización de la carga del pDNA al momento de formar AVLPs con CSB o CB. El valor de ζ de nanopartículas es un factor que influye en su estabilidad coloidal, biodistribución, capacidad de evadir el sistema inmune, así como su capacidad de internalización en células [138]. Se ha descrito que partículas con valores absolutos de ζ por encima de 30 mV presentan alta estabilidad coloidal y no tienden a agregarse [139,140]. En este sentido, la baja carga negativa de las AVLPs podría indicar que estas tienden a agregarse a través del tiempo en solución. Por otro lado, se ha descrito que nanopartículas con carga superficial positiva son más propensas a ser internalizadas por células, en este caso la carga superficial negativa de las AVLPs pudiera explicar la baja eficiencia de transfección de las AVLPs observada en estudios previos.

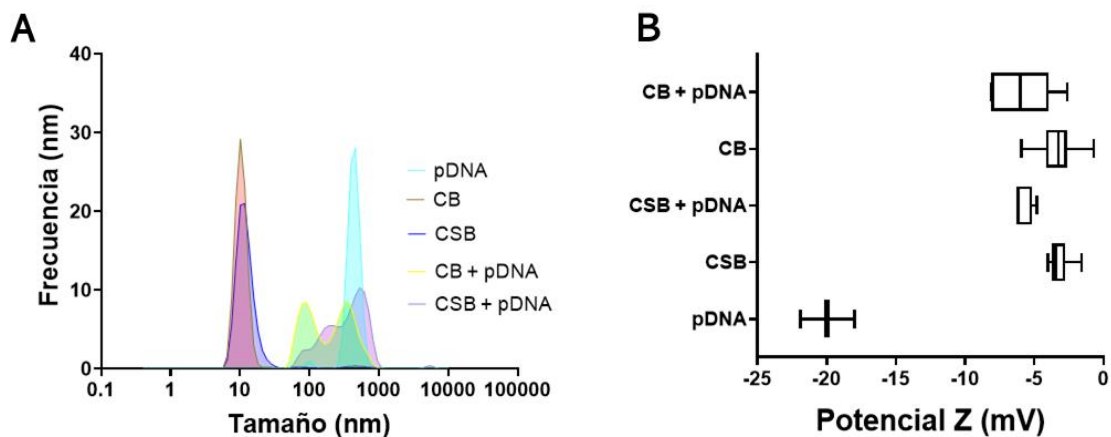


Figura 8. Análisis de AVLPs mediante dispersión dinámica de luz (DLS) (A) Distribución de tamaño por volumen de las AVLPs. (B) Potencial ζ de pDNA, CB, CSB y AVLPs de pDNA y CB o CBS.

8.5 Evaluación de la estabilidad de las AVLPs

El estudio de la estabilidad de las AVLPs en medios que simulen condiciones fisiológicas es importante para evaluar la factibilidad de que puedan ser utilizadas como sistemas de entrega. Esto debido a que las AVLPs deberán de ser lo suficientemente estables para proteger su cargamento durante todo el proceso de entrega hasta el momento en el que entre a la célula. Dado que la formación de las AVLPs está gobernada principalmente por interacciones electrostáticas entre las proteínas y el ácido nucleico, se estudió la estabilidad de las AVLPs en presencia de heparina, un polianión de alta densidad de carga negativa, que es capaz de competir con el DNA por la interacción con las proteínas. Además, la heparina es un polímero anticoagulante presente de forma natural en la sangre a concentraciones entre 1 y 2.4 ng/μL [141].

Las AVLPs se formaron a una N/P = 5 y fueron expuestas a distintas cantidades de heparina previo a su análisis mediante EMSA. En la figura 9 se observa que las AVLPs de CB comienzan a desensamblarse a una concentración de heparina aproximada de 2.5 ng/μL, mientras que a 4.2 ng/μL de heparina se desensamblan completamente. De forma similar, las AVLPs de CSB comienzan a desensamblar desde 2.5 ng/μL de heparina, sin embargo, no se observó una liberación completa del pDNA incluso a concentraciones de hasta 8.3 ng/μL de heparina. Tomando en cuenta las concentraciones endógenas de heparina en sangre (1 a 2.4 ng/μL), se puede concluir que, en estas condiciones, particularmente para CSB, una fracción de las AVLPs se mantiene formada.

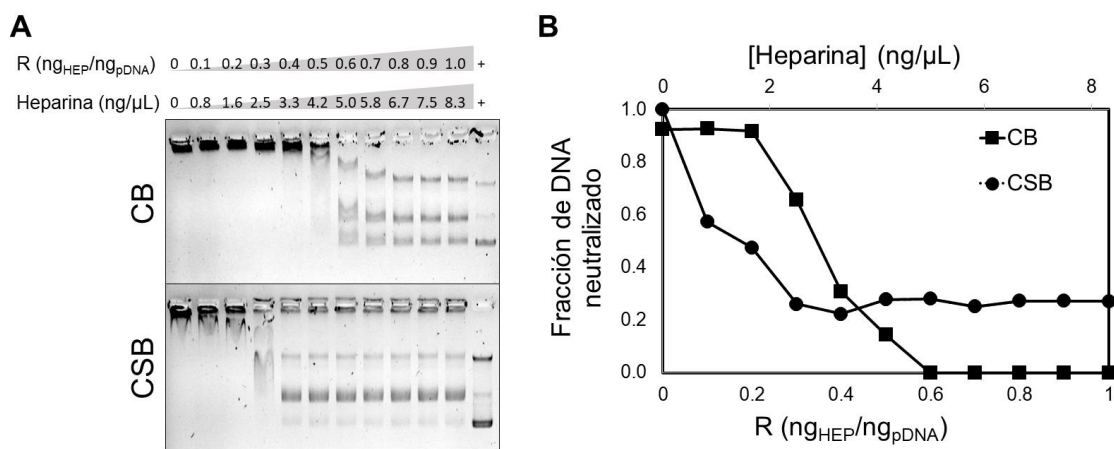


Figura 9. Estabilidad de AVLPs en heparina. (A) EMSA de AVLPs de CB o CSB con pDNA incubadas en concentraciones crecientes de heparina. (B) Gráfico de la fracción de DNA neutralizado formando AVLPs en función de la concentración de heparina. R: relación en masa de heparina/pDNA. HEP: heparina.

Posteriormente se evaluó la estabilidad de las AVLPs en distintos medios de cultivo comúnmente utilizados en investigación con células de mamífero. Se utilizó el medio Opti-MEM, ampliamente utilizado en ensayos de transfección, y los medios DMEM y DMEM suplementado con SFB (5 %). En la figura 10 se puede observar que no hubo una liberación evidente de pDNA de las AVLPs formadas con CB o CSB cuando se incuban en medio Opti-MEM o DMEM. Sin embargo, cuando se utilizó medio suplementado con SFB, se observa un barrido en las AVLPs de CB a partir de las 12 h de incubación. Cuando se indujo el desensamble de las AVLPs incubadas por 24 h en el medio mediante la adición de un exceso de heparina a 8.3 ng/μL, se observa un barrido igual al de plásmido solo incubado 24 h en el medio de cultivo. Lo cual sugiere que CB no protege de manera eficiente al pDNA cuando se incuba en medio de cultivo con SFB. Por otro lado, cuando se incuban AVLPs de CSB en medio suplementado con SFB, no se observó un desensamble de estas. Además, cuando se indujo el desensamble de las AVLPs con heparina a 8.3 ng/μL, se observa un patrón de bandeado ligeramente barrido que es igual al plásmido solo recién mezclado con medio, que claramente es distinto del barrido correspondiente al plásmido solo y degradado incubado durante 24 h en el medio con SFB. Estos datos sugieren que CSB brinda protección al DNA por lo menos 24 h en el medio suplementado con 5 % de SFB.

Finalmente se evaluó la estabilidad de las AVLPs en medios de cultivo con alto porcentaje de SFB (10, 20 o 100%). En la figura 11 se observa que en estas condiciones no se aprecia un desensamble de las AVLPs a lo largo del tiempo, sin embargo, el control de liberación de pDNA a las 24 h con heparina muestra un patrón que no corresponde al del carril de pDNA mezclado con medio justo antes de cargar en el gel, lo que sugiere que el pDNA es degradado en presencia de SFB durante el periodo de incubación. Sin embargo, el grado de protección que brindan las AVLPs, particularmente CSB, al pDNA en presencia de suero es similar al de otros sistemas desarrollados con base en péptidos y que han presentado resultados favorables en ensayos de transfección [4,142].

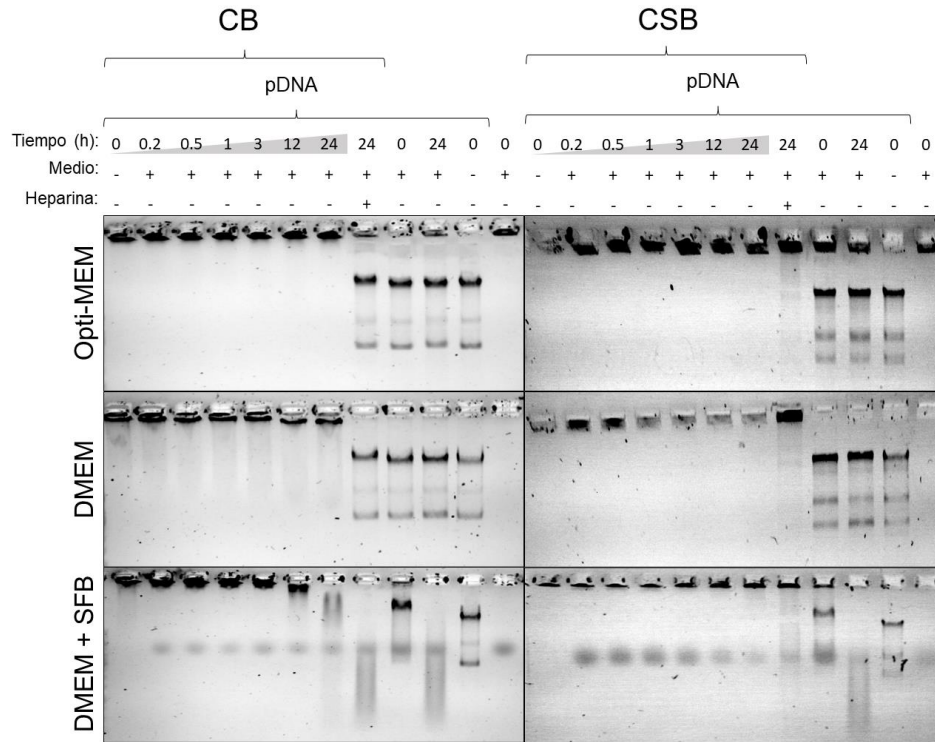


Figura 10. Estabilidad de las AVLPs formadas con CB o CSB y pDNA en medio de cultivo Opti-MEM, DMEM o DMEM suplementado con SFB al 5 %.

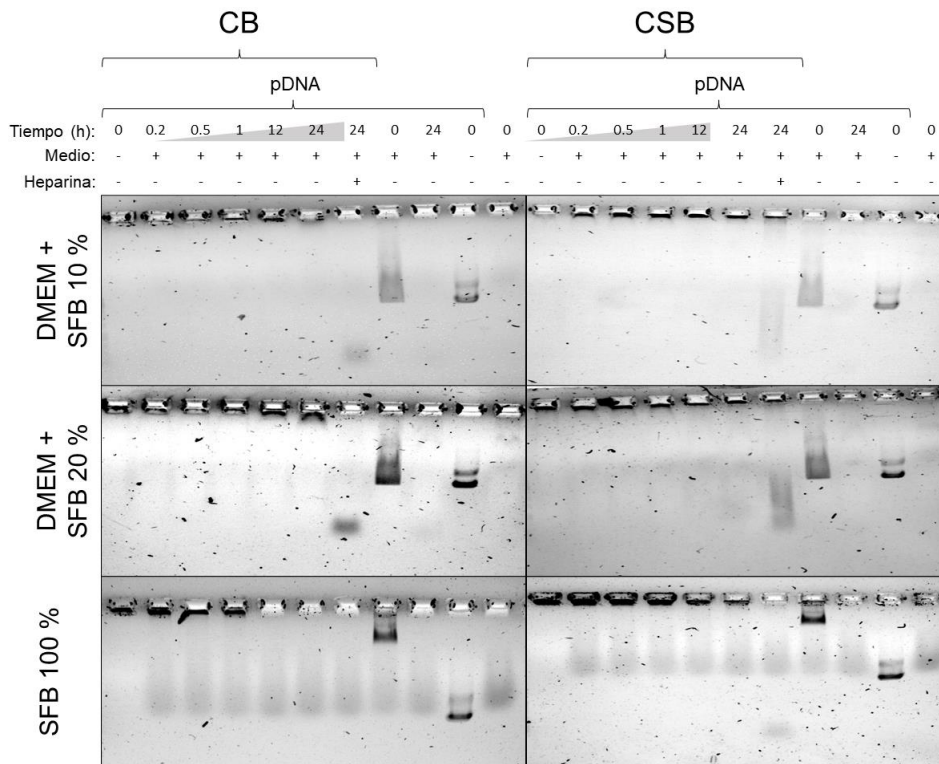


Figura 11. Estabilidad de las AVLPs formadas con CB o CSB y pDNA en medio de cultivo DMEM suplementado con altos porcentajes de SFB (10, 20 y 100 %).

8.6 Evaluación de la respuesta inmune humoral de las AVLPs

La inmunogenicidad de los vectores para la entrega de ácidos nucleicos es un factor crítico que puede limitar de manera importante su seguridad y uso. Particularmente, la respuesta humoral inducida por el vector utilizado limita su eficiencia de entrega y también la capacidad de poder realizar administraciones repetidas cuando la aplicación así lo requiera [47–49]. Por esta razón, decidimos evaluar la respuesta inmune humoral de las AVLPs y compararla con la respuesta de un vVAA (serotipo 1) como referencia, ya que existen fármacos ya aprobados para su uso clínico en humanos basados en éste.

En general, existen varios factores que pueden afectar el nivel de la respuesta inmune, como la dosis y vía de administración [143,144]. Para un estudio comparativo entre AVLPs y vVAA, estas dos variables deberán ser iguales y analizarse en las mismas condiciones. En este sentido, la dosis y la vía de administración se seleccionaron con base en reportes de experimentos relacionados con la entrega de ácidos nucleicos en modelos murinos. Con respecto a la vía de administración, la vía intramuscular es una de las rutas más empleadas, mientras que las dosis utilizadas, normalmente se reportan en términos de número de copias del gen de interés (gc) y corresponden a valores desde 10^9 – 10^{12} gc [145–150]. Es importante aclarar que un mismo número de partículas o gc ya sea de AVLPs o vVAA, no necesariamente corresponde a un mismo valor en términos de masa, lo cual repercute directamente en el número de antígenos presentes (tomando en cuenta que cada partícula está constituida por varias copias de cada una de las proteínas que la componen), lo cual pudiera tener un efecto sobre el nivel de inducción de la respuesta humoral. Esta diferencia en masa es debida al peso molecular de cada partícula. Mientras que el peso molecular de vVAA es de aproximadamente 3.8 MDa [151], el peso molecular de las AVLPs varía dependiendo del ácido nucleico que se utiliza como molde. El cálculo del peso molecular teórico de las AVLPs considera que todos los grupos fosfatos del ácido nucleico molde se neutralizan 1 a 1 con las 12 lisinas del bloque “B” de las proteínas, por lo tanto, se considera que hay una molécula de CB o CSB por cada 12 nucleótidos del ácido nucleico molde. Considerando estos factores, se decidió realizar dos experimentos, uno en donde se utilizó la misma dosis en términos de masa de proteína, ya sea de las AVLPs o de vVAA, y un segundo experimento en donde se administró la misma dosis en términos de copias genómicas. Dado que es la primera vez que se utilizan las AVLPs para experimentos *in vivo*, se seleccionaron dosis bajas que corresponden a 54.5 ng de proteína total o bien 10^{10} gc. En la tabla 2 se describe a detalle las dosis utilizadas para cada experimento y su equivalencia entre masa de proteína y gc, para cada caso. Aquí se puede observar que,

por ejemplo, la misma dosis de 54.5 ng de proteína total, corresponde 3×10^{10} gc para vVAA mientras que para las AVLPs esto es aproximadamente 0.1×10^{10} gc, una diferencia que corresponde a un orden de magnitud.

Tabla 2. Dosis de vVAA y AVLPs utilizadas en los experimentos de inmunización.

Experimento	Figura	vVAA		AVLPs	
		Proteína (ng)	gc ($\times 10^{10}$)	Proteína (ng)	gc ($\times 10^{10}$)
Proteína total	13.A	54.5 ^a	3 ^b	54.5 ^a	0.1 ^α , 0.09 ^β
Copias genómicas	13.B	18.15 ^a	1 ^b	502 ^α , 585 ^β	1 ^b
Dosis altas*	14	-	-	50000 ^a	7.8 ^α , 6.7 ^β

a: Proteína total determinada mediante BCA. b: copias genómicas determinadas mediante qPCR. *: en este experimento se administró un refuerzo de la misma dosis 15 días después de la primera inmunización. α: valor determinado teóricamente basado en el peso molecular de CB y considerando una molécula de CB por cada 12 nucleótidos. β: valor determinado con base en el peso molecular de CSB y una molécula de CSB cada 12 nucleótidos.

Para poder comparar la producción de anticuerpos IgG inducida por las AVLPs o vVAA, se estandarizaron las condiciones de ELISA, particularmente, la concentración de antígeno adsorbido a la placa. El objetivo fue seleccionar la concentración menor de cada antígeno que resulte en la mayor señal y que ésta se encuentre dentro del intervalo de linealidad del detector. Para ello se utilizaron los sueros de grupos correspondientes a CSB o vVAA que dieron mayor señal en un estudio exploratorio previo, los cuales corresponden a los grupos inmunizados con 50 µg CSB + adyuvante o 54.5 ng de vVAA, y se probaron a una dilución fija 1:100 con distintas concentraciones de cada antígeno adsorbido a la placa. De acuerdo a la figura 12, las concentraciones seleccionadas para cada caso corresponden a 1 µg/mL para CSB y 0.1 µg/mL para vVAA. Estas condiciones permiten una mayor sensibilidad para cada ELISA y además asegura que todas las mediciones se encuentran dentro del intervalo de linealidad del detector. Sin embargo, para comparar los valores observados para los ELISA de cada antígeno, es importante tener en cuenta que en los ensayos de estandarización, los sueros utilizados para CSB corresponden a una concentración que es 3 órdenes de magnitud más grande en términos de proteína que para vVAA, además la concentración de antígeno adsorbido a la placa seleccionada para los ensayos es también mayor en un orden de magnitud para CSB, lo que teóricamente resultaría en una detección más sensible de IgG contra CSB que contra vVAA. Sin embargo, cuando se administró la misma dosis de AVLPs o vVAA, ya sea en términos de proteína total (fig. 13.A) o de gc (fig. 13.B), no se observó la producción de anticuerpos IgG contra

las AVLPs, incluso en los grupos control en los que se utilizó adyuvante. En contraste, vVAA si generó una respuesta inmune evidente con o sin adyuvante. Lo anterior sugiere que las AVLPs inducen una respuesta humoral menor que vVAA.

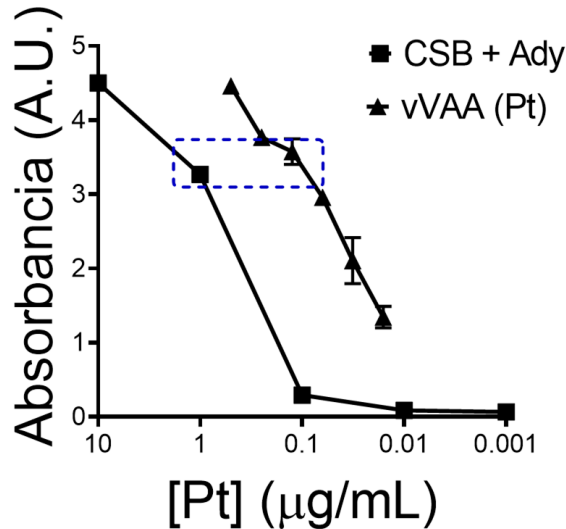


Figura 12. Estandarización de la concentración de antígeno adsorbido a la placa en el ensayo de ELISA. La dilución de cada suero se mantuvo constante a 1:100. Los sueros analizados corresponden a grupos de ratones inmunizados vía intramuscular con 2 dosis de 50 µg de CBS suplementado con adyuvante más un refuerzo de la misma dosis 15 días después, o una sola dosis de 54.5 ng de vVAA. Los sueros se obtuvieron a la semana 8 por sangrado de la vena de la cola. Las concentraciones seleccionadas para futuros ELISA corresponden a los puntos encerrados en el rectángulo punteado azul: 1 µg/mL para CSB y 0.1 µg/mL para vVAA. Las líneas verticales corresponden al error estándar de la media. Ady: Adyuvante de alúmina

Posteriormente se realizó un tercer experimento de inmunización en el que se utilizaron dosis altas de AVLPs. En este experimento se formaron AVLPs con CSB o CB y un ASO. La selección del ASO fue debido a que, en un estudio en colaboración con el grupo de la Dra. Bertha Espinoza del Instituto de Biomédicas, UNAM, demostramos que las AVLPs formadas con ASO son capaces de reprimir la expresión del gen de interés en el parásito *T. cruzi* [115]. En este experimento, se observó la máxima de producción de IgG a la semana 8 para todos los grupos. En el caso de las AVLPs de CB, la inducción de IgG fue modesta, incluso en la presencia de adyuvante (figura 14). Por el contrario, las AVLPs de CSB indujeron una mayor respuesta, que corresponde a dos veces la de AVLPs de CB, la cual se incrementó hasta 4 veces en presencia de adyuvante. Además, los grupos inmunizados con CSB indujeron una respuesta que corresponde a 1.6 veces la respuesta de CSB en forma de AVLPs, lo que indica que las proteínas son menos inmunogénicas

cuanto están formando AVLPs. De manera similar, el uso de adyuvante incrementó la respuesta de CSB hasta 3 veces.

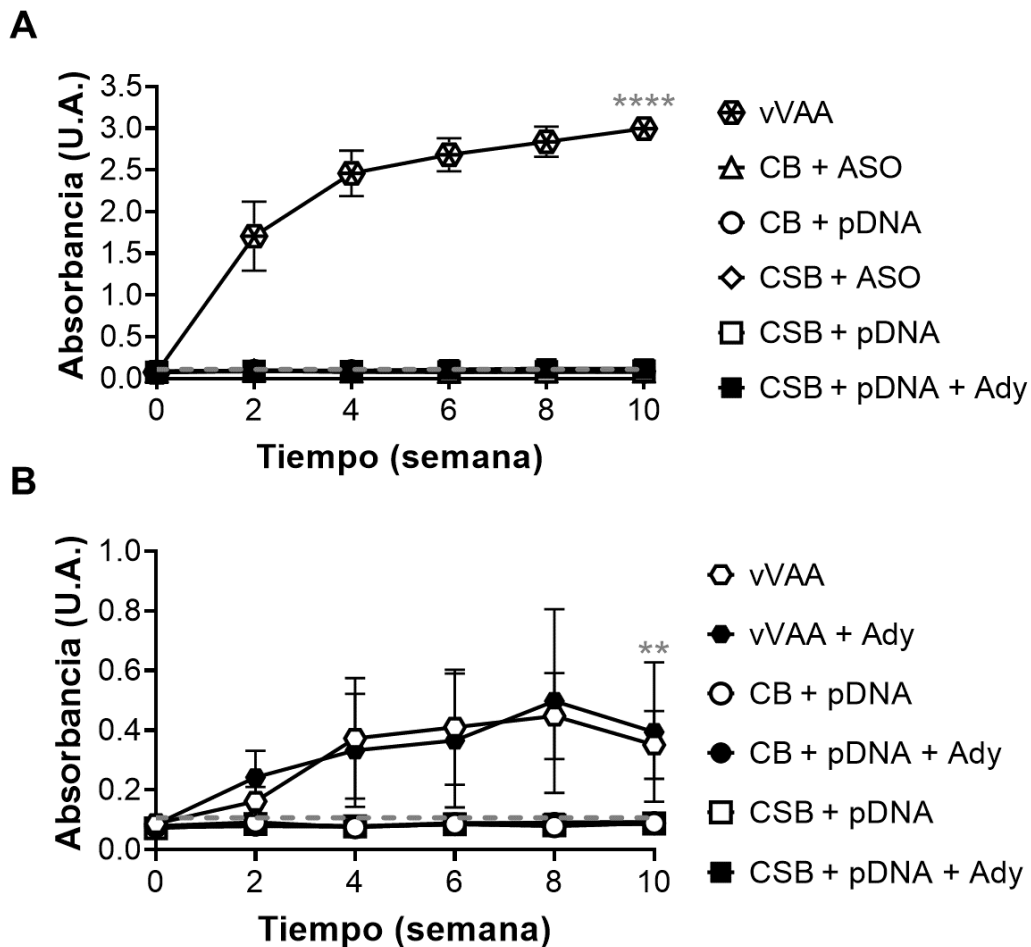


Figura 13. Comparación de inducción de producción de anticuerpos IgG entre las AVLPs y vVAA. ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra las AVLPs (específicamente contra CSB) o vVAA en los sueros de los ratones inmunizados con misma dosis de: (A) proteína total: 54.5 ng o (B) cantidad de copias genómicas: 10^{10} gc. Los ELISA se realizaron siguiendo el protocolo descrito en la sección 7.14 conforme a la estandarización de la figura 12. Ady: adyuvante de alúmina. Cada punto representa el promedio de un grupo (n=5). Las líneas verticales representan el error estándar promedio. Las líneas grises punteadas representan el umbral negativo/positivo. Se utilizó un análisis de ANOVA de dos vías para determinar la significancia de la diferencia contra sueros obtenidos previo a la inmunización (** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$).

La determinación de títulos de anticuerpos obtenidos en este experimento a la semana 8 post inmunización fue de 1:400 y 1:200 para los grupos inmunizados con CSB solo o en forma de AVLPs con ASO (fig. 15.A), mientras que la coadministración de adyuvante potenció la producción de IgG resultando en títulos de 1:6400 y 1:3200 respectivamente. Por otro lado, los títulos obtenidos de los sueros de los grupos inmunizados con vVAA fueron 1:100 para el experimento de misma dosis de copias genómicas y 1:1600 para el experimento de misma dosis de proteína (fig. 15.B). Tomando

en cuenta que en estos experimentos las dosis difieren en un factor de 1000 veces, es claro que las AVLPs presentan una respuesta humoral menor que vVAA.

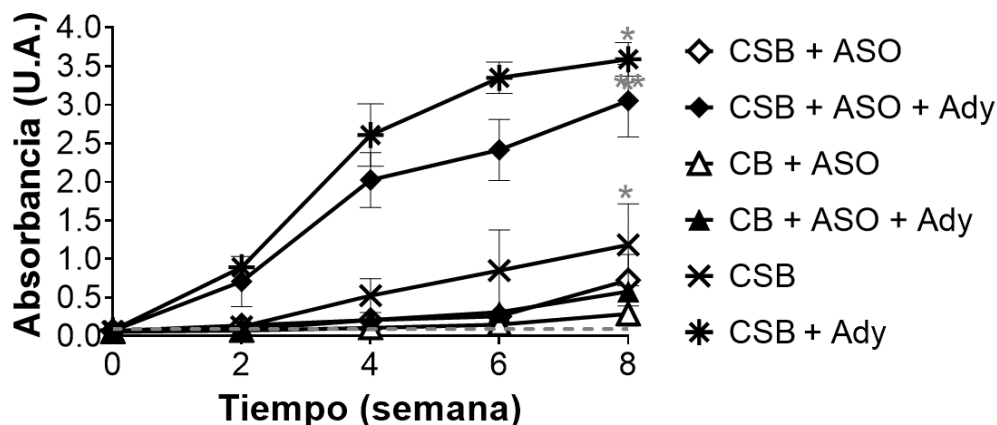


Figura 14. Producción de anticuerpos IgG contra AVLPs tras la inmunización con altas dosis. ELISA de detección de IgG contra CSB de sueros de ratones inmunizados con altas dosis de AVLPs de CSB o CB con ASO, o con CSB solo. Todos los grupos fueron inmunizados con 50 µg de proteína total, más un refuerzo de la misma dosis 15 días después de la primera inmunización. Cada punto representa el promedio de un grupo (n=3). Los ELISA se realizaron siguiendo el protocolo descrito en la sección 7.14 conforme a la estandarización de la figura 12. Ady: Adyuvante de alúmina. Las líneas verticales representan el error estándar medio. La línea gris punteada representa el umbral negativo/positivo. Se utilizó un análisis de ANOVA de dos vías para determinar la significancia de la diferencia con respecto a sueros correspondientes a la pre-inmunización (*p≤0.05, **p≤0.01).

Posteriormente, la especificidad de los IgG detectados mediante ELISA se corroboró mediante análisis de WB utilizando mezclas de cada grupo de sueros de ratones inmunizados con dos dosis de 50 µg de proteína total de CSB o AVLPs de CSB o CB con ASO, donde se observó que todos los sueros son capaces de reconocer de manera específica a CSB y a CB (fig. 16).

En estos experimentos es evidente que la producción de anticuerpos contra las proteínas se reduce en presencia de ASO, es decir, cuando se encuentran en forma de AVLPs, lo cual puede deberse a la neutralización de las cargas positivas del bloque B. Esto debido a que existen reportes que sugieren que los antígenos catiónicos tienen una mayor capacidad de interacción con las células presentadoras de antígeno y por tanto, inducir la producción de anticuerpos [152,153].

Estos experimentos demuestran que las AVLPs presentan una respuesta inmune humoral menor que aquella observada para vVAA. Esto implica que las AVLPs pueden ser utilizadas a mayores dosis con un menor riesgo de inducir una respuesta inmune humoral en comparación con vVAA u otros vectores virales. Lo anterior considerando el consenso general de que vVAA es uno de los vectores virales menos inmunogénicos [30].

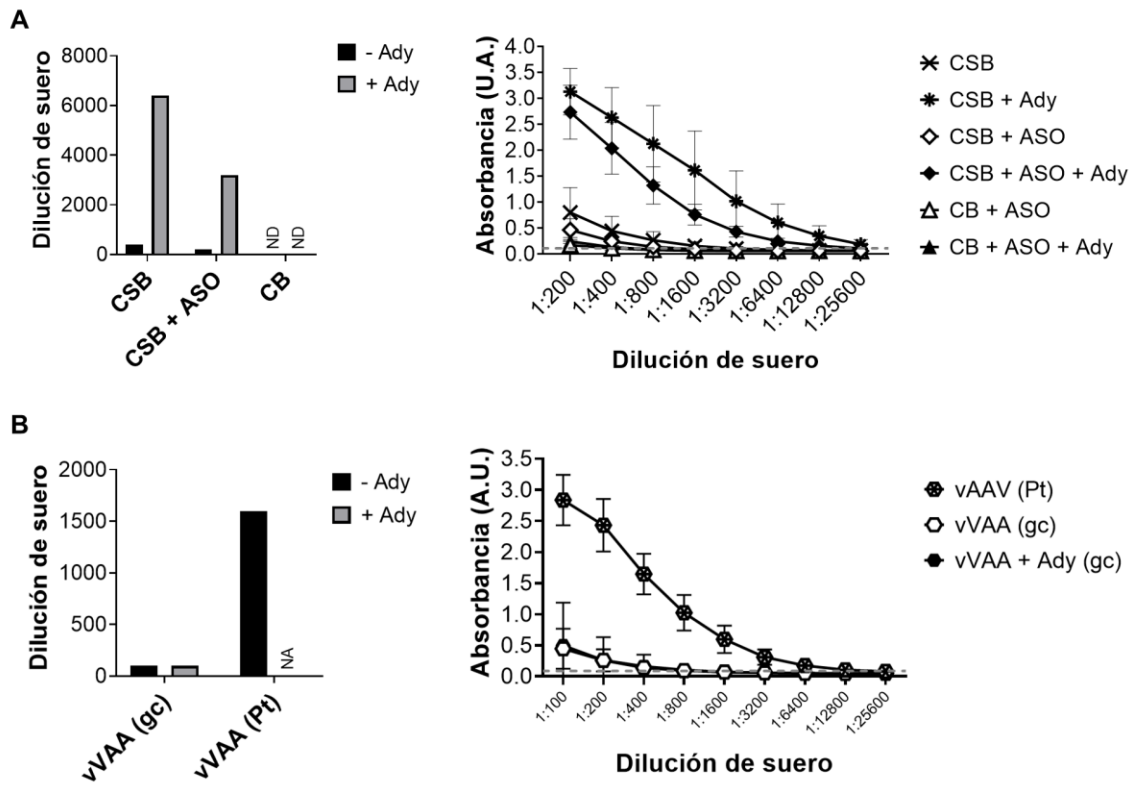


Figura 15. Títulos de anticuerpos de sueros de ratones inmunizados con AVLPs o vVAA. Gráfico de la máxima dilución con señal positiva para cada grupo y ELISA de titulación de cada grupo de sueros. ND: no determinado por sensibilidad del protocolo. NA: No se realizó este experimento. (A) Título de sueros de ratones inmunizados con dos dosis de 50 μ g de proteína de CSB o AVLPs de CSB o CB con ASO. (B) Título de anticuerpos de sueros de ratones inmunizados con vVAA. Pt: suero de ratones inmunizados con 54.5 ng de proteína. gc: suero de ratones inmunizados con 10^{10} gc. Los ELISA se realizaron siguiendo el protocolo descrito en la sección 7.14. Ady: Adyuvante de alúmina. Las líneas verticales representan el error estándar medio. Las líneas grises punteadas corresponden al umbral negativo/positivo.

La baja inmunogenicidad de las AVLPs puede atribuirse al bloque "C", considerando que éste representa más del 80 % de la composición total en masa de las proteínas y que es éste el que se encuentra expuesto al exterior de la partícula. Además, el bloque "C" fue diseñado a partir del motivo derivado de la colágena (GXY)_n, en donde para este caso X y Y son aminoácidos hidrofílicos. La particularidad de este bloque es que a diferencia de otras proteínas derivadas del colágeno que se pliegan en estructuras tipo triple hélices, el bloque "C" no tiene una estructura secundaria definida [116]. Sin embargo, existen varios estudios

en dónde se reporta la baja inmunogenicidad y biocompatibilidad de biomateriales derivados de la colágena [154–156].

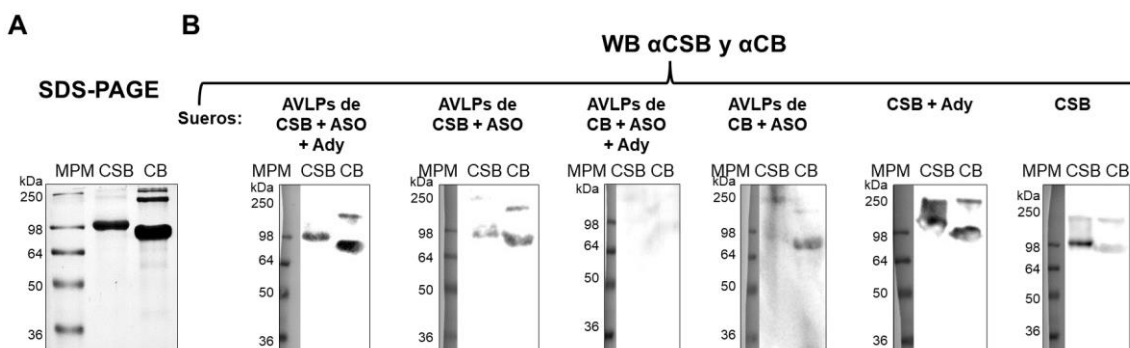


Figura 16. Detección de CSB y CB mediante WB con los sueros de ratones inmunizados con altas dosis de proteína de CSB o AVLPs. (A) SDS-PAGE de CSB y CB. (B) WB para la detección de CSB y CB utilizando los sueros de cada grupo de los ratones inmunizados con dos dosis de 50 µg de proteína de CSB o de AVLPs. α: anti.

Al comparar los niveles de respuesta humoral de AVLPs de CB contra AVLPs de CSB, se observó que las últimas produjeron mayores niveles de anticuerpos. Las principales diferencias entre estas AVLPs que pudieran explicar este efecto son la presencia del bloque “S” y la morfología rígida tipo rodillo para el caso de AVLPs de CSB. Existen reportes de que los péptidos derivados de la seda, como el bloque S, generalmente no generan una respuesta inmune o lo hacen en un nivel bajo. Por otro lado, las propiedades físico-mecánicas de las AVLPs como rigidez y morfología podrían ser las responsables de aumentar la capacidad de inducir anticuerpos [157,158]. Además, es importante considerar que, de acuerdo al análisis de WB, los anticuerpos producidos al inmunizar con CSB, detectaron también a CB, por tal razón, una fracción de estos anticuerpos debió haberse producido contra uno de los bloques comunes para ambas proteínas.

8.7 Modificación de los módulos de CSB mediante clonación

Las AVLPs han demostrado ser candidatos prometedores para su uso como acarreadores de ácidos nucleicos. Diversos estudios han evaluado esta aplicación utilizando ASO, siRNA o mRNA [9,10,115]. En todos ellos, la actividad el ácido nucleico empleado ha sido baja. Esto podría ser debido a que las AVLPs no entran a las células de interés de manera eficiente. Por estas razones, en este trabajo se planteó el rediseño de las proteínas para añadirles bloques funcionales que permitan la entrada eficiente de las AVLPs a las células. En la figura 17 se muestra el esquema de las modificaciones planteadas a las proteínas. Para facilitar la entrada a las células mediante mecanismos

físicos se utilizó el péptido Au. Para facilitar la entrada mediada por receptor se usó la proteína Tf.

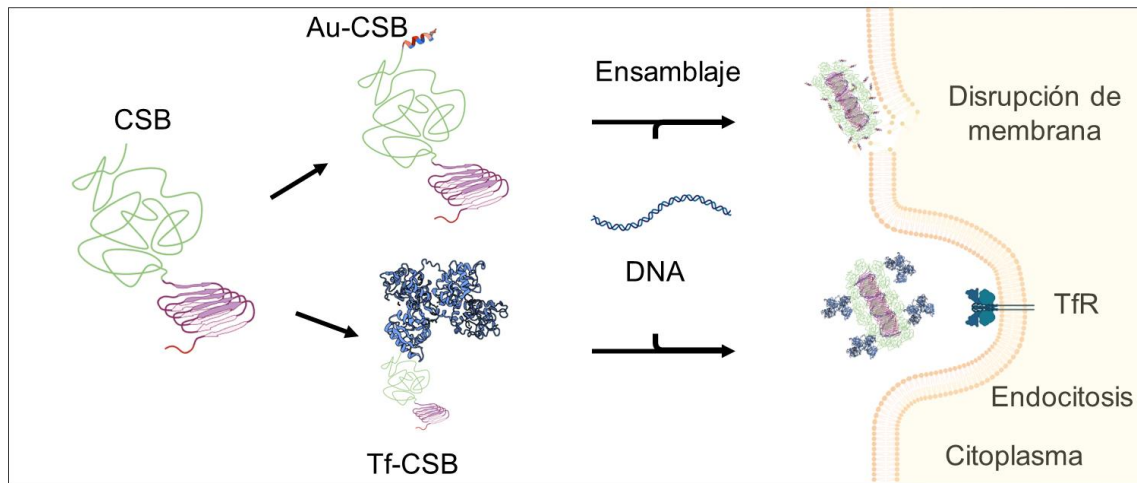


Figura 17. Esquema de las modificaciones propuestas a las proteínas CSB para facilitar su entrada a las células. El péptido de aureína (Au) permite la entrada a las células mediante mecanismo físicos mediante la disrupción de las membranas de las células. Transferrina (Tf) facilita la entrada mediante endocitosis mediada por receptor. TfR: receptor de transferrina.

La primera estrategia para fusionar los bloques Au y Tf a las proteínas consistió en una fusión recombinante para producir las proteínas en la levadura *K. phaffi* y posteriormente purificarlas del sobrenadante. Para ello se planteó la fusión de las secuencias de DNA codificante para cada uno de estos bloques al extremo N-terminal de las proteínas. Esto debido a que es el extremo N-terminal el que queda expuesto al exterior de las AVLPS. El diseño por bloques de las proteínas se muestra en la figura 18.



Figura 18. Diseño mediante bloques de las modificaciones a las proteínas. Los bloques de aureína y transferrina se adicionan en el extremo N-terminal de las proteínas. NT: extremo N-terminal, CT: extremo C-terminal.

En la figura 19 se muestran los fragmentos amplificados por PCR para la clonación de *Tf-CSB*: el fragmento *Tf* con los sitios de restricción para *Xho*I y *Xba*I (2112 pb), el fragmento de *CSB* con los sitios de restricción para *Xba*I y *Not*I (1538 pb), y la fusión *Tf-CSB* (3642 pb). El fragmento *Tf-CSB* se insertó en el plásmido pPIC9 y se transformó en la cepa de *E. coli* DH10 β . En la figura 20 se muestra el PCR de colonia utilizando los cebadores de AOX que reconocen las regiones en el plásmido que flanquean el sitio de inserción de la secuencia de interés. Con estos cebadores se obtuvo una banda de 4113 pb. Posteriormente se realizó una extracción de plásmido de *E. coli* y se analizó con un perfil de restricción utilizando la enzima *Xba*I. El plásmido pPIC9-*Tf-CSB* tiene dos sitios de corte reconocidos por *Xba*I, por lo cual se generaron dos bandas de 2322 y 9283 pb respectivamente, las cuales se pueden observar en el gel de la figura 20.C.

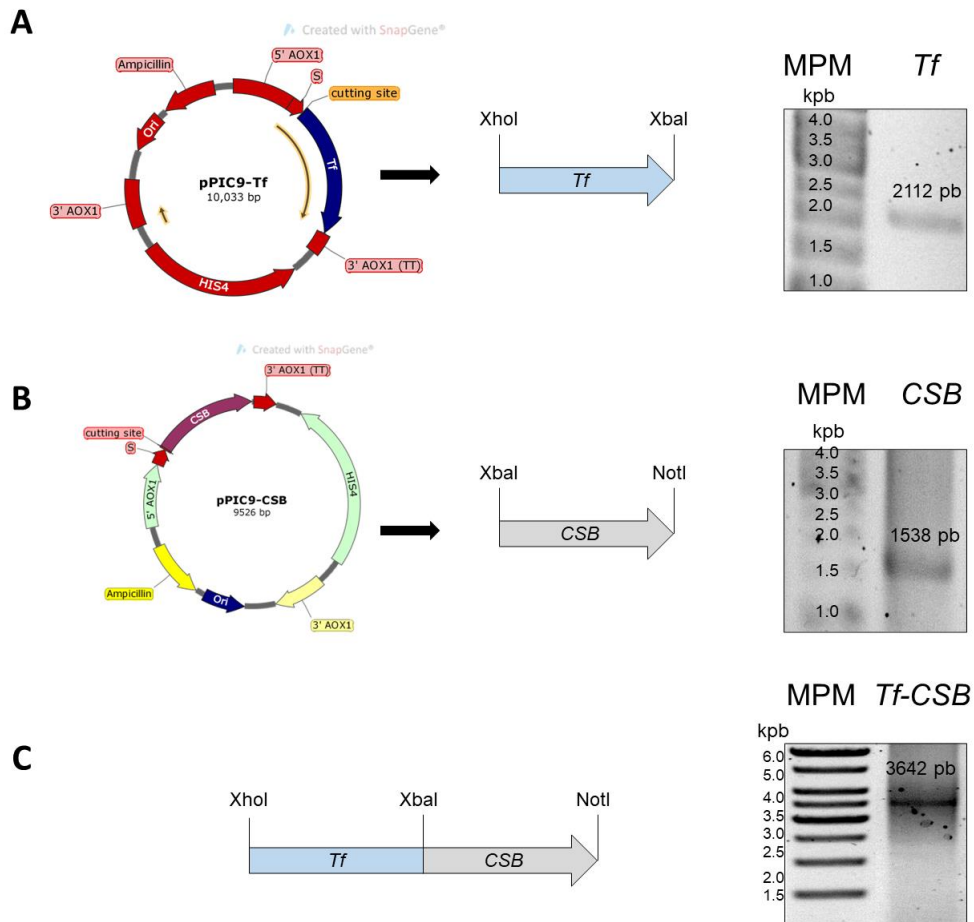


Figura 19. Productos de PCR para la fusión *Tf-CSB*. (A) Fragmento de *Tf*. (B) Fragmento de *CSB*. (C) Fragmento de la fusión *Tf-CSB*. MPM: Marcador de peso molecular.

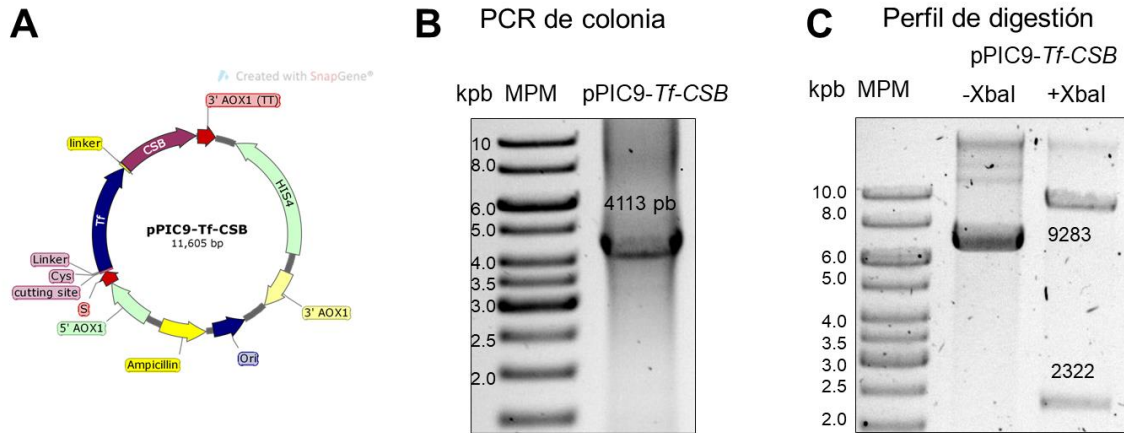


Figura 20. Análisis de PCR del plásmido pPIC9-Tf-CSB. (A) Mapa del plásmido pPIC9-Tf-CSB. (B) PCR de colonia de *E. coli* DH10β transformadas con el plásmido pPIC9-Tf-CSB, utilizando los cebadores del gen AOX. (C) Perfil de digestión del plásmido pPIC9-Tf-CSB purificado de *E. coli* y digerido con la enzima XbaI. MPM: marcador de pesos molecular.

La adición de *Au* a *CSB* se realizó directamente por PCR utilizando cebadores conteniendo la secuencia de *Au*. En la figura 21 se muestran los geles de los productos de PCR con estos cebadores que corresponden a 1595 y 1398 pb para *Au-CSB* y *Au-CB* respectivamente. Posteriormente, estos fragmentos fueron insertados en el plásmido pPIC9 bajo los sitios de restricción de XhoI y NotI y se clonaron en células de *E. coli* DH10β. En la figura 22 se muestra el análisis de los plásmidos purificados de *E. coli* mediante perfil de restricción con las enzimas XhoI y NotI. Se observan las bandas esperadas correspondientes a 1342 y 1582 pb para *Au-CB* y *Au-CSB* respectivamente.

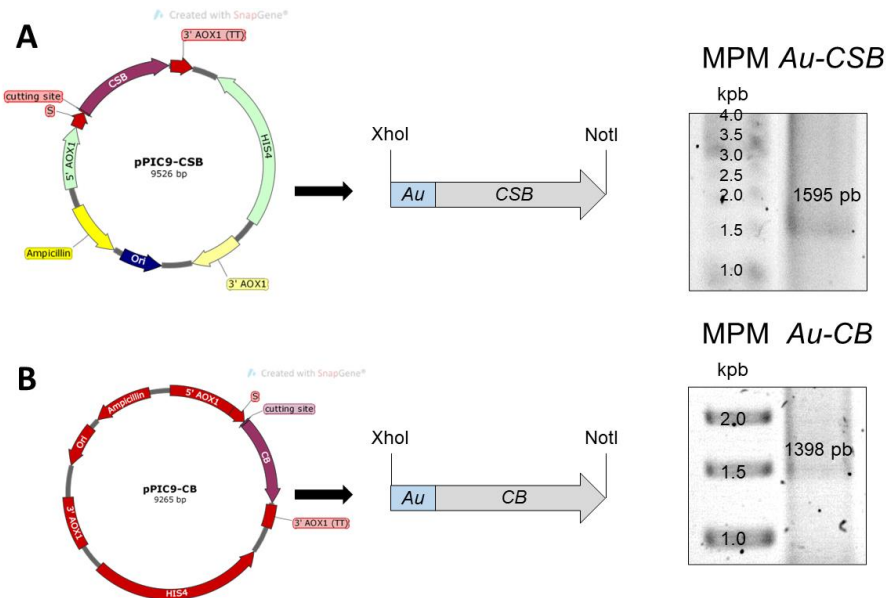


Figura 21. Productos de PCR con los cebadores para adicionar la secuencia del bloque *Au* a *CSB* y *CB*. MPM: Marcador de peso molecular.

Los plásmidos que dieron positivos para PCR de colonia y perfil de digestión se secuenciaron para corroborar la ausencia de mutaciones.

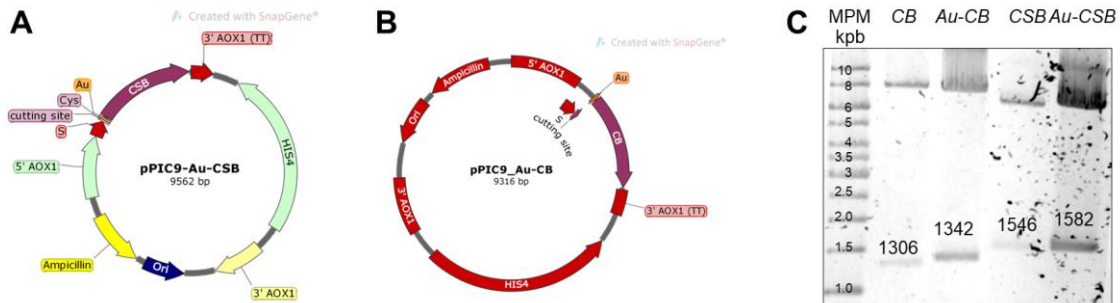


Figura 22. Perfil de digestión de plásmidos pPIC9-*Au-CSB* y pPIC9-*Au-CB* con las enzimas de restricción XhoI y NotI. (A) Mapa del plásmido pPIC9-*Au-CSB*. (B) Mapa del plásmido pPIC9-*Au-CB*. (C) Perfil de restricción de los plásmidos pPIC9-*CB*, pPIC9-*Au-CB*, pPIC9-*CSB* y pPIC9-*Au-CSB*. MPM: Marcador de peso molecular.

Una vez obtenidos los plásmidos de las variantes pPIC9-*Tf-CSB*, pPIC9-*Au-CSB* y pPIC9-*Au-CB*, se procedió a la transformación de la levadura *K. phaffii* con estos plásmidos mediante electroporación. Las colonias resultantes se analizaron mediante PCR de colonia. Se utilizaron dos pares de cebadores para el PCR de las colonias resultantes de la transformación con el plásmido pPIC9-*Tf-CSB*. El primer par de cebadores flanquea la región 3' de *Tf* y la secuencia completa de *CSB*, resultando en un fragmento de 1725 pb, tal y como se muestra en la figura 23.A. El segundo par de cebadores amplifica la secuencia completa de *Tf* generando una banda de 2112 pb, mostrado en la figura 23.B.

Para el análisis de PCR de las colonias resultantes de la transformación con los plásmidos pPIC9-*Au-CSB* y pPIC9-*Au-CB* se utilizó un par de cebadores que flanquea la secuencia de *Au* y el extremo 3' de *CSB*. En la figura 24 se muestra el gel donde se observan las bandas esperadas de 1560 y 1322 pb respectivamente. De esta manera se comprobó la obtención de las colonias de *K. phaffii* recombinantes para la producción de las proteínas Tf-CSB, Au-CSB y Au-CB.

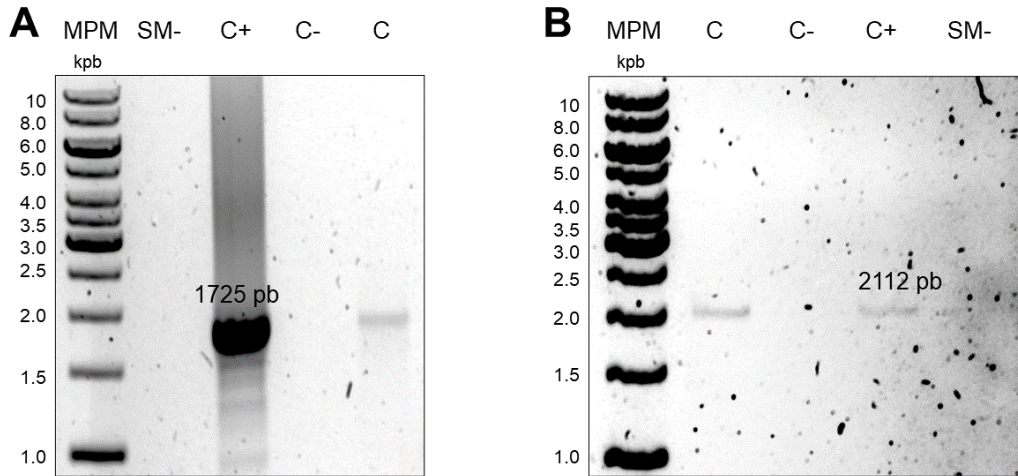


Figura 23. Análisis de las colonias de *K. phaffii* transformadas con el plásmido pPIC9-*Tf-CSB*. (A) PCR de colonia con cebadores que amplifican la región 3' de *Tf* y *CSB*. (B) PCR de colonia con cebadores que amplifican *Tf*. SM-: control de PCR sin templado, C-: control negativo de colonia de levadura sin transformar, C+: control positivo utilizando el plásmido pPIC9-*Tf-CSB* purificado de *E. coli*, C: colonia de levadura transformada. MPM: Marcador de peso molecular.

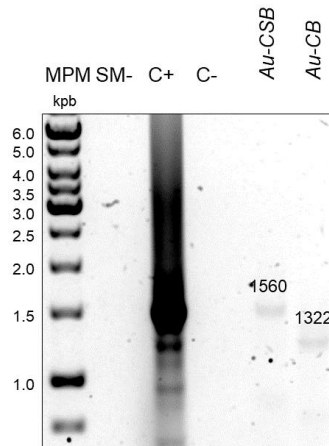


Figura 24. Análisis de colonias de *K. phaffii* transformadas con pPIC9-*Au-CSB* o pPIC9-*Au-CB*. SM-: Control de PCR sin templado, C+: control positivo utilizando el plásmido pPIC9-*Au-CSB*, C-: control negativo de colonia de levadura sin transformar. MPM: marcador de peso molecular.

8.8 Producción y purificación de proteínas modificadas

La producción de las proteínas modificadas se llevó a cabo utilizando el protocolo descrito para *CSB* y *CB*. En la figura 25 se muestran las cinéticas de crecimiento de *K. phaffii* durante la producción de cada una de las proteínas. En esta figura se observa que incluso cuando se indujo la producción de las proteínas con el bloque *Au*, el cual se ha reportado como un péptido antimicrobiano, no existen diferencias importantes en la cinética de crecimiento.

La purificación de las proteínas se realizó utilizando una metodología similar a la utilizada para CSB, únicamente cambiando los porcentajes de sulfato de amonio utilizados para precipitar las proteínas de acuerdo a lo descrito en la sección 7.5 de metodología. Siguiendo esta estrategia se obtuvieron rendimientos de 0.43 ± 0.11 , 0.26 ± 0.14 y 0.57 ± 0.08 mg/L para Tf-CSB, Au-CSB y Au-CB respectivamente. A pesar de que la cinéticas de crecimiento no difieren de manera importante con respecto a aquellas observadas para CSB o CB, los rendimientos de proteínas purificada son menores en un orden de magnitud.

Posteriormente se caracterizaron las proteínas mediante SDS-PAGE y WB. El peso molecular teórico de Tf-CSB es de 121 kDa. En el gel de SDS-PAGE de la figura 25 se muestra una banda correspondiente a este peso molecular en la muestra del carril del sobrenadante inducido con metanol. Tras purificar la proteína Tf-CSB y analizar la muestra mediante WB utilizando como anticuerpo primario, ya sea los sueros obtenidos tras la inmunización de ratones con las AVLPs, es decir para detectar CSB, o bien el anticuerpo D9, el cual reconoce al bloque Tf, se observó que esta banda es reconocida por ambos anticuerpos, por lo cual esta banda corresponde a la fusión Tf-CSB. Es importante mencionar que, con este análisis, se detectó también la presencia de bandas que corresponden a Tf y CSB independientes, lo cual indica que la fusión Tf-CSB es susceptible de proteólisis durante el proceso de producción/purificación, por lo cual es importante considerar la presencia de estos productos como contaminantes para futuros experimentos.

El análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas que contienen el bloque Au muestra bandas de peso molecular aparente superior a 100 kDa, lo cual no corresponde con el peso molecular teórico de 40.26 y 46.1 kDa para Au-CB y Au-CSB respectivamente. Lo anterior es similar al caso de CB y CSB, dado a que el bloque "C" corresponde un alto porcentaje en su composición y éste interacciona de manera deficiente con el SDS. La adición de Au a las proteínas añade alrededor de 1.5 kDa, lo cual sigue siendo despreciable para el efecto del bloque "C". En efecto, las proteínas Au-CB y Au-CSB migran de manera similar a sus contrapartes CB y CSB en geles de SDS-PAGE respectivamente (fig. 25.I y 25.J). Finalmente, el análisis mediante WB utilizando los sueros de los ratones inmunizados con las AVLPs confirmó la identidad de Au-CB y Au-CSB (fig. 25.K).

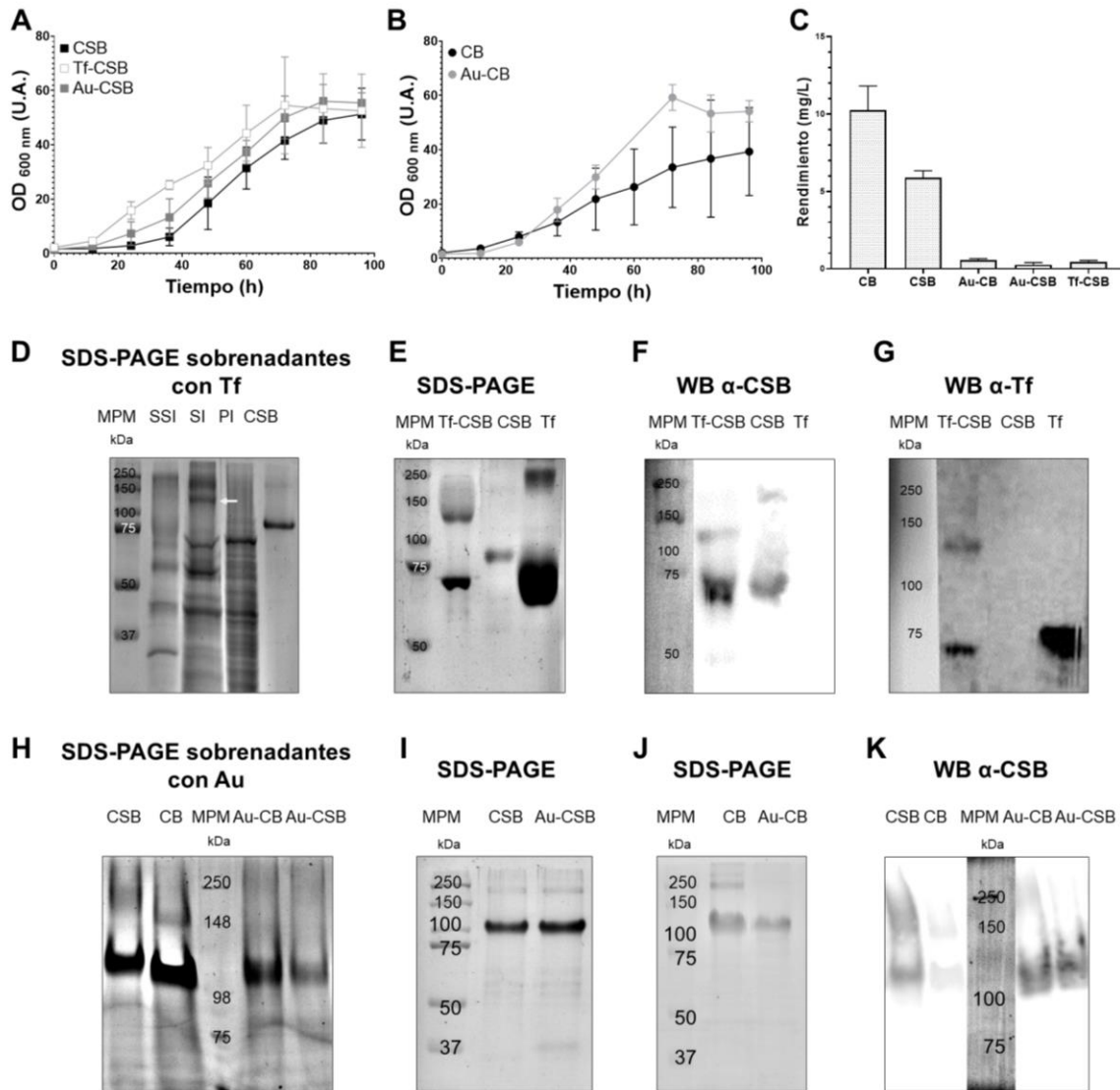


Figura 25. Producción y purificación de las proteínas recombinantes modificados. (A) Cinética de crecimiento de *K. phaffii* durante la producción de CSB, Tf-CSB y Au-CSB. (B) Cinética de crecimiento de *K. phaffii* durante la producción de CB y Au-CB. (C) Rendimiento de proteínas purificadas. (D) SDS-PAGE de sobrenadantes de *K. phaffii* durante la producción de Tf-CSB. SSI: Sobrenadante sin inducir, SI: Sobrenadante inducido, PI: botón celular después de inducir. (E) SDS-PAGE de Tf-CSB purificado. (F) WB de Tf-CSB purificado utilizando los sueros de los ratones inmunizados con AVLPs. (G) WB de Tf-CSB purificado utilizando el anticuerpo primario D9 α -Tf. (H) SDS-PAGE de sobrenadantes de la producción de Au-CSB y Au-CB. (I) y (J), SDS-PAGE de Au-CSB y Au-CB purificados respectivamente. (K) WB de Au-CB y Au-CSB con los sueros de los ratones inmunizados con AVLPs.

8.9 Formación de AVLPs con Tf-CSB

Se estudió la formación de AVLPs con la proteína Tf-CSB utilizando el plásmido pAcGFP1-N1 y un fragmento de dsDNA de 742 pb. En la figura 26.A se observa que a N/P de 0.5 y 1, la fracción de pDNA correspondiente al pDNA relajado, migró ligeramente más

abajo en el gel, además hay una disminución de la banda correspondiente al plásmido superenrollado y aparece una banda que coincide con la migración del plásmido linealizado. A valores de N/P altos se observa un barrido del plásmido característico de degradación del DNA. Cuando se utilizó dsDNA, también se observó un barrido a N/P de 5 y 10. Lo anterior sugiere que al mezclar Tf-CSB con DNA, el DNA se degrada de forma dosis dependiente. Este efecto no se observó cuando el dsDNA es incubado con concentraciones de transferrina que equivalen a concentraciones de Tf-CSB para obtener los distintos valores de N/P (figura 26.B). Tampoco se observó este efecto al mezclar el dsDNA con la proteína CSB y Tf a concentraciones equimolares que corresponden a concentraciones de CSB para las distintos N/P. Lo anterior sugiere que esto es un efecto específico de la mezcla con Tf-CSB.

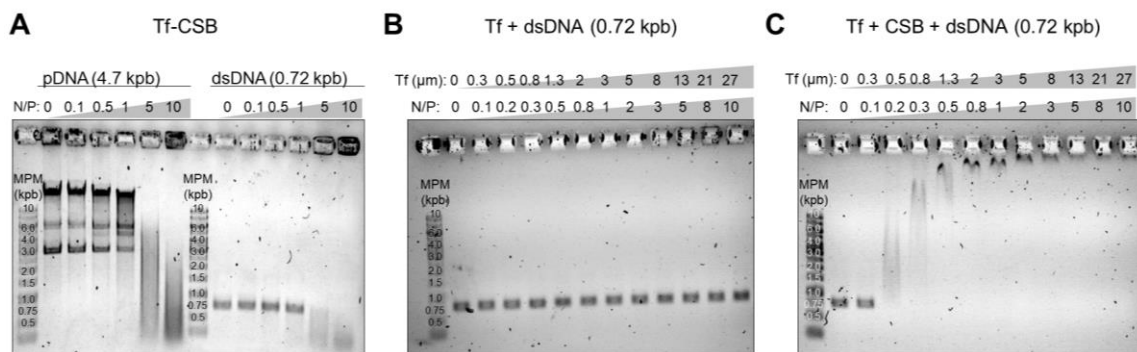


Figura 26. Efecto de la adición del módulo Tf a CSB sobre la formación de AVLPs. (A) EMSA del plásmido pAcGFP1-N1 (pDNA) o un fragmento de dsDNA cuando se mezcla con Tf-CSB a varios N/P. (B) EMSA de dsDNA cuando se mezcla con concentraciones crecientes de transferrina (Tf). Estas concentraciones molares son equivalentes a las de Tf-CSB para obtener cada determinada N/P. (C) EMSA de dsDNA cuando es incubado a distintas N/P de CSB en presencia de una concentración equimolar de CSB y Tf.

El barrido observado en la figura 26 es característico de degradación de DNA, sin embargo, considerando que el punto isoeléctrico de Tf experimental es aproximadamente 5.2-5.6 dependiendo de su estado de oxidación [159], existe la posibilidad de que a pH 7.4, la interacción entre Tf-CSB y DNA resulte en complejos con carga negativa. En este escenario, estos complejos deberían ser los suficientemente compactos para poder migrar más rápido en el gel. Para descartar por completo esta posibilidad, se realizaron pruebas de desensamble utilizando dos estrategias. La primera consistió en un desensamble mediado por heparina mediante la adición de 8.3 ng/μL de heparina e incubando a 37 °C por 1 h. La segunda consistió en someter a la mezcla a una extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) seguido de una precipitación con etanol para recuperar el DNA. En la figura 27.A se muestra que tras inducir el desensamble de los

posibles complejos entre Tf-CSB y pDNA, aparece el mismo patrón de barrido tanto a N/P de 1 y 5. En contraste, las muestras de los complejos desensamblados con heparina o fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) formados entre CSB y pDNA, muestran un patrón de bandeo igual al pDNA libre (fig. 27.B). Lo anterior confirma que al preparar AVLPs con Tf-CSB se degrada el DNA y esta degradación es dependiente de la concentración de Tf-CSB.

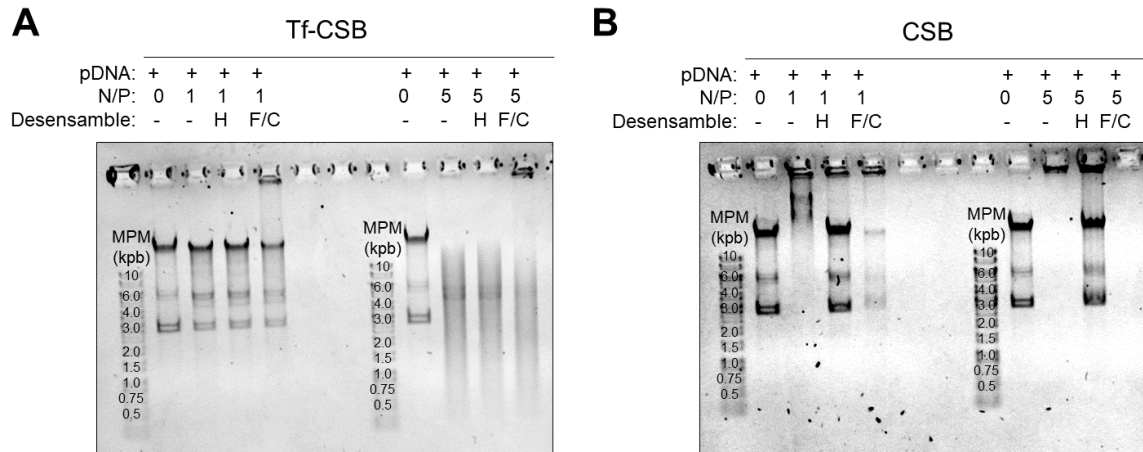


Figura 27. Ensayo de desensamble de complejos Tf-CSB con pDNA. (A) EMSA de desensamble de complejos formados por Tf-CSB y pDNA a N/P de 1 o 5 con heparina (H) o fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (F/C). (B) EMSA de desensamble de complejos formados por CSB y pDNA a N/P de 1 o 5 con heparina (H) o fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (F/C).

La degradación del DNA al formar AVLPs con Tf-CSB podría deberse a la presencia de nucleasas contaminando la muestra. Para poder descartar esta posibilidad se realizaron ensayos de formación de AVLPs en condiciones de desnaturalización de nucleasas. La formación de AVLPs se realizó en presencia de EDTA (10 mM) con o sin tratamiento de 65 °C durante 10 minutos. En la figura 28 se puede observar que aún en condiciones en las cuales se inactivarían las nucleasas presentes en la muestra, el DNA se sigue degradando. Lo anterior sugiere que el efecto de degradación no es el resultado de presencia de nucleasas en la muestras y pudiera ser un efecto específico de Tf-CSB.

Hasta el momento, no existen reportes previos de una posible actividad nucleasa atribuible a Tf o CSB. Sin embargo, existen reportes de otras proteínas de unión a hierro con actividad nucleasa. De particular interés es la proteína lactoferrina, la cual es miembro de la misma familia de proteínas de transporte de hierro con un alto grado de homología estructural con transferrina [160,161]. Se ha demostrado que lactoferrina es capaz de degradar distintos tipos de ácidos nucleicos como parte de su función como agente

antimicrobiano [161,162]. Este antecedente respalda la posibilidad de una actividad tipo nucleasa específica de Tf.

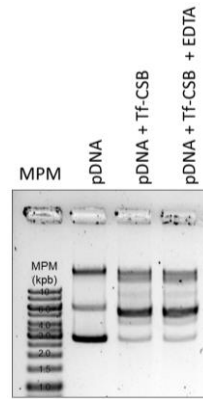


Figura 28. Formación de AVLPs con Tf-CSB en condiciones de desnaturalización de nucleasas (EDTA 10 mM y calentando las muestras a 65 °C por 10 min).

Dado que utilizar la proteína Tf-CSB muestra un efecto negativo sobre la integridad del DNA, se decidió evaluar si este efecto aún persiste cuando se forman AVLPs con combinaciones de Tf-CSB y CSB. Lo anterior con el objetivo de evaluar si al disminuir la proporción de Tf-CSB presente en las AVLPs pudiera eliminarse el efecto de degradación del DNA y obtener AVLPs decoradas con Tf. Para lo anterior, se evaluó el efecto de la adición del módulo Tf en la formación de AVLPs con distintas mezclas de Tf-CSB y CSB a una N/P total de 3. En el gel de EMSA de la figura 29.A se observa que al utilizar una baja proporción Tf-CSB (0.1 y 0.3), se obtiene un retraso en la movilidad electroforética del pDNA similar a cuando únicamente se utiliza CSB. Conforme aumenta la fracción de Tf-CSB empleada, comienza a aparecer un barrido en el pDNA similar al de la figura 27 y finalmente la aparición de bandas correspondientes a la degradación del pDNA. Posteriormente se caracterizó la morfología de las AVLPs formadas con mezclas de Tf-CSB y CSB y un fragmento de dsDNA de 1535 pb mediante AFM. Cuando se utilizó 1% de Tf-CSB se observa una morfología igual a la de partículas formadas únicamente con CSB (figura 29.B). Al aumentar el porcentaje de Tf-CSB a 5 %, se observan AVLPs con una morfología similar pero menos compactadas, mientras que al 10 % de Tf-CSB se pierde la morfología tipo rodillo y se observan complejos con morfología menos rígida y de tamaños variables. Cuando se usó 30% de Tf-CSB, se observan complejos de DNA-proteína con una amplia variación en su longitud que corresponden posiblemente a fragmentos de DNA degradado.

Los resultados de AFM demuestran que la adición del bloque Tf interfiere de alguna manera con la formación y compactación de las AVLPs. Por tal razón no se obtienen AVLPs con la morfología de rodillo esperada. Lo anterior posiblemente se deba a que el bloque Tf es de aproximadamente 80 kDa, lo cual representa dos veces el peso molecular de la proteína CSB y por tal, podría estar interfiriendo estéricamente en la formación de las AVLPs. Esto resulta en otra posible razón de la degradación de DNA por Tf-CSB, donde Tf-CSB pudiera estar ejerciendo una fuerza de tensión sobre el DNA al momento del ensamble que resulta en la fractura del DNA.

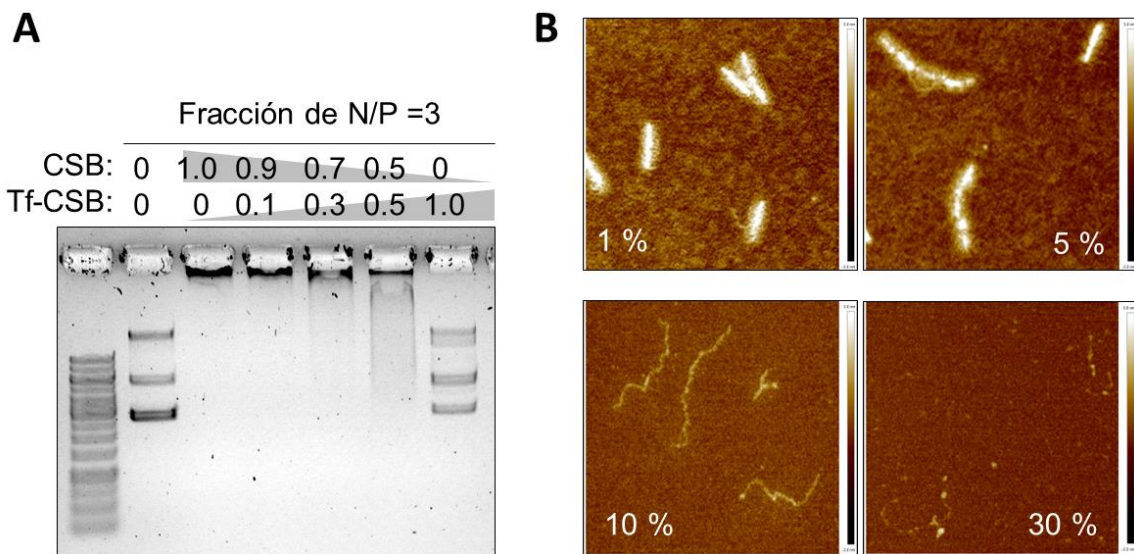


Figura 29. Formación de AVLPs con mezclas de Tf-CSB y CSB. (A) EMSA de formación de AVLPs con mezclas de Tf-CSB, CSB y plasmido utilizando una N/P total = 3. (B) Micrografías de AFM de AVLPs formadas con un fragmento de dsDNA de 1535 pb y mezclas de Tf-CSB y CSB. Cada micrografía muestra el porcentaje de Tf-CSB empleado para una N/P total = 10. Las imágenes corresponden a un área de 1 μm x 1 μm .

Dado que nuestro principal interés es obtener AVLPs decoradas con el bloque Tf y a que al utilizar fracciones pequeñas de Tf-CSB se puede obtener AVLPs bien definidas, se decidió corroborar si efectivamente en estas condiciones hay Tf presente en las AVLPs. Para ello se utilizó un ensayo de inmunodetección acoplado a AFM [163]. Se prepararon AVLPs con el fragmento de dsDNA de 1535 pb y 1 % de Tf-CSB + 99 % de CSB para una N/P total = 10. Se preparó la muestra de acuerdo con el protocolo descrito en métodos con la adición de un paso final de incubación con 10 μL de anticuerpo D9 a 0.02 $\mu\text{g/mL}$ por 10 min. En la figura 30 se muestra la presencia de partículas pequeñas que corresponden al anticuerpo en contacto con las AVLPs (flechas amarillas). Como control negativo se utilizó una muestra de AVLPs preparadas en ausencia de Tf-CSB, es decir AVLPs formadas únicamente con CSB y expuestas al anticuerpo D9 o bien, partículas que contienen 1 % de

Tf-CSB + 99 % de CSB, pero utilizando un anticuerpo control (α -cas9) que no tiene especificidad contra Tf o CSB. En los controles también se observó la presencia de anticuerpo en algunas ocasiones en contacto con las AVLPs. Dado que esta metodología no distingue de manera directa entre una interacción específica entre anticuerpo-antígeno y la simple adsorción de anticuerpos sobre la mica al azar, se cuantificó y analizó la frecuencia y probabilidad de cada uno de estos eventos según el protocolo descrito por Cervantes en 2013 [164].

En el gráfico de la figura 30 se muestra la distribución del número de anticuerpos D9 en contacto con las AVLPs en función de la longitud de la partícula. Se observa como claramente la mayoría de las AVLPs preparadas con Tf-CSB están en contacto con alrededor de 2-4 moléculas de anticuerpo por partícula, mientras que la mayor parte de las AVLPs preparadas únicamente con la proteína CSB no está en contacto con anticuerpos, con algunas excepciones que contactan con 1, 2 o hasta 3 anticuerpos. Cuando se analizó el control utilizando un anticuerpo inespecífico de transferrina, se observó que la mayoría de las AVLPs están en contacto con 0-2 moléculas de anticuerpo. Posteriormente se realizó un análisis estadístico para determinar la significancia de estos datos.

Para determinar la significancia estadística de diferenciar entre eventos al azar de adsorción de anticuerpos contra la detección específica de transferrina se calcularon y compararon la probabilidad de azar (P_A) contra la probabilidad experimental (P_E). P_A se define como el área de las AVLPs entre el área total de observación, mientras que P_E se calcula como el número de moléculas de anticuerpo en contacto con las AVLPs dividido entre el número total de anticuerpos en el área de observación. Posteriormente se realizó una prueba T de Student de muestras apareadas para obtener un valor de p . Los valores obtenidos para P_A , P_E y p se resumen en la tabla 3. En la tabla se observa que los valores p para los controles fueron de 0.14 y 0.082 mientras que para la detección específica de Tf en las AVLPs fue de 0.013. Lo anterior indica que, a diferencia de los controles, la detección específica de Tf en las AVLPs si es estadísticamente significativa. Estos resultados

sugieren que las AVLPs formadas con mezcla de 1 % de Tf-CSB y 99% de CSB, contienen Tf desplegada en su exterior.

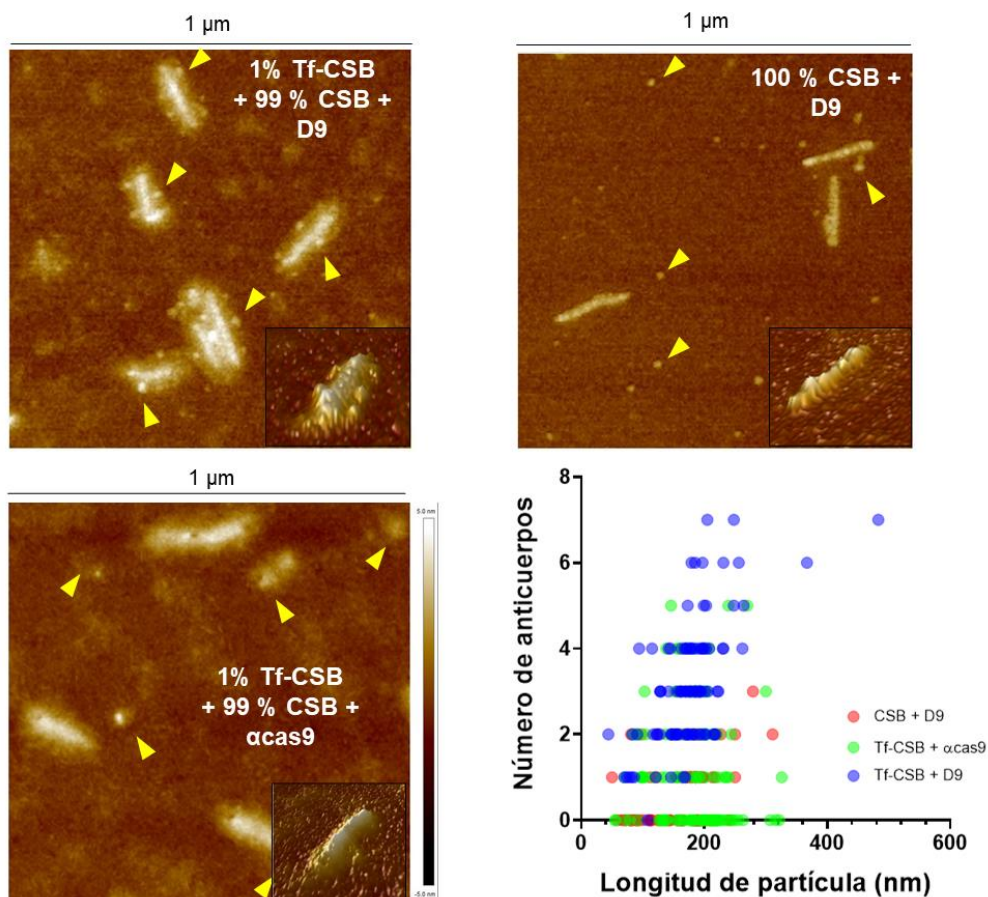


Figura 30. Inmuno detección de transferrina en las AVLPs mediante AFM. (A) Micrografía de AFM de AVLPs preparadas con un dsDNA (1535 pb) y CSB a una N/P = 10 incubadas con el anticuerpo D9 para la detección de transferrina. (B) Micrografía de AFM de AVLPs, preparadas con un dsDNA (1535 pb) y una mezcla de Tf-CSB (1 %) y CSB (99 %) a una N/P total = 10, con un anticuerpo α cas9 como control. (C) Micrografía de AFM de AVLPs, preparadas con un dsDNA (1535 pb) y una mezcla de las proteínas Tf-CSB (1 %) y CSB (99 %) a una N/P total = 10, con el anticuerpo D9. (D) Distribución de número de anticuerpos en contacto con las AVLPs en función de la longitud de cada partícula.

Tabla 3. Análisis estadístico de la detección de transferrina en las AVLPs mediante AFM.

Parámetro	CSB + D9	TfCSB+ α cas	TfCSB + D9
P_A	0.017	0.018	0.023
P_E	0.041	0.037	0.244
ρ	0.140	0.082	0.013

8.10 Formación de AVLPs con Tf mediante conjugación química

Dado que la fusión recombinante Tf-CSB únicamente permitió formar AVLPs con un limitado número de proteínas desplegando Tf, lo cual posiblemente pudiera limitar su entrada a las células, y que los rendimientos de producción y purificación de la proteína son bajos, se decidió usar una estrategia alternativa para poder desplegar Tf en las AVLPs. En esta segunda estrategia se planteó el uso del agente entrecruzante Sulfo-SMCC para conjugar CSB y Tf. El uso de Sulfo-SMCC permite la unión covalente entre la única cisteína localizada en el extremo N-terminal de CSB con los grupos amino de las lisinas expuestas al solvente de Tf mediante una reacción con un grupo maleimida. En la figura 31.A se muestra el esquema del flujo de trabajo para realizar dicha conjugación. Primero se formaron las partículas entre CSB y DNA y posteriormente se añadió Tf que fue previamente activada con Sulfo-SMCC para así, funcionalizar las AVLPs con Tf. Se realizaron pruebas con distintas relaciones molares de cada uno de los reactantes y distintas temperaturas de incubación de la reacción de conjugación para encontrar las mejores condiciones de funcionalización. En la tabla de la figura 31.C se muestran las distintas relaciones molares utilizadas durante esta exploración. La conjugación entre CSB y Tf se monitoreó mediante SDS-PAGE, en donde se observó la aparición de una banda entre 100 y 150 kDa que corresponde a la fusión Tf-CSB.

De acuerdo a la figura 31.D, las mejores condiciones para realizar la conjugación fueron utilizando relaciones molares de 1x Tf : 20x Sulfo-SMCC : 1x CSB, y una incubación de la reacción a 4 °C. Sin embargo, aún en esta condición se puede observar que existe un gran exceso de proteínas Tf y CSB sin conjugar.

Posteriormente se analizaron las AVLPs después de la conjugación con Tf mediante AFM en donde se observa que las partículas conservaron su morfología tipo rodillo. También se puede observar la presencia de proteína sin conjugar observada como pequeñas partículas en el fondo de la muestra (fig. 32).

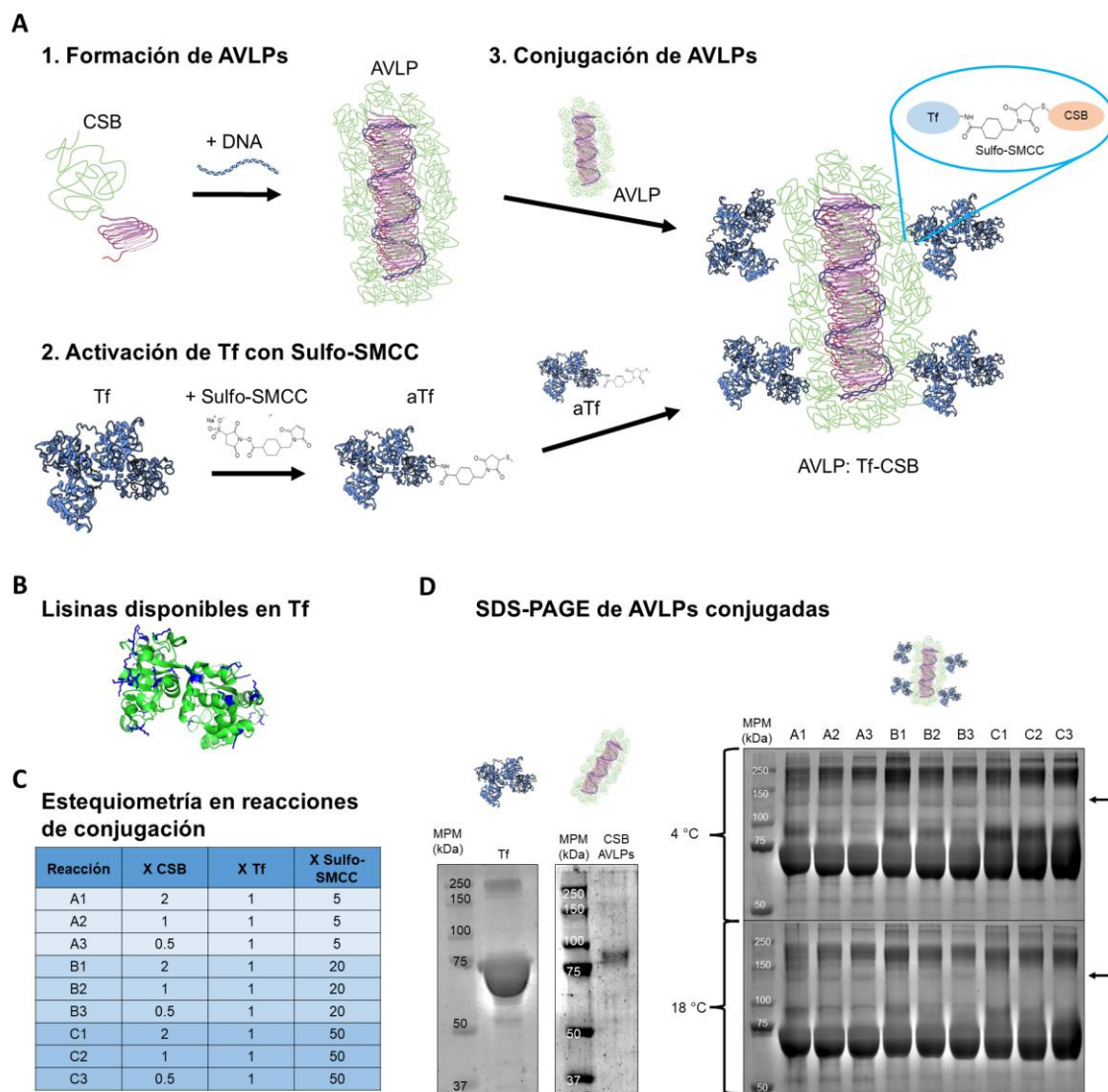


Figura 31. Conjugación química de AVLPs de CSB con Tf. (A) Esquema de conjugación de Tf a AVLPs. 1. Formación de AVLPs de CSB y DNA. 2. Activación de Tf con Sulfo-SMCC, el cual reacciona con las aminas libres de Tf. aTf: Tf activada. 3. Conjugación de AVLPs con aTf. Sulfo-SMCC reacciona con la cisteína en el extremo N-terminal de CSB. (B) Estructura de Tf resaltando en azul los residuos de lisina disponibles para la conjugación con CSB. (C) Tabla de relaciones molares de CSB, Tf y Sulfo-SMCC probadas para la conjugación. (D) Análisis de conjugación mediante SDS-PAGE. Los gels de la izquierda corresponden a los controles de Tf y AVLPs de CSB antes de conjugar. En los gels de la derecha se muestran las muestras de cada reacción de acuerdo a la tabla en (C) después de la conjugación. Las flechas negras indican la posición en el gel del monómero de Tf-CSB.

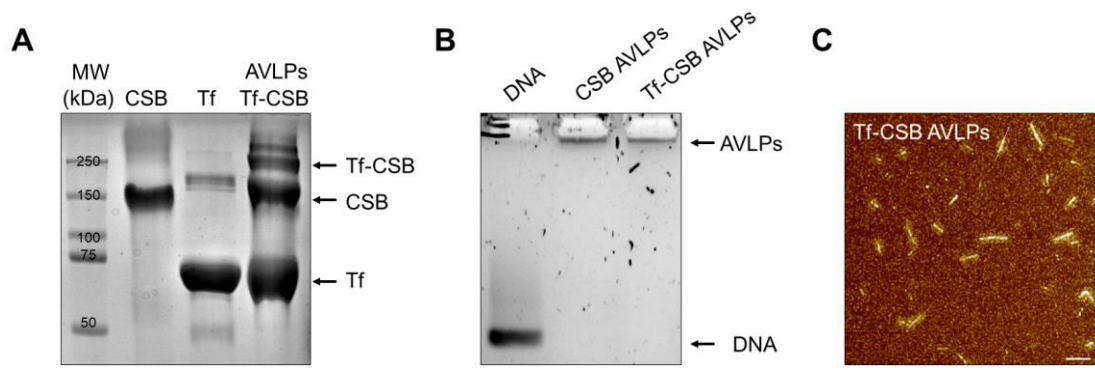


Figura 32. AVLPs conjugadas con Tf. Se conjugaron AVLPs de CSB formadas con un dsDNA de 742 pb. (A) Gel de SDS-PAGE de CSB, Tf y Tf-CSB AVLPs. (B) EMSA de AVLPs de CSB antes y después de conjugarse con Tf. (C) Microscopía de AFM de Tf-CSB AVLPs. Barra de escala es 200 nm.

8.11 Estudio preliminar de la entrega de ácidos nucleicos con Tf-CSB

Hasta el momento se cuenta con dos estrategias distintas para formar AVLPs que desplieguen Tf en su exterior; fusión recombinante y conjugación química. La formación de AVLPs con la fusión recombinante Tf-CSB no fue eficiente y solamente fue posible formar AVLPs utilizando mezclas de 1-5 % Tf-CSB con 99-95 % de CSB. Además, los rendimientos de producción/purificación de Tf-CSB recombinante son bajos. Por otro lado, con la conjugación química, tampoco se logró obtener AVLPs compuestas 100 % por CSB conjugada con Tf y no es posible controlar por completo los sitios de Tf donde se une a CSB. Por ello, se decidió realizar un experimento preliminar para determinar cuál estrategia permite una mayor eficiencia de entrada a células comparando las AVLPs de Tf-CSB recombinante o conjugada químicamente formadas por las condiciones previamente establecidas.

En la figura 33 se muestra que las AVLPs de Tf-CSB conjugada entran a las células más eficientemente que las AVLPs de Tf-CSB formadas con la fusión recombinante. Esta diferencia es de más de un orden de magnitud. Lo anterior puede deberse a la posible pérdida de la estructura y función de Tf en la fusión recombinante durante el proceso de purificación o ensamblaje de las AVLPs, o simplemente porque la conjugación química permite un mayor número de moléculas de Tf desplegadas por AVLP. Dado que la conjugación química de Tf-CSB, resultó en una mayor eficiencia de transfección, los experimentos siguientes se realizaron únicamente con Tf-CSB derivada de la estrategia de conjugación química.

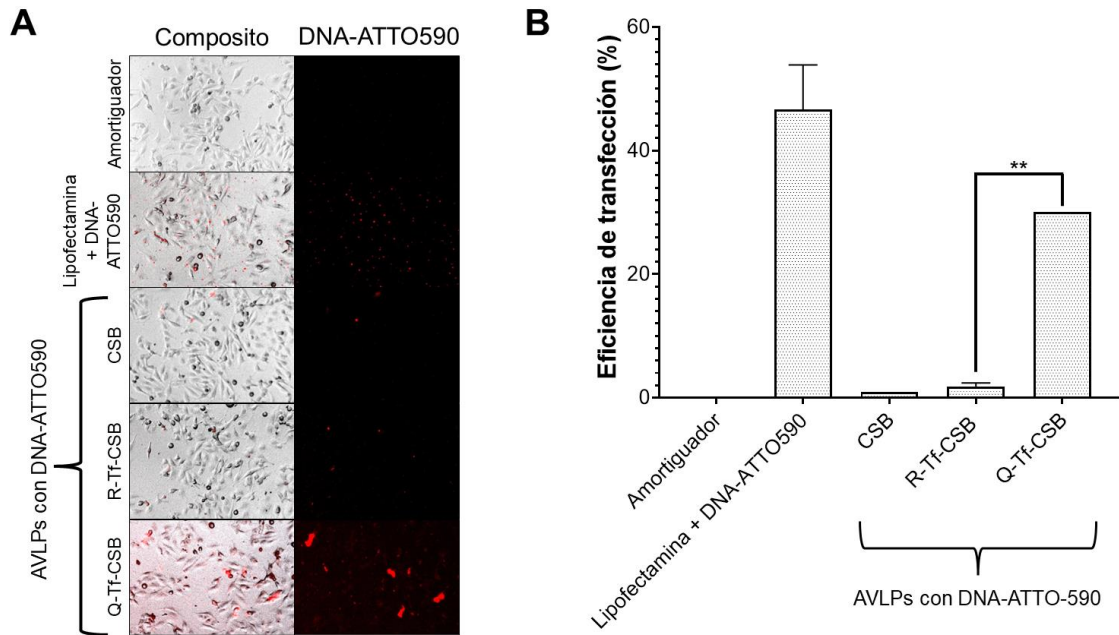


Figura 33. Comparación de eficiencia de transfección de AVLPs de Tf-CSB formadas con la fusión recombinante (R-Tf-CSB) o mediante conjugación química (Q-Tf-CSB). (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de células U251 transfectadas con AVLPs formadas con un dsDNA conjugado con ATTO590. (B) Eficiencia de transfección de las AVLPs expresada como el porcentaje de células con marca fluorescente con respecto al número de células totales.

8.12 Formación de AVLPs con Au-CSB y Au-CB

Posteriormente se estudió la formación de AVLPs utilizando Au-CSB y Au-CB mediante EMSA y AFM. En la figura 34 se muestra que después de la adición del bloque Au, ambas proteínas Au-CSB y Au-CB pueden neutralizar al dsDNA de manera similar a sus contrapartes CSB y CB. Sin embargo, en la gráfica de la fracción de DNA libre en función de la N/P, se puede observar que a los mismos valores de N/P, las versiones con Au neutralizan en menor medida al DNA. El análisis de la morfología de las AVLPs formadas a N/P = 5 demostró que éstas conservan su morfología tipo rodillo, de manera similar a las versiones sin Au.

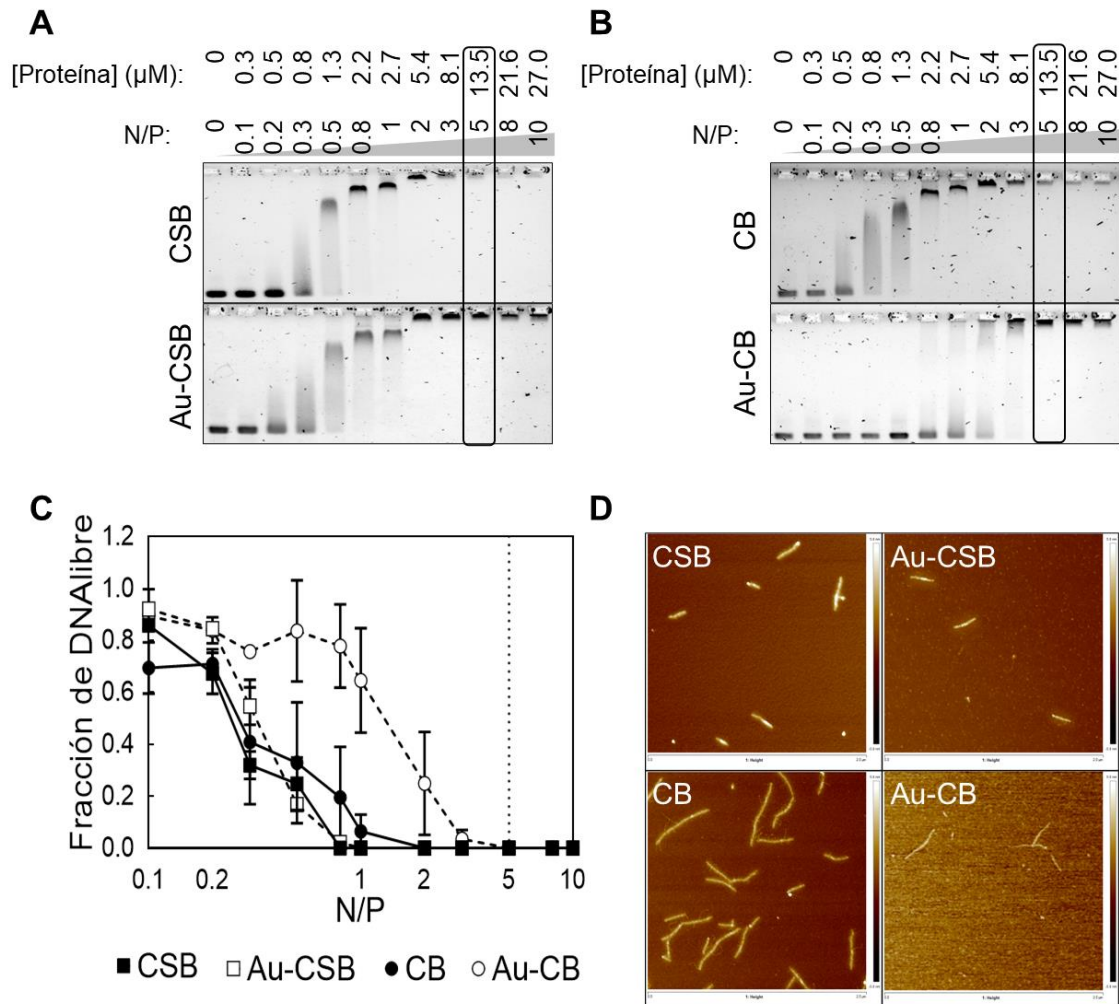


Figura 34. Formación de AVLPs con Au-CSB y Au-CB. Se formaron AVLPs con un dsDNA de 742 pb. (A) EMSA de la formación de complejos entre CSB o Au-CSB y dsDNA en función de la N/P. (B) EMSA de la formación de complejos entre CB o Au-CB y dsDNA en función de la N/P. (C) Gráfico de la fracción de DNA libre en función de la N/P. (D) Micrografías de AFM de AVLPs formadas con CSB, Au-CSB, CB y Au-CB respectivamente. Las imágenes son de $1 \times 1 \mu\text{m}$.

8.13 Caracterización morfológica de las AVLPs

Hasta este punto del proyecto se determinó que es posible obtener AVLPs con el bloque Tf mediante la conjugación de Tf con AVLPs de CSB, y AVLPs que desplieguen el bloque Au mediante la modificación recombinante de las proteínas. Posteriormente, se decidió evaluar los efectos de estas modificaciones sobre la morfología de las partículas mediante AFM y TEM. En la figura 35.A se muestran micrografías representativas de cada una de las distintas AVLPs. La figura 35.B muestra los perfiles de altura contra distancia de partículas

representativas de cada una de las distintas AVLPs. Estos perfiles corresponden a las partículas encerradas en óvalos amarillos de la figura 35.A. En esta figura se puede apreciar partícula contra partícula, los cambios en longitud y altura de cada una de las AVLPs. También se observa que la altura es irregular a lo largo de la partícula. En los gráficos de las figuras 35.C y D se muestran las distribuciones de longitud y altura máxima de partícula para cada una de las preparaciones de AVLPs. Se puede observar que en general, las AVLPs de CB y Au-CB son más largas y presentan una altura menor en comparación con las AVLPs de CSB, Au-CSB y Tf-CSB. Esto está relacionado con la capacidad de compactación que otorga el bloque "S". En estudios anteriores, utilizando DNA mayor a 1 kpb, se ha observado que el bloque "S" induce la compactación del ácido nucleico molde al formar las AVLPs hasta un factor de 1/3 con respecto a su longitud de persistencia [79]. En este caso, las AVLPs presentaron una longitud promedio de 136, 168 y 133 nm para CSB, Au-CSB y Tf-CSB respectivamente. Considerando una longitud de contorno del dsDNA de 245 nm, la formación de AVLPs resultó en un factor de compactación de 1.8, 1.45 y 1.84 para CSB, Au-CSB y Tf-CSB respectivamente. Este grado de menor compactación ya se ha observado en otros estudios donde se han formado AVLPs utilizando ácidos nucleicos de tamaño corto como siRNA [9]. Finalmente, en la figura 35.E se muestran micrografías de TEM de cada una de las partículas donde se aprecia a mejor detalle la morfología tipo rodillo en cada una de ellas. Además, con esta metodología fue posible observar a las moléculas de Tf decorando las partículas en la muestra correspondiente a Tf-CSB.

8.14 Evaluación de la estabilidad de AVLPs

Posteriormente se caracterizó la estabilidad de las AVLPs en ensayos de competencia con el polianión heparina y en incubación a 37 °C en medio de cultivo Opti-MEM. En la figura 36 se muestra el gel de EMSA de AVLPs formadas a una N/P de 5 e incubadas a distintas concentraciones de heparina. Tanto en el gel (figura 36.A) como en el gráfico de la fracción de DNA libre (figura 36.B) se observa que las AVLPs formadas por Au-CSB comenzaron a desensamblarse a la concentración menor de heparina de 1.6 ng/μL, posteriormente Tf-CSB y CSB se comenzaron a desensamblar a 2.5 ng/μL de heparina. Además, Au-CSB se desensambló completamente a 2.5 ng/μL, después CSB a 4.2 ng/μL y finalmente Tf-CSB no se desensambló incluso a 8 ng/μL. La tendencia fue similar para las proteínas derivadas de CB. Au-CB se desensambló a 1.6 ng/μL mientras

que CB a 3.3 ng/μL. Estos resultados sugieren que la adición de Au pudiera tener un efecto negativo sobre la estabilidad de las AVLPs ante heparina.

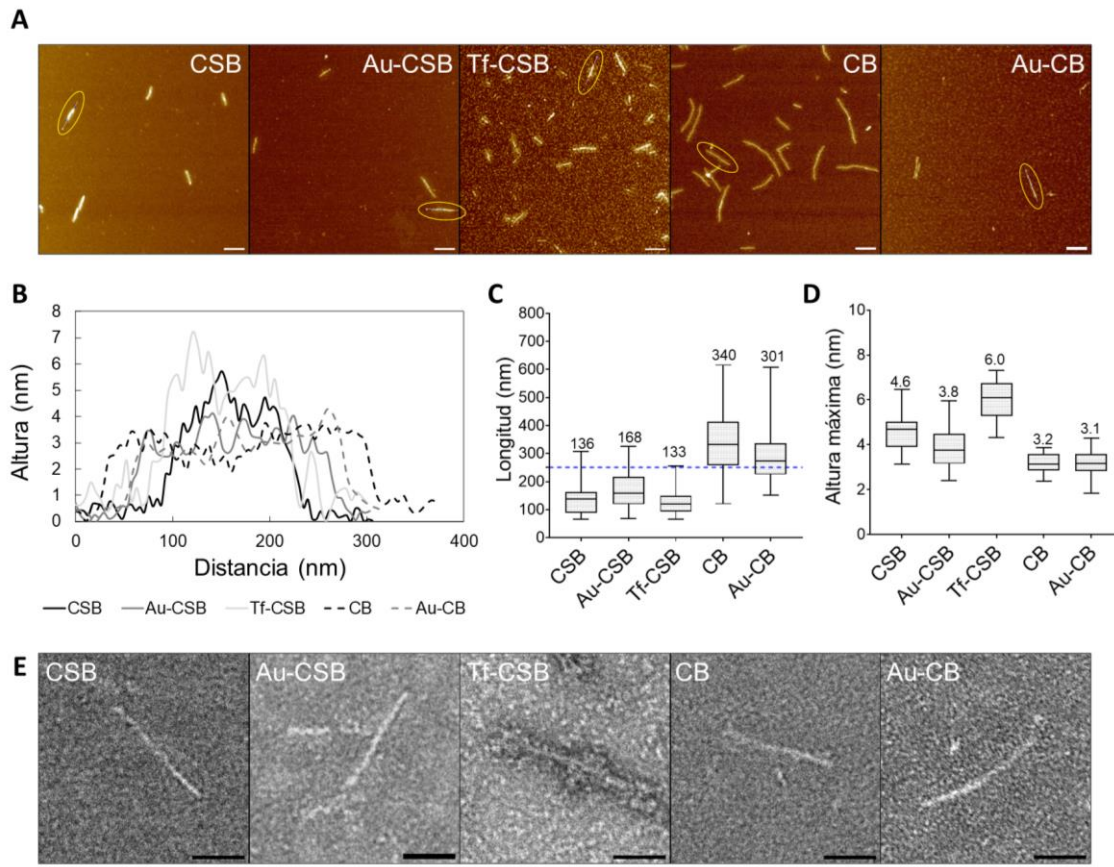


Figura 35. Caracterización morfológica de las AVLPs. (A) Micrografías de AFM de las distintas AVLPs. La barra de escala corresponde a 200 nm. (B) Perfiles de altura de partículas representativas de cada tipo de AVLPs. Los perfiles corresponden a las partículas encerradas en óvalos amarillos en (A). (C) Distribución de longitud de AVLPs medidas mediante AFM. La línea azul punteada corresponde a la longitud de persistencia del DNA molde. (D) Distribución de altura máxima de las AVLPs medida mediante AFM. (E) Micrografías de TEM de AVLPs. La barra de escala corresponde a 50 nm.

La disminución en la estabilidad de las AVLPs con Au podría estar relacionada con que, en ciertas condiciones, Au puede interactuar preferentemente con polisacáridos, particularmente cuando Au está formando dímeros [119,165]. Por otra parte, la mayor estabilidad observada en las AVLPs de Tf-CSB podría deberse a la posibilidad de que, durante el proceso de conjugación, se pudieran haber formados múltiples entrecruzamientos entre péptidos adyacentes. Esto concuerda con la figura 31 en donde se observaron bandas de alto peso molecular que podrían corresponder a multímeros de las fusiones Tf-CSB. Como era esperado, las proteínas derivadas de CSB fueron en general más estables que aquellas derivadas de CB. Lo anterior debido a la capacidad de

interacción entre proteína-proteína que brinda el bloque "S". Al considerar el contexto biológico, todas las AVLPs se desensamblaron a concentraciones mayores a las reportadas para los niveles endógenos de heparina (1.77 ng/μL). En resumen, estos resultados demuestran que las partículas pueden ser metaestables, lo que significa que pueden mantenerse ensambladas a concentraciones bajas de heparina, pero se desensamblan y liberan el DNA en altas concentraciones de la misma.

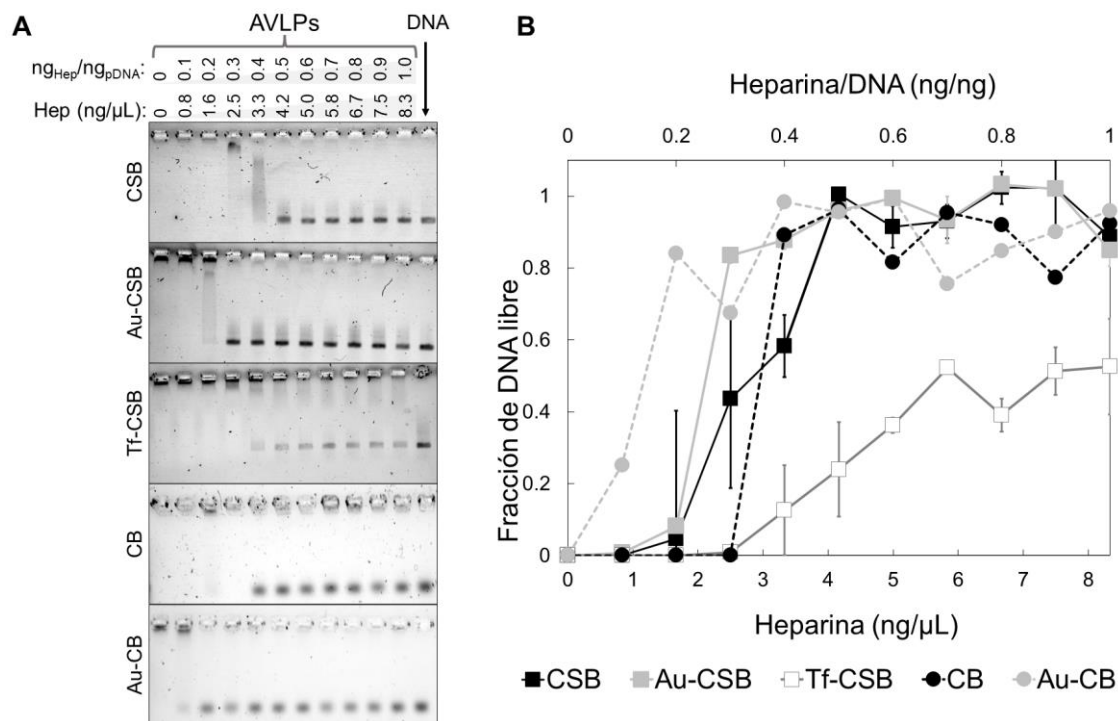


Figura 36. Ensayo de estabilidad de AVLPs en presencia de heparina. (A) EMSA de AVLPs incubadas en concentraciones crecientes de heparina. (B) Gráfico de la fracción de DNA liberado de las AVLPs en función de la concentración de heparina. HEP: heparina.

Posteriormente se realizó un ensayo de estabilidad en medio de cultivo Opti-MEM por 24 h, el cual es el medio de cultivo más usado para estudios de transfección *in vitro*. En la figura 37 no se observó un desensamble notorio de las AVLPs a lo largo del tiempo. Al inducir la liberación del DNA de las AVLPs incubadas por 24 h en medio de cultivo mediante la adición de heparina, se puede observar que el DNA liberado conserva su integridad. Este resultado sugiere que las AVLPs protegen el DNA cuando son incubadas en medio Opti-MEM y además son capaces de liberarlos de forma íntegra.

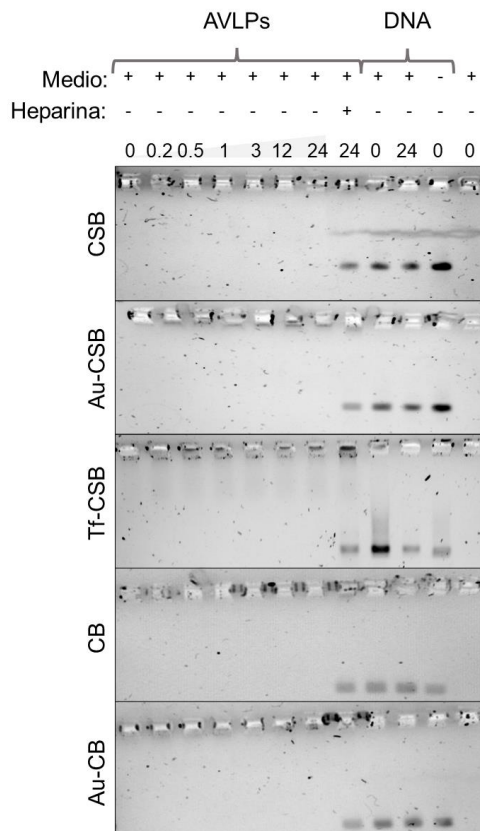


Figura 37. Ensayo de estabilidad de AVLPs en medio Opti-MEM. Geles de EMSA de AVLPs incubadas en medio de cultivo a lo largo del tiempo. Se adicionó un control de liberación añadiendo heparina a las AVLPs incubadas en medio de cultivo después de 24 h.

8.15 Entrega de ácidos nucleicos a células con las AVLPs

En la siguiente etapa del proyecto, se evaluó la capacidad de las AVLPs para entrar a células y el efecto de las adiciones de los bloque Au y Tf sobre estas. Entre las AVLPs probadas se incluyeron AVLPs formadas por 50 % Au-CSB y 50 % CSB (50 % Au-CSB), así como AVLPs formadas por 50 % Au-CSB y 50 % CSB que fueron conjugadas posteriormente con Tf (Tf-Au-CSB) siguiendo la misma metodología que para Tf-CSB.

La eficiencia de entrada a células se evaluó utilizando la línea celular U251, la cual es una línea derivada de glioblastoma que sobre expresa el receptor de transferrina. En la figura 38.A se muestran imágenes de fluorescencia de células transfectadas con las AVLPs después de 24 h. La figura 38.B muestra la eficiencia de transfección de las AVLPs a 1, 4 y 24 h postransfección. Se observa que, en todos los casos, la adición de Au o Tf aumentó la eficiencia de transfección de las AVLPs. Las AVLPs de Au-CSB presentaron un pico máximo de entrada a las 4 h (45 %), el cual es 7.5 veces más alto que el observado para

CSB en este punto (6 %). En el caso de Tf-CSB, el porcentaje de células con AVLPs aumentó a lo largo del tiempo siendo 6 (35 %) y 4 (50 %) veces más que CSB a 4 (6 %) y 24 h (12 %) respectivamente. Adicionalmente, las AVLPs de Tf-Au-CSB mostraron la mayor eficiencia de transfección desde 1 h postransfección, siendo ésta 8 veces (43 %) la entrada de CSB en este punto. Después, la eficiencia de entrada aumentó hasta 68 %, la cuál es significativamente mayor que aquella observada para las AVLPs de Au-CSB y Tf-CSB individualmente.

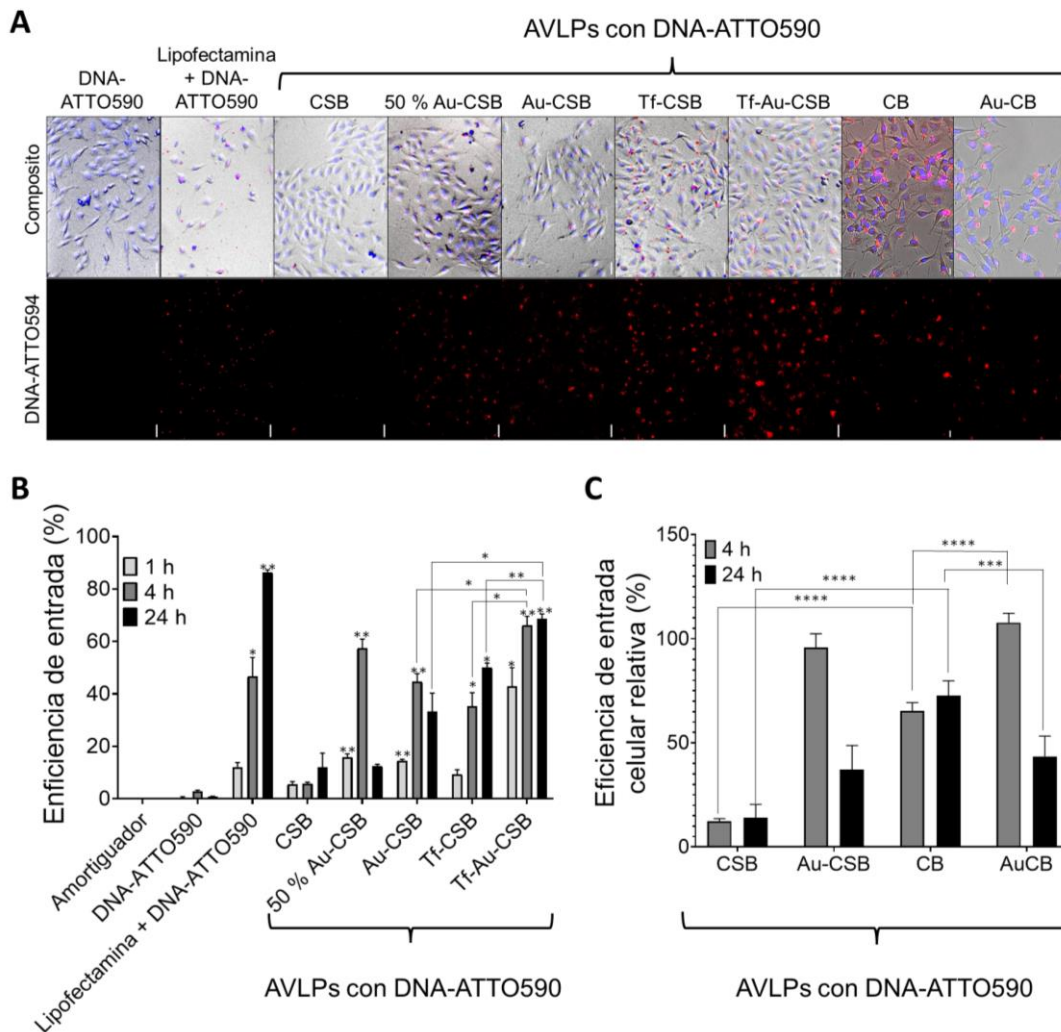


Figura 38. Entrada de AVLPs a células U251. (A) Imágenes de fluorescencia de células U251 24 h postransfección con las distintas AVLPs. La barra de escala corresponde a 50 μ m. (B) Gráfico de eficiencia de entrada de las AVLPs a células a través del tiempo. La eficiencia de entrada representa el porcentaje de células con marca fluorescente con respecto al número de células totales. Los asteriscos sobre las barras indican el nivel de significancia estadística de las diferencias comparado contra las AVLPs de CSB para cada tiempo. Los asteriscos sobre líneas que unen dos grupos indican el nivel de significancia estadística de la diferencia entre estos grupos. (C) Comparación de eficiencia relativa de entrada de CSB, Au-CSB, CB y Au-CB. La eficiencia de entrada relativa se muestra como el porcentaje con respecto al control positivo de lipofectamina utilizado en cada experimento. Los asteriscos indican el nivel de significancia estadística de las diferencias entre dos grupos. *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$.

Posteriormente se comparó la eficiencia de transfección contra AVLPs de CB y Au-CB. Se observó que CB tiene una mayor eficiencia de entrada que CSB. Esto sugiere que la adición del bloque “S” tiene un efecto negativo sobre la capacidad de entrada de las células, sin embargo, la adición del bloque “S” confiere una mayor estabilidad a las partículas, lo cual es de suma importancia para aplicaciones *in vivo*. De manera similar a Au-CSB, las AVLPs de Au-CB presentaron una eficiencia de entrada mayor que CB. Además, no se observaron diferencias significativas al comparar Au-CSB contra Au-CB. Lo anterior claramente refleja la capacidad del bloque Au para inducir la entrada a las células.

Dado que uno de los principales retos de este trabajo no solamente es demostrar que es posible mejorar la eficiencia de transfección de las AVLPs mediante la adición de bloques funcionales como Au y Tf sino también, demostrar que estas modificaciones pueden ser programables y permitir el control sobre el funcionamiento de las AVLPs, se evaluó si efectivamente los bloques adicionados funcionan de la manera esperada mediante una exploración de la ruta que estas AVLPs modificadas utilizan como vía de entrada.

Primero se evaluó el efecto de la inhibición de endocitosis al realizar experimentos de transfección a 4 °C por 1 h (fig. 39.A). En estas condiciones, los procesos metabólicos que requieren ATP, como la endocitosis, se detienen. Esta estrategia se ha utilizado para distinguir entre partículas que entran a las células mediante endocitosis de aquellas que utilizan mecanismos alternativos como disrupción de membranas para entrar a las células [133,134]. Para esto, se determinó el porcentaje de eficiencia de transfección relativa a 4 °C con respecto a la eficiencia de transfección a 37 °C para cada muestra. En este sentido, un porcentaje del 100 % significa que todas las partículas entran a las células por mecanismos independientes de endocitosis, mientras que un 0 % indicaría la inhibición total de la entrada de las partículas debido a que estas entran exclusivamente por endocitosis. Cualquier valor intermedio indica la fracción de partículas que son capaces de entrar por rutas independientes de endocitosis. En el gráfico 39.B se observa que en el control con lipofectamina prácticamente no hubo cambio y se observó un 98 % de eficiencia de transfección relativa a 4 °C. La transfección relativa de las AVLPs de CSB fue de 17 %, indicando que el 83 % de reducción es debido a la inhibición de endocitosis. De forma similar, la entrada de AVLPs de Tf-CSB se redujo hasta un 3 %. En contraste, las AVLPs de Au-CSB presentaron una eficiencia de transfección relativa de 68 %, y del 58 % para partículas que tienen 50 % de Au-CSB. Estos resultados indican que la adición del bloque Au permite la entrada de las AVLPs a las células mediante mecanismos independientes de

endocitosis, mientras que Tf, principalmente utiliza endocitosis. Es importante notar que la reducción del 32 % en la entrada observada para las AVLPs de Au-CSB indica que existe una fracción de estas AVLPs que se internaliza mediante endocitosis. Estos resultados sugieren que los bloques de Au y Tf adicionados a las AVLPs para facilitar la entrada a las células, lo hacen mediante los mecanismos esperados, lo cual tiene implicaciones importantes en el diseño de las AVLPs demostrando que su diseño modular permite la adición de nuevo bloques y que la función de éstos se conserva.

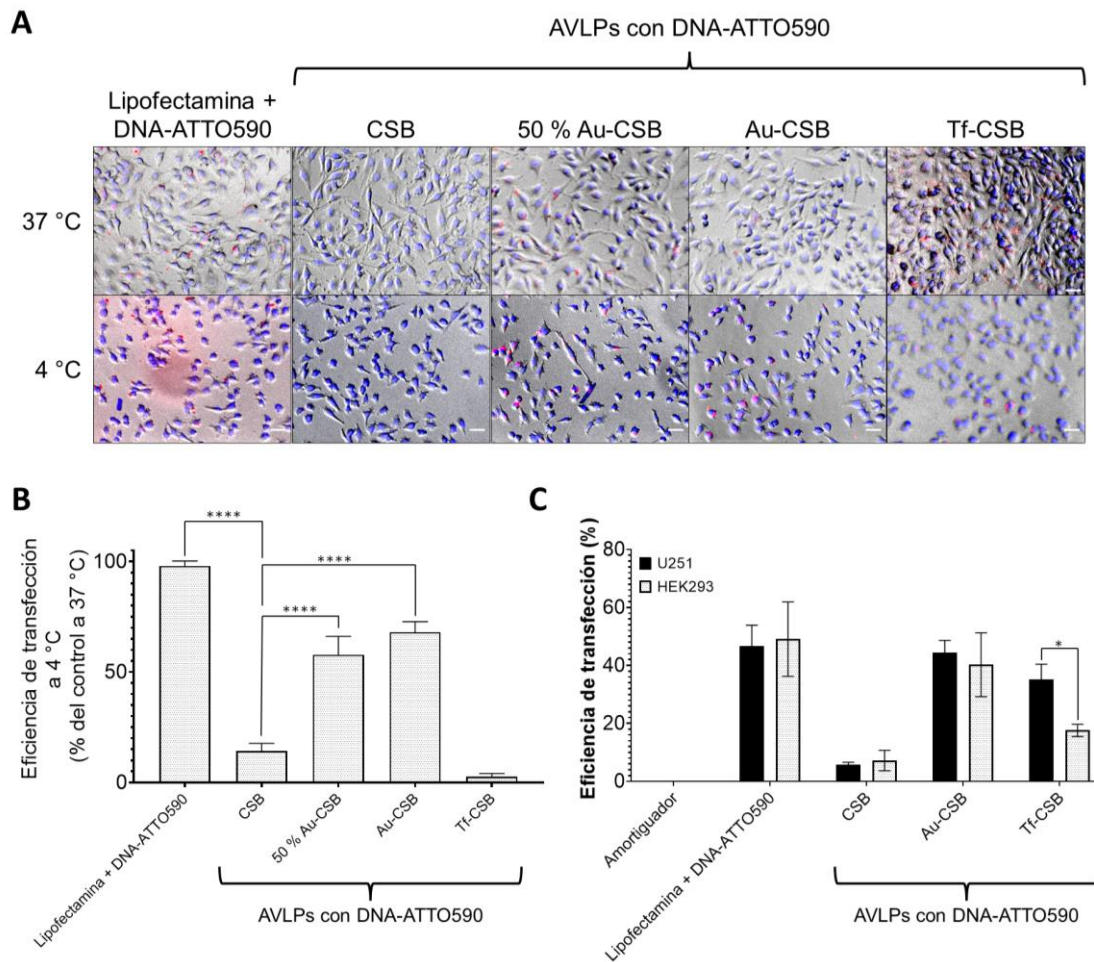


Figura 39. Exploración de la ruta de entrada de AVLPs a células. (A) Imágenes de fluorescencia de células U251 24 h postransfección con las distintas AVLPs. La barra de escala es de 50 μ m. (B) Gráfico de eficiencia de entrada a 4 °C relativa a 37 °C para cada tipo de AVLPs a células U251. (C) Comparación de eficiencia de entrada de AVLPs en células U251 y HEK293. La eficiencia de entrada corresponde al porcentaje de células con marca fluorescente con respecto al número de células totales. Los asteriscos muestran el nivel de significancia estadística de las diferencias entre grupos. *: $p \leq 0.05$, ****: $p \leq 0.0001$.

Posteriormente se evaluó la especificidad de las AVLPs en células que sobre expresan o no el receptor de transferrina. Para ello se comparó le eficiencia de entrada de las AVLPs en células U251, las cuáles se ha reportado que sobre expresan el receptor de

transferrina, contra las células HEK293, las cuáles expresan el receptor en menor medida [131,132]. En la figura 39.C se observa que hay un 50 % menos de entrada de las AVLPs de Tf-CSB en las células HEK293, lo cual concuerda con la expresión diferencial del receptor en ambas líneas celulares. Estos resultados sugieren que las AVLPs de Tf-CSB utilizan principalmente el receptor de Tf como vía de entrada. Es importante recalcar que todas las otras muestras de AVLPs de CSB o Au-CSB entran en niveles similares en ambas líneas celulares, indicando que éstas AVLPs no tienen especificidad sobre alguna de las dos líneas celulares probadas.

8.16 Localización intracelular de las AVLPs

Posteriormente se caracterizó la localización intracelular de las AVLPs mediante microscopía confocal utilizando los marcadores Hoechst, para teñir el núcleo de las células, y LysoTracker, para teñir endosomas. La figura 40.A muestra imágenes representativas de células transfectadas con las AVLPs por 4 h. Se observa que la mayoría de las AVLPs colocalizaron con endosomas y no hay presencia de AVLPs en el núcleo. La figura 40.B muestra la distribución de valores de PCC entre las AVLPs y los endosomas. El valor promedio de PCC para todas las AVLPs es aproximadamente 0.3. Sin embargo, las AVLPs formadas por Au-CSB presentan una tendencia hacia valores cercanos a 0, lo que indica una disminución en la colocalización con endosomas, mientras que las AVLPs de Tf-CSB presentan valores más cercanos a 1. Esto concuerda con los resultados anteriores que demuestran que todas las AVLPs utilizan hasta cierto punto, rutas de entrada que involucran endocitosis. Estos resultados indican que, a pesar de que se logró incrementar la eficiencia de entrada de las AVLPs a las células, las AVLPs se mantienen atrapadas en los endosomas, incluso cuando contienen Au que tiene la capacidad de alterar membranas. Esto es un factor importante que pudiera limitar la eficiencia de expresión de un gen de interés. Por lo tanto, es necesario buscar alternativas que puedan facilitar el escape endosomal de las partículas.

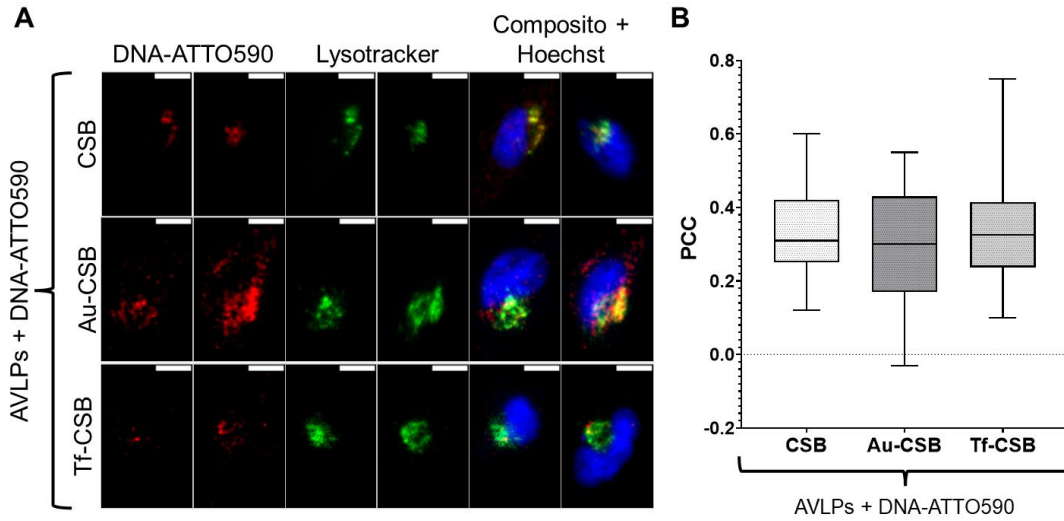


Figura 40. Distribución intracelular de las AVLPs. (A) Microscopía confocal de células U251 después de 4 h de transfección con AVLPs. (B) Distribución del coeficiente de correlación de pearson (PCC) entre Lysotracker y AVLPs. Barra de escala = 10 μ m.

8.17 Citotoxicidad de las AVLPs

Posteriormente se evaluó la citotoxicidad de las AVLPs en condiciones similares a las de transfección *in vitro* en células U251 incubadas con las AVLPs por 24 h y posteriormente tratadas con MTT para determinar la actividad metabólica de las células. Tal como se muestra en la figura 41, todas las AVLPs indujeron una reducción en la actividad metabólica

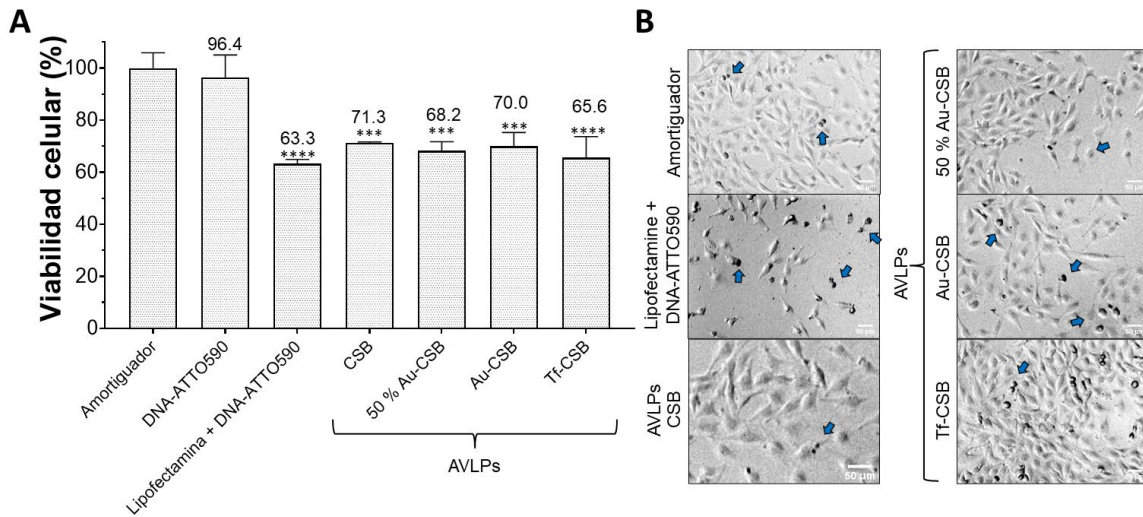


Figura 41. Efecto de las AVLPs sobre la viabilidad celular. (A) Porcentaje de viabilidad celular medida en función de la actividad metabólica mediante un ensayo de MTT de células U251 transfectadas con AVLPs formadas con dsDNA (742 pb) por 24 h. (B) Microscopía de campo claro de células U251 incubadas con AVLPs durante 24 h. Las flechas azules indican células con morfología anormal. La barra de escala es de 50 μ m. Los asteriscos en (A) indican el nivel de significancia estadística de las diferencias de los grupos comparados contra el control con solo amortiguador. ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$.

hasta un 70 % del control, mientras que lipofectamina, indujo una reducción de hasta el 60 %. Por otro lado, no se observaron cambios importantes en la morfología de las células tratadas con las AVLPs en comparación con lipofectamina, en donde se observó una mayor presencia de células redondeadas como consecuencia del estrés metabólico.

8.18 Eficiencia de transfección de AVLPs con mRNA

En la etapa final proyecto se evaluó la capacidad de las AVLPs para entregar e inducir la expresión de un gen reportero. Para ello se utilizó un mRNA auto replicante (fig. 42.A). Este mRNA contiene la secuencia codificante de una RdRp derivada del virus Nodamura. Este RNA puede ser directamente traducido dentro del citoplasma de la célula para producir la RdRp, la cuál es capaz de generar más copias de su RNA. En el diseño de este RNA se incluyó también el gen reportero de la proteína eYFP unido a la secuencia de RdRp mediante la secuencia del péptido autolítico T2A. Así, RdRp y eYFP se traducen como una sola molécula que se divide por actividad del péptido T2A. El uso de este mRNA ha permitido obtener niveles de expresión del transgén de hasta un orden de magnitud mayor en comparación con la expresión de mRNA no replicativos [135]. El replicón se sintetiza mediante transcripción *in vitro* utilizando como sustrato el plásmido linealizado pDNA_NR_eYFP (fig. 42.B).

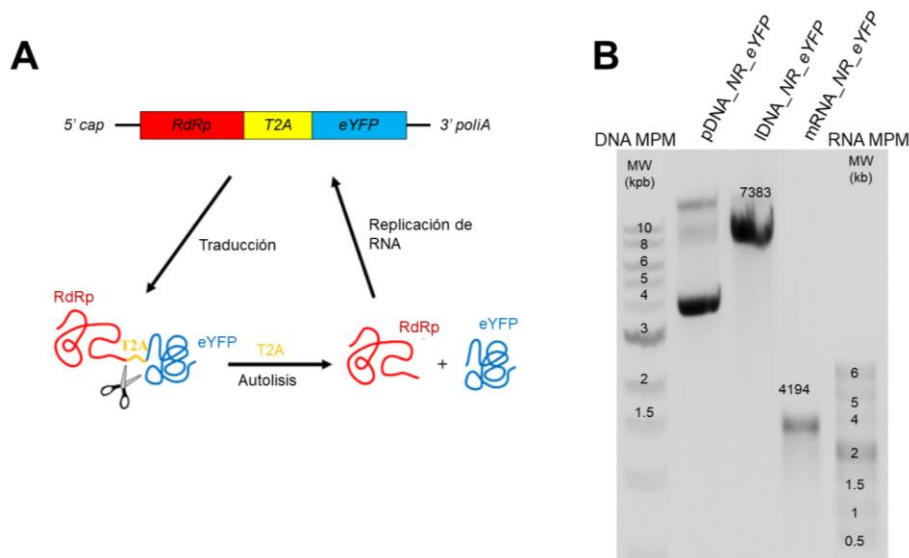


Figura 42. mRNA replicón. (A) Esquema de diseño del replicón compuesto por RdRp el péptido autolítico T2A y la proteína reportera eYFP. El replicón se traduce en el citoplasma de la células cómo una sola molécula que se auto lisa por actividad de T2A, separando a RdRp y a eYFP. (B) Producción del mRNA del replicón a partir del plásmido pDNA_NR_eYFP, el cuál se linealiza (IDNA_NR_eYFP) para utilizarlo como sustrato en una reacción de transcripción *in vitro*. MPM: Marcador de peso molecular.

Una vez obtenido el mRNA replicón se procedió a formar AVLPs a una N/P = 5. En la figura 43.A se muestra el esquema del diseño de las AVLPs de CSB con mRNA basado en el modelo propuesto por Marchetti *et al*, en 2019. En la figura 43.B se muestra el gel de EMSA de la formación de las AVLPs entre CSB y el mRNA replicón, mientras que en la figura 43.C se muestran imágenes de TEM de los distintos tipos de AVLPs formadas con el mRNA replicón.

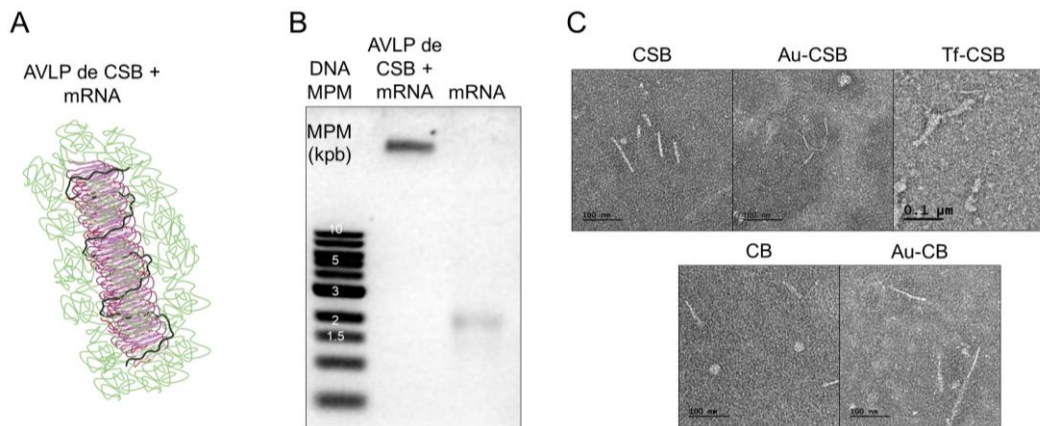


Figura 43. Formación de AVLPs con mRNA replicón. (A) Esquema de AVLPs de CSB y mRNA con base en el diseño propuesto por Marchetti *et al* 2019. (B) EMSA de formación de AVLPs de CSB con el mRNA replicón a una N/P = 5. (C) Micrografías de TEM de AVLPs con el mRNA replicón. La barra de escala corresponde a 100 nm.

Posteriormente se analizó la protección del mRNA ante RNAsas cuando las AVLPs son incubadas en presencia de RNasa A a una relación de 0.12 μg de RNasa por cada 500 ng de RNA a 37 °C por 1 h. En la figura 44 se observa que después del tratamiento con RNasa A, únicamente el 13 % de las AVLPs permanecieron intactas. Lo que indica que las AVLPs brindan poca protección al mRNA.

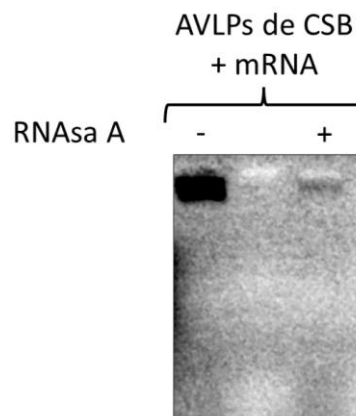


Figura 44. Ensayo de protección de mRNA en AVLPs contra RNasa A. EMSA de AVLPs formadas con CSB y mRNA a una N/P = 5 e incubadas con RNasa A por 1 h a 37 °C.

Finalmente, se realizaron experimentos de transfección en células BHK-21 con las distintas AVLPS formadas con el mRNA replicón hasta por 72 h. Es importante mencionar que en este experimento se utilizó una línea celular distinta debido a que existe evidencia de que la actividad del replicón, es decir de la RdRp es dependiente del tipo de línea celular. Este replicón ya ha sido estudiado anteriormente en células BHK-21 con éxito. Dado que hasta este punto del proyecto no se conocía la eficiencia de entrada de las AVLPS en esta línea celular, en este experimento, además de evaluar las distintas AVLPS, es decir CSB, Au-CSB, Tf-CSB, CB y Au-CB, se incluyeron también un par de controles de AVLPS de CSB y CB suplementadas con lipofectamina. Lo anterior debido a que se ha reportado que la adición de lipofectamina es capaz de facilitar la entrada de partículas virales al interior de la célula [166]. En este sentido, el objetivo fue asegurarse de que las AVLPS puedan entrar a las células y tener una idea acerca de la liberación y disponibilidad del mRNA a la maquinaria de traducción intracelular.

La figura 45 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de células transfectadas con las AVLPS por 24 h, en las cuales se observa que las AVLPS no permitieron la expresión del gen reportero. Únicamente se observa una señal de fluorescencia clara en la muestra de células que fueron transfectadas con las AVLPS de CB suplementadas con lipofectamina. De manera similar, en la figura 45.B se muestra el gráfico de intensidad de fluorescencia de células transfectadas con las AVLPS después de 24 h, en donde se observa que efectivamente, únicamente la muestra con de AVLPS de CB suplementadas con lipofectamina presentó una diferencia clara con respecto al control de mRNA solo.

Con el fin de indagar si este resultado negativo se debió a que las AVLPS no entran eficientemente a las células BHK-21, se realizó un análisis de qPCR a partir de RNA extraído de células transfectadas con las AVLPS por 1 h. En la figura 45.C se muestra que efectivamente, el número de copias intracelulares de replicón en las células transfectadas es significativamente menor que el del control de lipofectamina solo. En esta figura se observa también que la suplementación con lipofectamina resulta en una mayor cantidad de replicón dentro de las células. Por otra parte, se observa un mayor número de copias de replicón en las muestras de las AVLPS modificadas con los bloques Au-CSB y Tf-CSB con respecto a CSB sin modificar. Por el contrario, esto no se observó en las AVLPS de Au-CB cuando se comparan con CB. En resumen, se pudo detectar la presencia de replicón dentro de las células en las muestras tratadas con las AVLPS, sin embargo, este número de

moléculas es significativamente menor comparado al del control positivo de lipofectamina. Adicionado a esto, en el experimento de protección contra RNasa A se observó que las AVLPs brindan poca protección al mRNA. Considerando que la cuantificación de mRNA mediante qPCR se enfoca en la amplificación de solamente un pequeño fragmento de aproximadamente 100 nucleótidos, el número de moléculas de replicón detectadas no necesariamente refleja el número de moléculas íntegras y disponibles para su traducción. Lo anterior pudiera explicar por qué no se observó una señal clara de expresión del gen reportero en las células transfectadas.

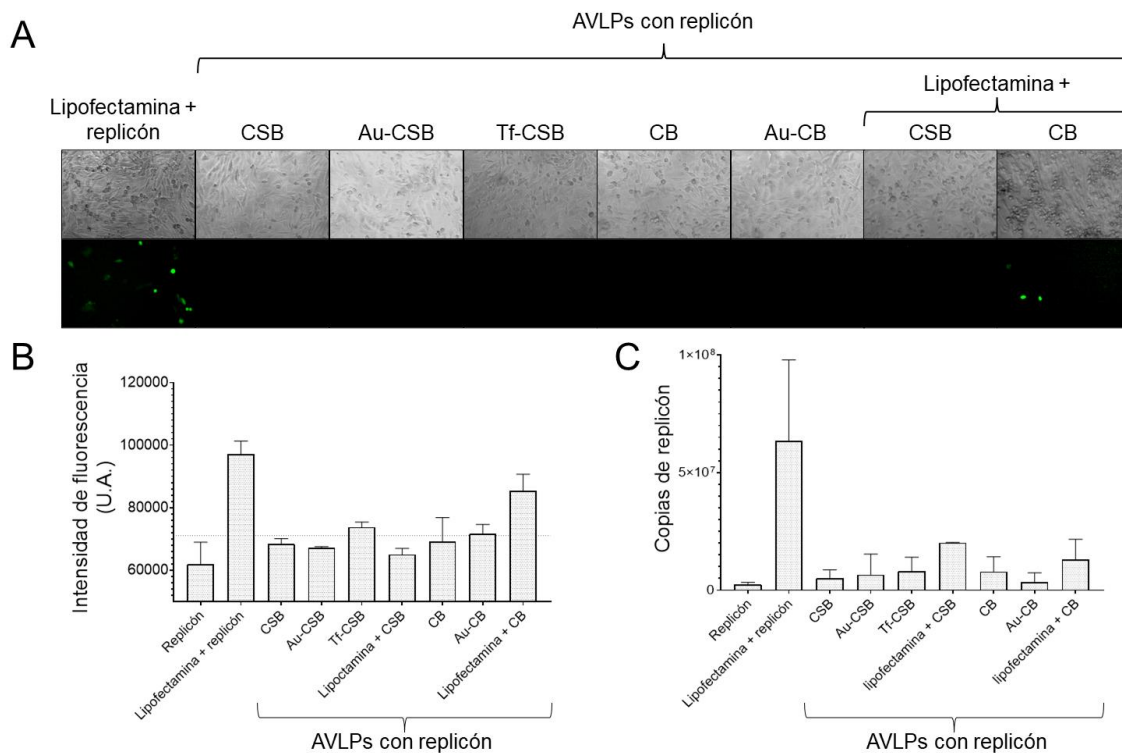


Figura 45. Transfección AVLPs formadas con replicón. (A) Imágenes de microscopía de epifluorescencia de células BHK-21 transfectadas con AVLPs formadas con el replicón 72 h postransfección. (B) Intensidad de fluorescencia de eYFP de células transfectadas con las AVLPs con el replicón. (C) Cuantificación del replicón en células transfectadas con las AVLPs formadas con el replicón a 1 h postransfección mediante qPCR.

9. Discusión general

El desarrollo de vectores para la entrega de ácidos nucleicos requiere el diseño de sistemas que sean versátiles, seguros y eficientes [167]. En este trabajo abordamos cada uno de estos aspectos utilizando como plataforma de estudio AVLPs formadas por CSB o CB previamente diseñadas por Hernandez-Garcia y colaboradores en 2012 y 2014 [8,80]. Demostramos la versatilidad de las AVLPs para ser conjugadas con bloques bioactivos que facilitan la internalización celular de las AVLPs. La adición de estos bloques resultó en un incremento en la eficiencia de entrega de ácidos nucleicos a las células. Además, estudiamos la seguridad del uso de las AVLPs mediante la evaluación de su inmunogenicidad, factor que representa una limitante importante para los sistemas de entrega.

Nuestros resultados demuestran que es posible funcionalizar a las AVLPs con péptidos de bajo peso molecular mediante fusión recombinante en el extremo N-terminal de CSB o CB. En este caso utilizamos el péptido Au de 1.4 kDa [168]. Esta fusión no afectó la capacidad de ensamblaje de CSB o CB en AVLPs con morfología tipo rodillo. En estas partículas, asumiendo que todas las cargas negativas del DNA son neutralizadas 1:1 por las lisinas del bloque B, es decir, que existe una molécula de CSB o CB por cada 12 nucleótidos del DNA molde, cada AVLP estaría desplegando alrededor de 124 péptidos de Au. Estas AVLPs que despliegan péptidos como Au con una alta densidad podrían ofrecer una oportunidad interesante no solo para la entrega de ácidos nucleicos, sino también para la presentación de péptidos para el diseño de vacunas o entrega de péptidos terapéuticos.

En el caso de bloques de mayor peso molecular como Tf, la fusión recombinante presentó ciertas complicaciones. Por un lado, Tf interfirió con el ensamblaje de las AVLPs y por otro se observó la degradación del DNA molde. La obstrucción del ensamblaje podría deberse a un impedimento estérico debido al gran tamaño de Tf (aproximadamente 74.7 kDa) comparado con CSB (44,7 kDa). La causa de la degradación del DNA molde no es clara. Una posible hipótesis es una actividad tipo nucleasa inherente a Tf. A pesar de que no existen estudios previos que reporten una actividad tipo nucleasa para Tf, si los hay para la proteína lactoferrina, la cual tiene un rol biológico similar al de Tf, ambas son proteínas que pertenecen a la misma familia, están involucradas en el transporte de hierro y tienen capacidad antimicrobiana [161,162,169]. Específicamente se ha descrito que lactoferrina posee actividad tipo nucleasa [161]. Tf y lactoferrina tienen un alto grado de homología estructural, la principal diferencia entre éstas es su carga superficial, mientras que Tf

presenta carga negativa a pH neutro, lactoferrina tiene carga positiva, lo cual le permite interactuar inespecíficamente con ácidos nucleicos [159,160,162]. Esta podría ser una explicación de por qué no se ha descrito una actividad tipo nucleasa para Tf, ya que a pH neutro no es capaz de interactuar con el DNA, sin embargo, la fusión con CSB podría facilitar esta interacción y potenciar su actividad de nucleasa.

Por otro lado, Tf ha sido ampliamente utilizada para el direccionamiento específico de acarreadores de ácidos nucleicos. Generalmente estos estudios se enfocan en la funcionalización de partículas previamente ensambladas con ácidos nucleicos. Siguiendo esta estrategia, en este trabajo utilizamos el agente entrecruzante Sulfo-SMCC para funcionalizar Tf en la superficie de las AVLPs.

Al comparar los efectos de funcionalización con otros sistemas como las partículas virales, se ha observado que incluso la adición de péptidos de bajo peso molecular generalmente interfiere con su ensamblaje, lo que da como resultado partículas menos estables o incluso impide su ensamblaje [170,171]. Por lo tanto, la funcionalización recombinante con péptidos a partículas virales a menudo requiere que éstas se realicen solamente en una pequeña fracción de los capsómeros dentro del total de los que conforman la cápside y/o insertarse en un bucle externo de su superficie [172,173]. En el caso de CSB, la adición de péptidos pequeños puede realizarse directamente en el extremo N-terminal debido a la flexibilidad del bloque "C". Para la funcionalización con proteínas de alto peso molecular, generalmente se utilizan estrategias de funcionalización química. Por ejemplo, existen reportes previos de funcionalización de cápsides virales con Tf [174,175]. En el caso de las AVLPs, la presencia de la única cisteína localizada en el extremo N-terminal de CSB permitió su funcionalización con Tf mediante el uso del agente entrecruzante Sulfo-SMCC.

De manera general, la morfología de las AVLPs funcionalizadas con Au o con Tf no cambió con respecto a las de CSB o CB. En este sentido, CSB compacta al ácido nucleico utilizado como molde y forma fibras rígidas, mientras que CB únicamente decora al ácido nucleico. Esto se observó más claramente cuando se formaron AVLPs con pDNA y concuerda con previos reportes en donde se utilizó dsDNA lineal.

Los acarreadores de ácidos nucleicos deben de ser estables en condiciones fisiológicas, una manera de evaluar esto es mediante la prueba de estabilidad con heparina, la cual es un referente para evaluar la estabilidad de nanopartículas cuya principal fuerza

de interacción con ácidos nucleicos está basada en interacciones electrostáticas [176]. Lo anterior tomando en cuenta la naturaleza de heparina la cuál es un polianión con una alta densidad de carga negativa, y que además es un componente natural de la sangre [141]. En presencia de heparina, las AVLPs formadas con CSB son más resistentes que las de CB debido a la presencia del bloque "S". Más importante, todas las AVLPs, a excepción de Au-CB mantuvieron un alto porcentaje de AVLPs ensambladas a concentraciones mayores a las reportadas para los niveles endógenos de heparina en sangre. Por otro lado, todas las AVLPs presentaron un alto grado de estabilidad en medios de cultivo sin suero. En el caso de la adición de suero, las AVLPs de CSB mostraron una mayor estabilidad, a un grado que es comparable con otros sistemas de entrega que han sido exitosos en estudios *in vivo* [97].

La seguridad y eficiencia de los vectores también puede estar limitada por la capacidad del vector de inducir una respuesta inmune [177]. En estudios con vectores virales, la pre-existencia de anticuerpos específicos contra el vector puede desencadenar respuestas inflamatorias no deseadas e interferir con la capacidad de entrega de los ácidos nucleicos [33]. Esto es una problemática importante cuando se utilizan vectores basados en vectores virales que se distribuyen de forma natural en la población humana [32]. Además, la capacidad de inducir anticuerpos después de una primera exposición limita la posibilidad de una segunda administración del vector cuando es difícil mantener niveles de expresión del transgén de interés por tiempos prolongados [31]. Por una parte, las AVLPs son sistemas novedosos, por lo cual no existe el riesgo de preexistencia de anticuerpos en la población. Además, nuestros resultados demuestran que las AVLPs generan una respuesta inmune humoral baja, la cual es aproximadamente 3 órdenes de magnitud menor que la inducida por vVAA, el cuál es un vector que ya ha sido aprobado para su uso en varias terapias génicas en humanos y es generalmente reconocido como poco inmunogénico al ser comparado con otros virus. Lo anterior sugiere que, en términos de respuesta inmune humoral, las AVLPs son lo suficientemente seguras para su uso *in vivo*. Sin embargo, es importante no descartar otros factores de la respuesta inmune como la respuesta innata o la inducción de citocinas proinflamatorias.

A pesar de que existen ya varios reportes de diseños de partículas viromiméticas, no hay estudios que se enfoquen en analizar su inmunogenicidad [178,179]. Incluso hay algunos ejemplos de partículas viromiméticas que utilizan componentes virales, como péptidos o el patrón de glicosilación de las proteínas estructurales de los virus para mejorar

su eficiencia de entrega, lo cual podría tener repercusiones importantes sobre la inmunogenicidad de estos sistemas [180].

La adición de Au y Tf mejoró la entrada de las AVLPs a las células, imitando el papel que cumplen algunos péptidos virales penetradores de células o que son dirigidos a cierto receptor. La adición de Au a cualquiera de las AVLPs mejoró la entrada a las células después de 4 h de incubación. Sin embargo, después de 24 h, la fracción de células fluorescentes transfectadas disminuyó, probablemente debido a la degradación de la sonda [181]. Las AVLPs con Au son capaces de utilizar mecanismos físico-mecánicos de disrupción de la membrana para ingresar a las células. Sin embargo, por lo menos un 30 % también ingresa por vías endocíticas. De manera similar, las partículas virales naturales a menudo usan diferentes rutas para acceder al interior de la célula dependiendo del contexto celular [182]. Por otro lado, las AVLPs con Tf ingresan por endocitosis con una cinética más lenta. Esto podría deberse a que los procesos endocíticos involucran acciones muy ordenadas y controladas, que son especialmente lentas para esta geometría de nanopartículas [183,184]. Además, la combinación de Au y Tf no solo mejoró, sino que aceleró la entrada de las AVLPs a las células. Por otro lado, la baja eficiencia de entrada de las AVLPs sin modificar es también un aspecto favorable para este sistema, dado que en una aplicación *in vivo* esto resultaría en un menor grado de inespecificidad.

Existen reportes que sugieren que Au promueve el escape endosomal cuando se fusiona a proteínas reporteras, en este trabajo no observamos este efecto [118]. Es posible que su anclaje a las AVLPs haya disminuido su actividad o simplemente no se alcanzó la sensibilidad necesaria para encontrar AVLPs libres en el citoplasma. Lo anterior considerando que se tiene solamente un fluoróforo por AVLp dado que es el DNA el que está marcado con el fluoróforo. En este escenario, es más fácil detectar a las AVLPs que se encuentren concentradas en los compartimentos endocíticos que aquellas que escapan y se diluyen en el citoplasma. Para esto se requieren más estudios que involucren el marcaje de CSB para tener más fluoróforos por AVLp y así aumentar la señal de fluorescencia y determinar si realmente no hay un cambio en la distribución intracelular de las AVLPs. Todo esto indica que las AVLPs de Au-CSB y Tf-CSB pueden ingresar a la célula de una manera más eficiente que las AVLPs de CSB, a pesar de que una gran cantidad de ellas es atrapada dentro de los lisosomas después de 4 h de transfección.

En los ensayos de transfección con mRNA observamos que las AVLPs no permitieron la expresión del gen reportero. El hecho de que las AVLPs brindan una protección baja

contra RNAsas aunado que las AVLPs entran por vías endocíticas, en donde existe una alta concentración de nucleasas, podrían ser la razón por la cual no se observó una expresión evidente del gen de interés. En este sentido, es necesario buscar alternativas para ofrecer una mayor protección al mRNA. Este fenómeno ha sido una limitante para partículas viromiméticas diseñadas a partir de cero. En otros ejemplos donde se han utilizado sistemas viromiméticos de dos componentes multiméricos para formar estructuras icosaédricas, se ha observado que estas estructuras contienen poros, a través de los cuáles las nucleasas pueden entrar y degradar al ácido nucleico [93,95]. En este caso, de acuerdo al modelo de la conformación del ácido nucleico en las AVLPs reportado por Marchetti y colaboradores en 2019, el RNA se encuentra alrededor de la fibra formada por el bloque “S” que a su vez está envuelta por el bloque “C” (fig. 43) [112]. Sin embargo, el bloque “C” no forma una estructura secundaria definida y es muy flexible, por lo que podría estar permitiendo la entrada de nucleasas hasta el núcleo de la partícula y, por tanto, la degradación del RNA. Una alternativa podría ser la modificación del bloque “C” con estructuras más rígidas que brindaran una capa de protección e impidan el acceso de nucleasas al interior de las AVLPs, sin embargo, esto involucraría un rediseño importante en la estructura de las AVLPs. Otra estrategia más sencilla sería recubrir las AVLPs con lípidos, sin embargo, se tendría que evaluar el beneficio del uso de las AVLPs en comparación con nanopartículas lipídicas. Por otro lado, en estudios anteriores se ha reportado que las AVLPs de CB o CSB entregan de manera eficiente ácidos nucleicos cortos como siRNA y ASO, en los cuales se ha visto una inhibición sobre la expresión del gen diana [9,115]. En este sentido sería importante evaluar la entrega de este tipo de ácidos nucleicos con las AVLPs modificadas con Au y Tf.

Existen en la literatura una gran cantidad de sistemas viromiméticos, sin embargo, este trabajo reporta el primer ejemplo de AVLPs basadas en péptidos con diseño modular que son capaces de mimetizar las propiedades fisicoquímicas de los virus como estructura y morfología y que además pueden ser fácilmente programables para mejorar sus funciones biológicas como la internalización celular. Otros ejemplos de sistemas viromiméticos basados en péptidos modulares han demostrado presentar altos niveles de transfección *in vitro* [2,3,6,98]. Sin embargo, en estos sistemas, generalmente es difícil tener un control preciso sobre la morfología de las nanopartículas, además de que frecuentemente utilizan péptidos derivados de proteínas virales, lo cual pudiera tener un efecto negativo sobre su toxicidad e inmunogenicidad. Por otro lado, los ejemplos de partículas viromiméticas que imitan en gran medida las propiedades estructurales de las cápsidas virales no han sido

utilizadas como sistemas de acarreadores [88,93,95]. Este tipo de partículas se han obtenido mediante procesos de evolución *in vitro* y son capaces de encapsular su propio RNA. Incluso, en algunos casos se ha demostrado que son capaces de entrar a células [93]. Sin embargo, su capacidad como vectores no ha sido evaluada. Particularmente, no se ha demostrado que este tipo de partículas permitan su desensamble para permitir el acceso de su RNA a los ribosomas. Además, dado que este tipo de partículas son el resultado de un proceso de evolución *in vitro*, su capacidad de ser modificadas o reprogramadas es limitada. En el caso de las AVLPs, se ha demostrado que estas se pueden modificar con componentes del sistema CRISPR-CAS para facilitar el empaquetamiento de una secuencia específica [185].

En este trabajo se muestra la versatilidad de las AVLPs para ser modificadas, se demostró que son partículas poco inmunogénicas y se mejoró su eficiencia de internalización celular. Este estudio sienta las bases para futuros enfoques encaminados a mejorar la eficiencia de transfección de las AVLPs, los cuales deberán enfocarse en la mejora de la protección contra nucleasas y su capacidad de escapar de endosomas. Por otro lado, debido a la facilidad de conjugación de las AVLPs con péptidos y a que pueden ser internalizadas por células, se plantea su uso alternativo como plataforma para el diseño de vacunas o de despliegue de péptidos terapéuticos.

10. Conclusiones

En el presente trabajo demostramos que las AVLPs son partículas estables en condiciones similares a las fisiológicas y particularmente, la proteína CSB protege al ácido nucleico de su degradación en presencia de SFB. Además, estas partículas son seguras en términos de su inmunogenicidad. Tanto CB como CSB, ya sea en forma de AVLp o como monómeros en solución inducen muy poca respuesta inmune humoral comparada contra sistemas que ya han sido aprobados para su uso en humanos.

Se logró la funcionalización de las AVLPs con bloques bioactivos para facilitar su entrada a células. Esto revela las bondades del diseño modular de las AVLPs. Los bloques conformados por péptidos de bajo peso molecular como Au se pueden fusionar directamente de manera recombinante. Por otro lado, bloques más grandes como Tf se pueden añadir mediante conjugación química.

La adición de estos bloques logró mejorar hasta 11 veces la entrada de las AVLPs a las células. Sin embargo, una parte de estas son arrestadas en endosomas y, teniendo en cuenta que las AVLPs no brindan una protección astringente contra el ataque de RNAsas, no se logró observar una expresión evidente de un gen reportero al transfectar células con AVLPs formadas con mRNA.

Finalmente, los resultados de este trabajo respaldan el hecho de que las AVLPs de CSB tienen la capacidad de ser programados para dirigirse a ciertos tipos de células a través de rutas específicas mediante la conjugación con una variedad de ligandos que tienen diferentes mecanismos de entrada celular. Esta capacidad de las AVLPs de ser programables se refleja en la versatilidad de las proteínas para manipular su diseño, en donde se probaron 3 estrategias: i) cambios a nivel de secuencia de aminoácidos de los bloques que componen a las proteínas mediante técnicas de biología molecular, esta estrategia resultó particularmente favorable cuando se añadió una secuencia de un péptido pequeño ii) conjugación química de las AVLPs, que permitió la fusión de proteínas de gran peso molecular a la superficie de las AVLPs y iii) formando AVLPs con combinaciones de distintas proteínas derivadas de CSB para obtener AVLPs con propiedades mixtas.

11. Perspectivas

El presente trabajo representa un avance hacia el diseño de partículas que puedan ser capaces de imitar las propiedades de los virus necesarias para la entrega de ácidos nucleicos. En este sentido es necesario diseñar una estrategia para asegurar el escape endosomal de las AVLPs. Para lo anterior se propone el uso de péptidos fusogénicos y la adición de módulos ricos en histidinas. Existen reportes que demuestran que el uso de policonjugados basados en histidinas resulta en una mayor eficiencia de transfección cuando se compara con el uso de lisinas. Lo anterior debido a las propiedades bioquímicas de la histidina que, por un lado, se ha propuesto que es capaz de inducir el efecto de esponja de protones y así facilitar el escape endosomal y, por otro lado, facilita la accesibilidad del ácido nucleico a la maquinaria celular al desensamblarse más fácil en condiciones fisiológicas debido a su pKa característico [186].

Otro factor muy importante es buscar alternativas para aumentar la protección de las AVLPs ante nucleasas. Como una opción sencilla y rápida, se propone el recubrimiento de las AVLPs con una bicapa lipídica. Esto pudiera adicionar una barrera entre el medio exterior y el núcleo de la partícula, así como a la vez servir como un modelo de estudio para el desarrollo de AVLPs envueltas que pudieran imitar las propiedades de los virus envueltos.

Por otro lado, es importante también reconocer el potencial de las AVLPs como sistemas de acarreadores, no solamente de ácidos nucleicos, sino de fármacos o péptidos y por tal, esta plataforma pudiera ser un excelente sistema para el desarrollo de vacunas, o el despliegue de péptidos terapéuticos, tal es el caso de péptidos antimicrobianos como Au.

12. Referencias

- [1] E. Mastrobattista, M.A.E.M. van der Aa, W.E. Hennink, D.J.A. Crommelin, Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery., *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 115–121. <https://doi.org/10.1038/nrd1960>.
- [2] Y.H. Wang, S.S. Mangipudi, B.F. Canine, A. Hatefi, A designer biomimetic vector with a chimeric architecture for targeted gene transfer, *J. Control. RELEASE.* 137 (2009) 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.03.005>.
- [3] F. Sadeghian, S. Hosseinkhani, A. Alizadeh, A. Hatefi, Design , engineering and preparation of a multi-domain fusion vector for gene delivery, *Int. J. Pharm.* 427 (2012) 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.062>.
- [4] A. Majidi, M. Nikkhah, F. Sadeghian, S. Hosseinkhani, Development of novel recombinant biomimetic chimeric MPG-based peptide as nanocarriers for gene delivery: Imitation of a real cargo, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 107 (2016) 191–204. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.06.017>.
- [5] N.H. Kim, C. Provoda, K.D. Lee, Design and Characterization of Novel Recombinant Listeriolysin O-Protamine Fusion Proteins for Enhanced Gene Delivery, *Mol. Pharm.* 12 (2015) 342–350. <https://doi.org/10.1021/mp5004543>.
- [6] M. Cao, Z. Zhang, X. Zhang, Y. Wang, J. Wu, Z. Liu, L. Sun, D. Wang, T. Yue, Y. Han, Y. Wang, Y. Wang, M. Wang, Peptide Self-assembly into stable Capsid-Like nanospheres and Co-assembly with DNA to produce smart artificial viruses, *J. Colloid Interface Sci.* 615 (2022) 395–407. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.01.181>.
- [7] S. Tarvirdipour, X. Huang, V. Mihali, C. Schoenenberger, C.G. Palivan, Peptide-Based Nanoassemblies in Gene Therapy and Diagnosis : Paving the Way for Clinical Application, *Molecules.* 25 (2020) 3482.
- [8] A. Hernandez-Garcia, D.J. Kraft, A.F.J. Janssen, P.H.H. Bomans, A. Nico, J.M. Sommerdijk, D.M.E. Thies-weesie, M.E. Favretto, R. Brock, A. Frits, D. Wolf, M.W.T. Werten, P. Van Der Schoot, M.C. Stuart, R. De Vries, Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses, *Nat. Nanotechnol.* (2014) 1–35. <https://doi.org/10.1038/NNANO.2014.169>.
- [9] D. Li, X. Li, J. Bai, Y. Liu, R. De Vries, Y. Li, Rod-shaped polypeptide nanoparticles for siRNA delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 166 (2021) 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.198>.
- [10] S. Jekhmane, R. De Haas, O.P. da Silva Filho, A.H. Van Asbeck, M.E. Favretto, A. Hernandez-Garcia, R. Brock, R. De Vries, Virus-Like Particles of mRNA with Artificial Minimal Coat Proteins: Particle Formation, Stability, and Transfection Efficiency, *Nucleic Acid Ther.* 27 (2017) 159–167. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0660>.
- [11] A. Gupta, J.L. Andresen, R.S. Manan, R. Langer, Nucleic acid delivery for therapeutic applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 178 (2021) 113834. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113834>.
- [12] Y.L. Fang, X.G. Chen, W.T. Godbey, Gene delivery in tissue engineering and regenerative medicine, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B.* 00 (2014) 000–000. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33354>.
- [13] D.W. Pack, A.S. Hoffman, S. Pun, P.S. Stayton, DESIGN AND DEVELOPMENT OF POLYMERS FOR GENE DELIVERY, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 581–593. <https://doi.org/10.1038/nrd1775>.
- [14] X.M. Anguela, K.A. High, Entering the Modern Era of Gene Therapy, *Annu. Rev. Med.* 70

- (2019) 273–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>.
- [15] S. Kimura, H. Harashima, Current status and challenges associated with CNS-targeted gene delivery across the BBB, *Pharmaceutics*. 12 (2020) 1216. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121216>.
- [16] C.C. Ma, Z.L. Wang, T. Xu, Z.Y. He, Y.Q. Wei, The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019, *Biotechnol. Adv.* 40 (2020) 107502. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107502>.
- [17] Y.K. Sung, S.W. Kim, Recent advances in the development of gene delivery systems, *Biomater. Res.* 23 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0156-z>.
- [18] C.H. Jones, C. Chen, A. Ravikrishnan, S. Rane, B.A. Pfeifer, *Overcoming Nonviral Gene Delivery Barriers: Perspective and Future*, (2013).
- [19] J.N. Warnock, C. Daigre, M. Al-rubeai, Chapter 1 Introduction to Viral Vectors, in: *Viral Vectors Gene Ther.*, 2011: pp. 1–25. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-095-9>.
- [20] Y.H. Chen, M.S. Keiser, B.L. Davidson, *Viral Vectors for Gene Transfer*, *Curr. Protoc. Mouse Biol.* (2018) 1–7. <https://doi.org/10.1002/cpmo.58>.
- [21] E. Fanales-Belasio, M. Raimondo, B. Suligoj, S. Butto, HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection : a brief overview, *Ann Ist Super Sanita.* 46 (2010) 5–14. <https://doi.org/10.4415/ANN>.
- [22] N. Pied, H. Wodrich, Imaging the adenovirus infection cycle, *FEBS Lett.* 593 (2019) 3419–3448. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13690>.
- [23] B.P. Dhungel, C.G. Bailey, J.E.J. Rasko, Journey to the Center of the Cell : Tracing the Path of AAV Transduction, *Trends Mol. Med.* 27 (2021) 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.09.010>.
- [24] M. Watanabe, Y. Nishikawaji, H. Kawakami, K. Kosai, Adenovirus Biology, Recombinant Adenovirus, and Adenovirus Usage in Gene Therapy, *Viruses.* 13 (2021) 2502.
- [25] C. Perry, A.C.M.E. Rayat, Lentiviral Vector Bioprocessing, *Viruses.* 13 (2021) 268.
- [26] F. Sakurai, M. Tachibana, H. Mizuguchi, Adenovirus vector-based vaccine for infectious diseases, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 42 (2022) 100432.
- [27] J. El Andari, D. Grimm, Production , Processing , and Characterization of Synthetic AAV Gene Therapy Vectors, *Biotechnol. J.* 16 (2021) 2000025. <https://doi.org/10.1002/biot.202000025>.
- [28] J.L. Shirley, Y.P. De Jong, C. Terhorst, R.W. Herzog, Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors, *Mol. Ther.* 28 (2020) 709–722. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.001>.
- [29] F. Mingozzi, K.A. High, Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV : progress and challenges, *Nat. Rev. Genet.* 12 (2011) 341–355. <https://doi.org/10.1038/nrg2988>.
- [30] A.N. Lukashov, A.A. Zamyatnin, *Viral Vectors for Gene Therapy : Current State and Clinical Perspectives*, *Biochem.* 81 (2016) 700–708. <https://doi.org/10.1134/S0006297916070063>.
- [31] C.S. Manno, G.F. Pierce, V.R. Arruda, B. Glader, M. Ragni, J.J.E. Rasko, M.C. Ozelo, K. Hoots, P. Blatt, B. Konkle, M. Dake, R. Kaye, M. Razavi, A. Zajko, J. Zehnder, P.K. Rustagi, H. Nakai, M. Sommer, M. Tigges, A. Chew, D. Leonard, J.F. Wright, R.R. Lessard, D. Sabatino, A. Luk, H. Jiang, F. Mingozzi, L. Couto, H.C. Ertl, K.A. High, M.A. Kay, Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response, *Nat. Med.* 12 (2006) 342–348. <https://doi.org/10.1038/nm1358>.
- [32] N. Bessis, F.J. GarciaCozar, M.C. Boissier, Immune responses to gene therapy vectors: Influence on vector function and effector mechanisms, *Gene Ther.* 11 (2004) S10–S17. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302364>.
- [33] S.E. Raper, N. Chirmule, F.S. Lee, N.A. Wivel, A. Bagg, G. Gao, J.M. Wilson, M.L. Batshaw, Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient

- following adenoviral gene transfer, *Mol. Genet. Metab.* 80 (2003) 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.08.016>.
- [34] L. Naldini, Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies, *Nat. Publ. Gr.* 12 (2011). <https://doi.org/10.1038/nrg2985>.
- [35] S. Hacein-bey-abina, A. Garrigue, G.P. Wang, J. Soulier, A. Lim, E. Morillon, E. Clappier, L. Caccavelli, E. Delabesse, K. Beldjord, V. Asnafi, E. Macintyre, L.D. Cortivo, I. Radford, N. Brousse, U. Wintergerst, M.C. Velez, L. Leiva, R. Sorensen, N. Wulffraat, Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 3132–3142. <https://doi.org/10.1172/JCI35700.3132>.
- [36] C.E. Thomas, A. Ehrhardt, M.A. Kay, PROGRESS AND PROBLEMS WITH THE USE OF VIRAL VECTORS FOR GENE THERAPY, 4 (2003) 346–358. <https://doi.org/10.1038/nrg1066>.
- [37] F. Mingozzi, K.A. High, Review Article Immune responses to AAV vectors : overcoming barriers to successful gene therapy, 122 (2016) 23–37. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-306647>.
- [38] L.M. Bryant, D.M. Christopher, A.R. Giles, C. Hinderer, J.L. Rodriguez, J.B. Smith, E.A. Traxler, J. Tycko, A.P. Wojno, J.M. Wilson, Lessons Learned from the Clinical Development and Market Authorization of Glybera, *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 64 (2013) 55–64. <https://doi.org/10.1089/humc.2013.087>.
- [39] S.M. Hoy, Onasemnogene Abeparvovec : First Global Approval, *Drugs.* 79 (2019) 1255–1262. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01162-5>.
- [40] W. Yu, H. Fang, Clinical Trials with Oncolytic Adenovirus in China, *Curr. Cancer Drug Targets.* 7 (2007) 141–148.
- [41] J. Schimmer, S. Breazzano, Investor Outlook : Rising from the Ashes ; GSK ' s European Approval of Strimvelis for ADA-SCID, *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 27 (2016) 1–5. <https://doi.org/10.1089/humc.2016.29010.ind>.
- [42] FDA Approves second CAR T-cell Therapy, *Cancer Discov.* 8 (2018) 5–6. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2017-155>.
- [43] M. Schuessler-lenz, H. Enzmann, S. Vamvakas, Regulators ' Advice Can Make a Difference : European Medicines Agency Approval of Zynteglo for Beta Thalassemia, *Clin. Pharmacol. Ther.* 0 (2019) 1–3. <https://doi.org/10.1002/cpt.1639>.
- [44] C. Sheridan, First approval in sight for Novartis' CAR-T therapy after panel vote, *Nat. Biotechnol.* 35 (2017) 691–693. <https://doi.org/10.1038/nbt0817-691>.
- [45] FDA Approves First Oncolytic Virus Therapy: Imlygic for Melanoma, *Oncol. Times.* 5 (2016) e1115641.
- [46] C.H. Jones, C. Chen, M. Jiang, L. Fang, C. Cheng, B.A. Pfeifer, Synthesis of Cationic Polylactides with Tunable Charge Densities as Nanocarriers for Effective Gene Delivery, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 1138–1145.
- [47] R.M. Blaese, K.W. Culver, A.D. Miller, C.S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. Chiang, P. Tolstoshev, J.J. Greenblatt, S.A. Rosenberg, H. Klein, M. Berger, C.A. Mullen, W.J. Ramsey, L. Muul, R.A. Morgan, W.F. Anderson, T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years, *Science* (80-). 270 (1995) 475–480. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475>.
- [48] M.Y. Mastakov, K. Baer, C.W. Symes, C.B. Leichtlein, R.M. Kotin, M.J. During, Immunological Aspects of Recombinant Adeno-Associated Virus Delivery to the Mammalian Brain, *J. Virol.* 76 (2002) 8446–8454. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.16.8446>.
- [49] S. Ferrari, U. Griesenbach, D.M. Geddes, E.A. Uk, Immunological hurdles to lung gene therapy, *Clin. Exp. Immunol.* 132 (2003) 1–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02124.x>.

- [50] M. Durymanov, J. Reineke, Non-viral delivery of nucleic acids: Insight into mechanisms of overcoming intracellular barriers, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00971>.
- [51] J. Leroux, Drug Delivery : Too Much Complexity , Not Enough Reproducibility ?, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 56 (2017) 2–4. <https://doi.org/10.1002/anie.201709002>.
- [52] I. Slivac, D. Guay, M. Mangion, J. Champeil, B. Gaillet, Non-viral nucleic acid delivery methods, *Expert Opin. Biol. Ther.* 17 (2017) 105–118. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1248941>.
- [53] L. Yang, L. Gong, P. Wang, X. Zhao, F. Zhao, Z. Zhang, Y. Li, W. Huang, Recent Advances in Lipid Nanoparticles for Delivery of mRNA, *Pharmaceutics.* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122682>.
- [54] K. Ma, C.L. Mi, X.X. Cao, T.Y. Wang, Progress of cationic gene delivery reagents for non-viral vector, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105 (2021) 525–538. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11028-6>.
- [55] A. Vitiello, F. Ferrara, Brief review of the mRNA vaccines COVID - 19, *Inflammopharmacology.* 29 (2021) 645–649. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00811-0>.
- [56] Q. Huang, J. Zeng, J. Yan, COVID-19 mRNA vaccines, *J. Genet. Genomics.* (2021) 107–114.
- [57] Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Susuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, T. Ueda, Cell-free translation reconstituted with purified components, *Nature.* 393 (2000) 751–755.
- [58] Z. Deng, Y. Tian, J. Song, G. An, P. Yang, mRNA Vaccines : The Dawn of a New Era of Cancer Immunotherapy, *Front. Immunol.* 13 (2022) 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.887125>.
- [59] D. Pezzoli, G. Candiani, Non-viral gene delivery strategies for gene therapy : ‘ nage a ` trois ’’ among nucleic acids , materials , a ‘ ‘ me and the biological environment, *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013) 1523. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1523-7>.
- [60] L. Li, Y. Wei, C. Gong, Polymeric Nanocarriers for Non-Viral Gene Delivery, *J. Biomed. Nanotechnol.* 11 (2015) 739–770. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2069>.
- [61] D. Jere, R. Arote, Y. Kim, M. Cho, T. Akaike, C. Cho, Degradable polyethylenimines as DNA and small interfering RNA carriers, *Expert Opin. Drug Deliv.* (2009) 827–834.
- [62] C. Dufes, I.F. Uchegbu, A.G. Schatzlen, Dendrimers in gene delivery B, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 2177–2202. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.09.017>.
- [63] M. Urello, W. Hsu, R.J. Christie, Peptides as a Material Platform for Gene Delivery : Emerging Concepts and Converging Technologies, *Acta Biomater.* 117 (2020) 40–59. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.027>.
- [64] B.R. Liu, J. Liou, Y. Huang, R.S. Aronstam, H. Lee, Intracellular Delivery of Nanoparticles and DNAs by IR9 Cell-penetrating Peptides, *PLoS One.* 8 (2013) 37–41. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064205>.
- [65] S. Yamano, J. Dai, C. Yuvienco, S. Khapli, A.M. Moursi, J.K. Montclare, Modified Tat peptide with cationic lipids enhances gene transfection efficiency via temperature-dependent and caveolae-mediated endocytosis, *J. Control. Release.* 152 (2011) 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.004>.
- [66] D. Zheng, D.A. Giljohann, D.L. Chen, M.D. Massich, X. Wang, H. Iordanov, C.A. Mirkin, A.S. Paller, Topical delivery of siRNA-based spherical nucleic acid nanoparticle conjugates for gene regulation, *PNAS.* 109 (2012) 11975–11980. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118425109>.
- [67] P. Dames, B. Gleich, A. Flemmer, K. Hajek, N. Seidl, F. Wiekhorst, D. Eberbeck, I. Bittmann, C. Bergemann, T. Weyh, L. Trahms, J. Rosenecker, C. Rudolph, Targeted delivery of magnetic aerosol droplets to the lung, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 495–499.

- <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.217>.
- [68] Y. Ding, Z. Jiang, K. Saha, C.S. Kim, S.T. Kim, R.F. Landis, V.M. Rotello, Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery, *Mol. Ther.* 22 (2014) 1075–1083. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.30>.
- [69] C. Plank, O. Zelphati, O. Mykhaylyk, Magnetically enhanced nucleic acid delivery . Ten years of magnetofection — Progress and prospects ☆, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2020) 1300–1331. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.08.002>.
- [70] K. Kogure, H. Akita, Y. Yamada, H. Harashima, Multifunctional envelope-type nano device (MEND) as a non-viral gene delivery system ☆, 60 (2008) 559–571. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.007>.
- [71] T. Kakudo, S. Chaki, S. Futaki, I. Nakase, K. Akaji, T. Kawakami, K. Maruyama, H. Kamiya, H. Harashima, Transferrin-Modified Liposomes Equipped with a pH-Sensitive Fusogenic Peptide: An Artificial Viral-like Delivery System †, (2004) 5618–5628. <https://doi.org/10.1021/bi035802w>.
- [72] E. Mastrobattista, R.H.G. Kapel, M.H. Eggenhuisen, P.J.M. Roholl, D.J.A. Crommelin, W.E. Hennink, G. Storm, Lipid-coated polyplexes for targeted gene delivery to ovarian carcinoma cells, 8 (2001) 405–413.
- [73] N. Terasaka, Y. Azuma, D. Hilvert, Laboratory evolution of virus-like nucleocapsids from nonviral protein cages, *PNAS.* 115 (2018) 5432–5437. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800527115>.
- [74] I.F. de la Fuente, S.S. Sawant, M.Q. Tolentino, P.M. Corrigan, J.L. Rouge, Viral Mimicry as a Design Template for Nucleic Acid Nanocarriers, *Front. Chem.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.613209>.
- [75] Y. Aoyama, T. Kanamori, T. Nakai, T. Sasaki, S. Horiuchi, S. Sando, T. Niidome, Artificial Viruses and Their Application to Gene Delivery . Size-Controlled Gene Coating with Glycocluster Nanoparticles, *J. Am. Chem. Society.* 125 (2003) 3455–3457.
- [76] G.F. Walker, C. Fella, J. Pelisek, J. Fahrmeir, S. Boeckle, M. Ogris, E. Wagner, Toward Synthetic Viruses : Endosomal pH-Triggered Deshielding of Targeted Polyplexes Greatly Enhances Gene Transfer in Vitro and in Vivo, *Mol. Ther.* 11 (2005) 418–425. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.11.006>.
- [77] M. Sarikaya, C. Tamerler, A.K. Jen, K. Schulten, F. Baneyx, Molecular biomimetics : nanotechnology through biology, 25 (2003) 577–585.
- [78] K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: chemical challenges in the creation of artificial viruses, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2562–2574.
- [79] A. Hernandez-Garcia, D.J. Kraft, A.F.J. Janssen, P.H.H. Bomans, N.A.J.M. Sommerdijk, D.M.E. Thies-weesie, M.E. Favretto, R. Brock, F.A. De Wolf, M.W.T. Werten, P. Van Der Schoot, M.C. Stuart, R. De Vries, Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses, *Nat. Nanotechnol.* 9 (2014) 698–702. <https://doi.org/10.1038/nnano.2014.169>.
- [80] A. Hernandez-Garcia, M.W.T. Werten, M.C. Stuart, F.A. de Wolf, R. De Vries, Coating of Single DNA Molecules by Genetically Engineered Protein Diblock Copolymers, *Small.* 8 (2012) 3491–3501. <https://doi.org/10.1002/smll.201200939>.
- [81] P. Lehn, S. Fabrega, N. Oudrhiri, J. Navarro, Gene delivery systems: Bridging the gap between recombinant viruses and artificial vectors, *Adv. Drug Deliv.* 30 (1998) 5–11. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00102-6).
- [82] S.D. Li, L. Huang, Non-viral is superior to viral gene delivery, *J. Control. Release.* 123 (2007) 181–183. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.004>.
- [83] M. Somiya, Q. Liu, S. Kuroda, Current Progress of Virus-mimicking Nanocarriers for Drug Delivery, *Nanotheranostics.* 1 (2017) 415–429. <https://doi.org/10.7150/ntno.21723>.

- [84] X. Xu, H. Yuan, J. Chang, B. He, Z. Gu, Hierarchical Self-Assembly of Peptide Dendrimers and Linear Polypeptides into Nanoarchitectures Mimicking Viral Capsids, *Angew. Chemie.* 124 (2012) 3184–3187. <https://doi.org/10.1002/ange.201106080>.
- [85] M. Khoshnejad, C.F. Greineder, K.W. Pulsipher, C.H. Villa, B. Altun, D.C. Pan, A. Tsourkas, I.J. Dmochowski, V.R. Muzykantov, Ferritin Nanocages with Biologically Orthogonal Conjugation for Vascular Targeting and Imaging, *Bioconjug. Chem.* 29 (2019) 1209–1218. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00004>. Ferritin.
- [86] J.A. Jones, A.S. Cristie-david, M.P. Andreas, T.W. Giessen, Triggered Reversible Disassembly of an Engineered Protein Nanocage, *Synth. Biol.* 60 (2021) 25034–25041. <https://doi.org/10.1002/anie.202110318>.
- [87] H. Wang, N. Liu, F. Yang, N. Hu, M. Wang, M. Cui, N. Bruns, X. Guan, Bioengineered Protein Nanocage by Small Heat Shock Proteins Delivering mTERT siRNA for Enhanced Colorectal Cancer Suppression, *Appl. Bio Mater.* 5 (2022) 1330–1340. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c01221>.
- [88] S. Tetter, N. Terasaka, A. Steinauer, R.J. Bingham, A.P. Scott, N. Patel, M. Leibundgut, E. Wroblewski, P.G. Stockley, R. Twarock, D. Hilvert, Evolution of virus-like protein architecture and genome packaging mechanisms in a repurposed bacterial enzyme, *Science (80-.)*. 372 (2021) 1220–1224. <https://doi.org/10.1126/science.abg2822>. Evolution.
- [89] K.A. Cannon, R.U. Park, S.E. Boyken, U. Nattermann, S. Yi, D. Baker, N.P. King, T.O. Yeates, Design and structure of two new protein cages illustrate successes and ongoing challenges in protein engineering, *Protein Soc.* (2020) 919–929. <https://doi.org/10.1002/pro.3802>.
- [90] J.B. Bale, S. Gonen, Y. Liu, W. Sheffer, D. Ellis, C. Thomas, D. Cascio, T.O. Yeates, T. Gonen, N.P. King, D. Baker, Accurate desing of megadalton-scale two-component icosahedral protein complexes, *Science (80-.)*. 353 (2016) 389–395. <https://doi.org/10.5061/dryad.8c65s>.
- [91] M. Xu, R. Zeng, J. Xiang, Q. Yan, Self-Assembly of Switchable Protein Nanocages via Allosteric Effect, *CCS Chem.* 3 (2020) 2223–2232. <https://doi.org/10.31635/ccschem.020.202000437>.
- [92] J.E. Miller, Y. Srinivasan, N.P. Dharmaraj, A. Liu, P.L. Nguyen, S.D. Taylor, T.O. Yeates, Designing Protease-Triggered Protein Cages, *J. Am. Chem. Socierty.* 144 (2022) 12681–12689. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c02165>.
- [93] G.L. Butterfield, M.J. Lajoie, H.H. Gustafson, D.L. Sellers, U. Nattermann, D. Ellis, J.B. Bale, S. Ke, G.H. Lenz, A. Yehdego, R. Ravichandran, S.H. Pun, N.P. King, D. Baker, Evolution of a designed protein assembly encapsulating its own RNA genome, *Nature.* 552 (2017) 415–420. <https://doi.org/10.1038/nature25157>.
- [94] Y. Hsia, J.B. Bale, S. Gonen, D. Shi, W. Sheffler, K.K. Fong, U. Nattermann, C. Xu, P.S. Huang, R. Ravichandran, S. Yi, T.N. Davis, T. Gonen, N.P. King, D. Baker, Design of a hyperstable 60-subunit protein icosahedron, *Nature.* 535 (2016) 136–139. <https://doi.org/10.1038/nature18010>.
- [95] K.A. Cannon, V.N. Nguyen, C. Morgan, T.O. Yeates, Design and Characterization of an Icosahedral Protein Cage Formed by a Double-Fusion Protein Containing Three Distinct Symmetry Elements, *Synth. Biol.* 9 (2020) 517–524. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00392>.
- [96] Y. Nishimura, K. Takeda, R. Ezawa, J. Ishii, C. Ogino, A. Kondo, A display of pH-sensitive fusogenic GALA peptide facilitates endosomal escape from a Bio-nanocapsule via an endocytic uptake pathway, *J. Nano.* 12 (2014) 2–7.
- [97] H.O. Mccarthy, J. Mccaffrey, C.M. Mccrudden, A. Zholobenko, A.A. Ali, J.W. Mccbride, A.S. Massey, S. Pentlavalli, K. Chen, G. Cole, S.P. Loughran, N.J. Dunne, R.F. Donnelly, V.L. Kett, T. Robson, Development and characterization of self-assembling nanoparticles using a bio-

- inspired amphipathic peptide for gene delivery, *J. Control. Release.* 189 (2014) 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.048>.
- [98] A. Majidi, M. Nikkhah, F. Sadeghian, S. Hosseinkhani, Development of novel recombinant biomimetic chimeric MPG-based peptide as nanocarriers for gene delivery : Imitation of a real cargo, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 107 (2016) 191–204. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.06.017>.
- [99] M. Alipour, S. Hosseinkhani, R. Sheikhejad, R. Cheraghi, Nano-biomimetic carriers are implicated in mechanistic evaluation of intracellular gene delivery, *Nat. Publ. Gr.* (2017) 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep41507>.
- [100] R. Ni, Y. Chau, Tuning the Inter-nanofibril Interaction To Regulate the Morphology and Function of Peptide / DNA Co-assembled Viral Mimics, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 56 (2017) 9356–9360. <https://doi.org/10.1002/anie.201703596>.
- [101] S. Yigit, O. Tokareva, A. Varone, I. Georgakoudi, D.L. Kaplan, Bioengineered Silk Gene Delivery System for Nuclear Targeting, *Macromol. Biosci.* 14 (2015) 1291–1298. <https://doi.org/10.1002/mabi.201400113>. Bioengineered.
- [102] L.M. Bravo-anaya, B. Garbay, J.L.E. Nando-rodríguez, F.C. Ramos, E. Ibarboure, K. Bathany, Y. Xia, J. Rosselgong, G. Joucla, E. Garanger, S. Lecommandoux, Nucleic acids complexation with cationic elastin-like polypeptides : Stoichiometry and stability of nano-assemblies, *J. Colloid Interface Sci.* 557 (2019) 777–792. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.09.054>.
- [103] J.A. Villegas, N.J. Sinha, N. Teramoto, C.D. Von Bargen, D.J. Pochan, J.G. Saven, Computational Design of Single-Peptide Nanocages with Nanoparticle Templating, *Molecules.* (2022) 1–15.
- [104] A. Hatefi, Z. Karjoo, A. Nomani, Development of a Recombinant Multifunctional Biomacromolecule for Targeted Gene Transfer to Prostate Cancer Cells, *Biomacromolecules.* 18 (2017) 2799–2807. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00739>.
- [105] S. Yong, H.J. Kim, J.K. Kim, J.Y. Chung, Y. Kim, Human CD64-targeted non-viral siRNA delivery system for blood monocyte gene modulation, *Sci. Rep.* (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep42171>.
- [106] Y. Wang, S.S. Mangipudi, B.F. Canine, A. Hatefi, A designer biomimetic vector with a chimeric architecture for targeted transfer, *J. Control. Release.* 137 (2009) 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.03.005>.
- [107] S. Govindarajan, J. Sivakumar, P. Garimidi, N. Rangaraj, J.M. Kumar, N.M. Rao, V. Gopal, Biomaterials Targeting human epidermal growth factor receptor 2 by a cell-penetrating peptide e af fi body bioconjugate, *Biomaterials.* 33 (2012) 2570–2582. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.003>.
- [108] N.H. Kim, C. Provoda, K. Lee, Design and Characterization of Novel Recombinant Listeriolysin O – Protamine Fusion Proteins for Enhanced Gene Delivery, *Mol. Pharm.* 12 (2015) 342–350. <https://doi.org/10.1021/mp5004543>.
- [109] L. Li, L. Song, X. Liu, X. Yang, X. Li, T. He, N. Wang, S. Yang, C. Yu, T. Yin, Y. Wen, Z. He, X. Wei, W. Su, Q. Wu, S. Yao, C. Gong, Y. Wei, Arti fi cial Virus Delivers CRISPR-Cas9 System for Genome Editing of Cells in Mice, (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b04261>.
- [110] J. Razzokov, S. Naderi, P. Van Der Schoot, Nanoscale insight into silk-like protein self-assembly: Effect of design and number of repeat units, *Phys. Biol.* 15 (2018) 066010. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/aadb5e>.
- [111] E.C. Vargas, A.C. Stuart, R. De Vries, A. Hernandez-garcia, Template-Free Self-Assembly of Artificial De Novo Viral Coat Proteins into Nanorods : Effects of Sequence , Concentration , and Temperature, *Chem. Eur. J.* 25 (2019) 11058–11065. <https://doi.org/10.1002/chem.201901486>.

- [112] M. Marchetti, D. Kamsma, E. Cazares Vargas, A. Hernandez García, P. Van Der Schoot, R. De Vries, G.J.L. Wuite, W.H. Roos, Real-Time Assembly of Viruslike Nucleocapsids Elucidated at the Single-Particle Level, *Nano Lett.* 19 (2019) 5746–5753. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02376>.
- [113] E.G. Sanchez-Rueda, E. Rodriguez-Cristobal, C.L. Moctezuma González, A. Hernandez-Garcia, Protein-coated dsDNA nanostars with high structural rigidity and high enzymatic and thermal stability, *Nanoscale.* 11 (2019) 18604–18611. <https://doi.org/10.1039/c9nr05225a>.
- [114] A. Hernandez-Garcia, N.A. Estrich, M.W.T. Werten, J.R.C. Van Der Maarel, T.H. LaBean, F.A. De Wolf, M.A. Cohen Stuart, R. De Vries, Precise Coating of a Wide Range of DNA Templates by a Protein Polymer with a DNA Binding Domain, *ACS Nano.* 11 (2017) 144–152. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b05938>.
- [115] R.E. Cárdenas-Guerra, D.S. Moreno-Gutierrez, O. de J. Vargas-Dorantes, B. Espinoza, A. Hernandez-Garcia, Delivery of Antisense DNA into Pathogenic Parasite *Trypanosoma cruzi* Using Virus-Like Protein-Based Nanoparticles, *Nucleic Acid Ther.* 30 (2020) 392–401. <https://doi.org/10.1089/nat.2020.0870>.
- [116] S. Gorgieva, V. Kokol, Biomaterials and Their Biocompatibility : Review and Perspectives, in: *Biomater. Appl. Nanomedicine*, 2011: pp. 17–52. <https://doi.org/10.5772/24118>.
- [117] C.M. Guenther, B.E. Kuypers, M.T. Lam, T.M. Robinson, J. Zhao, J. Suh, Synthetic virology : engineering viruses for gene delivery, (2014). <https://doi.org/10.1002/wnan.1287>.
- [118] M. Li, Y. Tao, Y. Shu, J.R. Larochelle, A. Steinauer, D. Thompson, A. Schepartz, Z. Chen, D.R. Liu, Discovery and characterization of a peptide that enhances endosomal escape of delivered proteins in vitro and in vivo, *J. Am. Chem. Society.* 137 (2015) 14084–14093. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b05694>.
- [119] D.K. Rai, S. Qian, Interaction of the Antimicrobial Peptide Aurein 1.2 and Charged Lipid Bilayer, *Sci. Rep.* 7 (2017) 3719. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03795-6>.
- [120] T. Rozek, K.L. Wegener, J.H. Bowie, I.N. Olver, J.A. Carver, J.C. Wallace, M.J. Tyler, The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis* The solution structure of aurein 1 . 2, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 5330–5341.
- [121] T.R. Daniels, E. Bernabeu, J.A. Rodríguez, S. Patel, M. Kozman, D.A. Chiappetta, E. Holler, J.Y. Ljubimova, G. Helguera, M.L. Penichet, The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer, *Biochem. Biophys. Acta.* 1820 (2012) 291–317. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.016>.
- [122] C.T. De Ilarduya, N. Du, Delivery of therapeutic nucleic acids via transferrin and transferrin receptors : lipoplexes and other carriers, (2013) 1583–1591.
- [123] L. Martins, F. De Godoy, F.K. Marchini, D.P. Pavoni, Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis, (2012) 2694–2703. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200078>.
- [124] K. Mizutani, K. Hashimoto, N. Takahashi, S. Aibara, B. Mikami, Structural and Functional Characterization of Recombinant Human Serum Transferrin Secreted from *Pichia pastoris*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (2010) 309–315. <https://doi.org/10.1271/bbb.90635>.
- [125] C.P. Kurtzman, Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (2009) 1435–1438. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0638-4>.
- [126] J.M. Cregg, K.J. Barringer, A.Y. Hessler, K.R. Madden, *Pichia pastoris* as a Host System for Transformations, *Mol. Cell. Biol.* 5 (1985) 3376–3385.
- [127] L. Willems, L. van Westerveld, S. Roberts, I. Weitzhandler, C. Calcines Cruz, A. Hernandez-Garcia, A. Chilkoti, E. Mastrobattista, J. van der Oost, R. de Vries, Nature of Amorphous

- Hydrophilic Block Affects Self-Assembly of an Artificial Viral Coat Polypeptide, *Biomacromolecules*. 20 (2019) 3641–3647. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00512>.
- [128] G.H. Wegner, Emerging applications of the methylotrophic yeasts, *FEMS Microbiol. Rev.* 87 (1990) 279–283.
- [129] J.L. Cereghino, J.M. Cregg, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiol. Rev.* 24 (2000) 45–66.
- [130] S. Kim, S. Warburton, I. Boldogh, C. Svensson, L. Pon, T.A. Stadheim, B. Choi, Regulation of alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter and peroxisome biogenesis in different fermentation processes in *Pichia pastoris*, *J. Biotechnol.* 166 (2013) 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.05.009>.
- [131] H. Ta, J. Keller, M. Haltmeier, S.K. Saka, F. Opazo, P. Tinnefeld, A. Munk, S.W. Hell, Mapping molecules in scanning far-field fluorescence nanoscopy, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7977. <https://doi.org/10.1038/ncomms8977>.
- [132] A. Calzolari, L.M. Larocca, S. Deaglio, V. Finisguerra, A. Boe, C. Raggi, L. Ricci-Vitani, F. Pierconti, F. Malavasi, R. De Maria, U. Testa, R. Pallini, Transferrin receptor 2 is frequently and highly expressed in glioblastomas, *Transl. Oncol.* 3 (2010) 123–134. <https://doi.org/10.1539/tlo.09274>.
- [133] T. Santos, J. Varela, I. Lynch, A. Salvati, K.A. Dawson, Effects of Transport Inhibitors on the Cellular Uptake of Carboxylated Polystyrene Nanoparticles in Different Cell Lines, *PLoS One*. 6 (2011) e24438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024438>.
- [134] D. Vercauteren, R.E. Vandenbroucke, A.T. Jones, J. Rejman, J. Demeester, S.C. De Smedt, N.N. Sanders, K. Braeckmans, The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers : Optimization and Pitfalls, *Mol. Ther.* 18 (2009) 561–569. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.281>.
- [135] A. Biddlecome, H.H. Habte, K.M. Mcgrath, S. Sambanthamoorthy, M. Wurm, M.M. Sykora, C.M. Knobler, I.C. Lorenz, M. Lasaro, K. Elbers, W.M. Gelbart, Delivery of self-amplifying RNA vaccines in in vitro reconstituted virus-like particles, *PLoS One*. 4 (2019) 1–18.
- [136] A. Hernandez-Garcia, N.A. Estrich, M.W.T. Werten, J.R.C. Van Der, T.H. Labean, F.A. De Wolf, M.A.C. Stuart, R. de Vries, Precise Coating of a Wide Range of DNA Templates by a Protein Polymer with a DNA Binding Domain, *ACS Nano*. 11 (2016) 144–152. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b05938>.
- [137] J. Stetefeld, S.A. McKenna, T.R. Patel, Dynamic light scattering : a practical guide and applications in biomedical sciences, *Biophys. Rev.* 8 (2016) 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- [138] B. Michen, T. Graule, Isoelectric points of viruses, *J. Appl. Microbiol.* 109 (2010) 388–397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04663.x>.
- [139] A. Sikora, D. Bartczak, D. Geißler, V. Kestens, G. Roebben, Y. Ramaye, Z. Varga, M. Palmi, A.G. Shard, H. Goenaga-Infante, C. Minelli, A systematic comparison of different techniques to determine the zeta potential of silica nanoparticles in biological medium, *Anal. Methods*. 7 (2015) 9835–9843. <https://doi.org/10.1039/C5AY02014J>.
- [140] H. Soheyla, Z. Foruhe, Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1), *Trop. J. Pharm. Res.* 12 (2013) 255–264.
- [141] B.H. Engelberg, A. Dudley, Plasma Heparin Levels in Normal Man, *Circulation*. 23 (1961) 578–581.
- [142] M. Alipour, S. Hosseinkhani, R. Sheikhejad, R. Cheraghi, Nano-biomimetic carriers are implicated in mechanistic evaluation of intracellular gene delivery, *Sci. Rep.* 7 (2017) 41507. <https://doi.org/10.1038/srep41507>.
- [143] V. Anand, B. Duffy, Z. Yang, N.S. Dejneka, A.M. Maguire, J. Bennett, A deviant immune

- response to viral proteins and transgene product is generated on subretinal administration of adenovirus and adeno-associated virus, *Mol. Ther.* 5 (2002) 125–132. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0525>.
- [144] D. Mohanan, B. Slütter, M. Henriksen-Lacey, W. Jiskoot, J.A. Bouwstra, Y. Perrie, T.M. Kündig, B. Gander, P. Johansen, Administration routes affect the quality of immune responses: A cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems, *J. Control. Release.* 147 (2010) 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.012>.
- [145] J.D. Harris, S. Schepelmann, T. Athanasopoulos, I.R. Graham, A.K. Stannard, Z. Mohri, V. Hill, D.G. Hassall, J.S. Owen, G. Dickson, Inhibition of atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice following muscle transduction with adeno-associated virus vectors encoding human apolipoprotein-E, *Gene Ther.* 9 (2002) 21–29. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301615>.
- [146] A. Delluc-Clavières, C. Le Bec, L. Van den Berghe, C. Conte, V. Allo, O. Danos, A.C. Prats, Efficient gene transfer in skeletal muscle with AAV-derived bicistronic vector using the FGF-1 IRES, *Gene Ther.* 15 (2008) 1090–1098. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.49>.
- [147] P.D. Kessler, G.M. Podsakoff, X. Chen, S.A. McQuiston, P.C. Colosi, L.A. Matelis, G.J. Kurtzman, B.J. Byrne, Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 14082–14087. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.14082>.
- [148] A. Rebuffat, C.O. Harding, Z. Ding, B. Thöny, Comparison of adeno-associated virus pseudotype 1, 2, and 8 vectors administered by intramuscular injection in the treatment of murine phenylketonuria, *Hum. Gene Ther.* 21 (2010) 463–477. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.127>.
- [149] L.P. Van Lieshout, G. Soule, D. Sorensen, K.L. Frost, S. He, K. Tierney, D. Safronetz, S.A. Booth, G.P. Kobinger, X. Qiu, S.K. Wootton, Intramuscular Adeno-Associated Virus-Mediated Expression of Monoclonal Antibodies Provides 100% Protection Against Ebola Virus Infection in Mice, *J. Infect. Dis.* 217 (2018) 916–925. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix644>.
- [150] J.A. Greig, H. Peng, J. Ohlstein, C.A. Medina-Jaszek, O. Ahonkhai, A. Mentzinger, R.L. Grant, S. Roy, S.J. Chen, P. Bell, A.P. Tretiakova, J.M. Wilson, Intramuscular injection of AAV8 in mice and macaques is associated with substantial hepatic targeting and transgene expression, *PLoS One.* 9 (2014) 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112268>.
- [151] E.E. Pierson, D.Z. Keifer, A. Asokan, M.F. Jarrold, Resolving Adeno-Associated Viral Particle Diversity With Charge Detection Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 176 (2016) 6718*6725. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00883>. Resolving.
- [152] A. Caputo, K. Sparnacci, B. Ensoli, L. Tondelli, Functional Polymeric Nano/Microparticles for Surface Adsorption and Delivery of Protein and DNA Vaccines, *Curr. Drug Deliv.* 5 (2008) 230–242. <https://doi.org/10.2174/156720108785914961>.
- [153] X. Chen, Y. Liu, L. Wang, Y. Liu, W. Zhang, B. Fan, X. Ma, Q. Yuan, G. Ma, Z. Su, Enhanced humoral and cell-mediated immune responses generated by cationic polymer-coated PLA microspheres with adsorbed HBsAg, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 1772–1784. <https://doi.org/10.1021/mp400597z>.
- [154] G. Charriere, M. Bejot, L. Schnitzler, G. Ville, D.J. Hartmann, Reactions to a bovine collagen implant, *Am. Acad. Dermatology.* 21 (1989) 1203. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(89\)70330-3](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(89)70330-3).
- [155] Z. Yu, B. An, J.A.M. Ramshaw, B. Brodsky, Bacterial collagen-like proteins that form triple-helical structures, *J. Struct. Biol.* 186 (2014) 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.01.003>.
- [156] D.I. Rozkiewicz, Y. Kraan, M.W.T. Werten, F.A. De Wolf, V. Subramaniam, J. Ravoo, D.N. Reinhoudt, Covalent Microcontact Printing of Proteins for Cell Patterning, *Chem. Eur. J.* 12

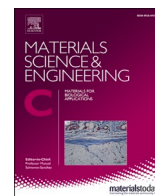
- (2006) 6290–6297. <https://doi.org/10.1002/chem.200501554>.
- [157] Charu Vepari; David L. Kaplan, Silk as Biomaterial, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 991–1007. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. Investigations.
- [158] M. Dewair, X. Baur, K. Ziegler, Use of immunoblot technique for detection of human IgE and IgG antibodies to individual silk proteins, *J. Allergy Clin. Immunol.* 76 (1985) 537–542. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(85\)90772-9](https://doi.org/10.1016/0091-6749(85)90772-9).
- [159] A.G. HOVANESSIAN, Z.L. AWDEH, Gel Isoelectric Focusing of Human-Serum Transferrin, *Eur. J. Biochem.* 68 (1976) 333–338. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10819.x>.
- [160] J. Wally, S.K. Buchanan, A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin, *BioMetals.* 20 (2007) 249–262. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9062-7>.
- [161] T.G. Kanyshkova, S.E. Babina, D. V. Semenov, N. Isaeva, A. V. Vlassov, K.N. Neustroev, A.A. Kul'minskaya, V.N. Buneva, G.A. Nevinsky, Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 3353–3361. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03715.x>.
- [162] A. Guschina, S.E. Soboleva, G.A. Nevinsky, Recognition of specific and nonspecific DNA by human lactoferrin, *J. Mol. Recognit.* 26 (2013) 136–148. <https://doi.org/10.1002/jmr.2257>.
- [163] O. Ouerghi, A. Touhami, A. Othmane, H. Ben Ouada, C. Martelet, Investigating antibody ± antigen binding with atomic force microscopy, 84 (2002) 167–175.
- [164] N.A. Gerling Cervantes, Desarrollo de un protocolo óptimo para el estudio de complejos moleculares de ADN-proteína por medio de microscopía de fuerza atómica, 2013.
- [165] E.N. Lorenzón, J.P. Piccoli, E.M. Cilli, Interaction between the antimicrobial peptide Aurein 1.2 dimer and mannans, *Amino Acids.* 46 (2014) 2627–2631. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1832-x>.
- [166] C.R. Tanimoto, A.R. Thurm, D.S. Brandt, C.M. Knobler, W.M. Gelbart, The Nonmonotonic Dose Dependence of Protein Expression in Cells Transfected with Self-Amplifying RNA, *J. Virol.* 96 (2022). <https://doi.org/10.1128/jvi.01858-21>.
- [167] E. Mastrobattista, M. van der Aa, W.E. Hennik, D.J.A. Crommelin, Artificial viruses : a nanotechnological approach to gene delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 115–121.
- [168] D.I. Fernandez, A.P. Le Brun, T.C. Whitwell, M.A. Sani, M. James, F. Separovic, The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 15739–15751. <https://doi.org/10.1039/c2cp43099a>.
- [169] S.M. Sohrabi, A. Niazi, M. Chahardoli, A. Hortamani, P. Setoodeh, In silico investigation of lactoferrin protein characterizations for the prediction of anti-microbial properties, *Mol. Biology Res. Commun.* 3 (2014) 85–100.
- [170] P. Wu, W. Xiao, T. Conlon, J. Hughes, M. Agbandje-McKenna, T. Ferkol, T. Flotte, N. Muzyczka, Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism., *J. Virol.* 74 (2000) 8635–8647. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.18.8635-8647.2000>.
- [171] A. Carreira, M. Mene, J. Reguera, M.G. Mateu, In Vitro Disassembly of a Parvovirus Capsid and Effect on Capsid Stability of Heterologous Peptide Insertions in Surface Loops *, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 6517–6525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307662200>.
- [172] J. Judd, F. Wei, P.Q. Nguyen, L.J. Tartaglia, M. Agbandje-McKenna, J.J. Silberg, J. Suh, Random Insertion of mCherry Into VP3 Domain of Adeno-associated Virus Yields Fluorescent Capsids With no Loss of Infectivity, *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 1 (2012) e54. <https://doi.org/10.1038/mtna.2012.46>.
- [173] K.H. Warrington, O.S. Gorbatyuk, J.K. Harrison, S.R. Opie, S. Zolotukhin, N. Muzyczka, Adeno-Associated Virus Type 2 VP2 Capsid Protein Is Nonessential and Can Tolerate Large Peptide Insertions at Its N Terminus, *J. Virol.* 78 (2004) 6595–6609.

- <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6595>.
- [174] J.Z. Suchanova, J. Neburkova, H. Spanielova, J. Forstova, P. Cigler, Retargeting Polyomavirus-Like Particles to Cancer Cells by Chemical Modification of Capsid Surface, *Bioconjug. Chem.* 28 (2017) 307–313. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00622>.
- [175] D. Banerjee, A.P. Liu, N. Voss, S.L. Schmid, M.G. Finn, Multivalent Display and Receptor-Mediated Endocytosis of Transferrin on Virus-Like Particles, *Chembiochem.* 11 (2014) 1273–1279. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000125>.Multivalent.
- [176] B. Krieg, M. Hirsch, E. Scholz, L. Nuhn, I. Tabujew, H. Bauer, S. Decker, A. Khobta, M. Schmidt, W. Tremel, R. Zentel, K. Peneva, K. Koynov, A.J. Mason, M. Helm, New Techniques to Assess In Vitro Release of siRNA from Nanoscale Polyplexes, *Pharm. Res.* 32 (2015) 1957–1974. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1589-7>.
- [177] V. Louis Jeune, J.A. Joergensen, R.J. Hajjar, T. Weber, Pre-existing anti-adenovirus-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy., *Hum. Gene Ther. Methods.* 24 (2013) 59–67. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2012.243>.
- [178] S.R. Pinnapireddy, M. Raafat, E. Assy, P. Schlote, U. Bakowsky, Glycosylated Artificial Virus-Like Hybrid Vectors for Advanced Gene Delivery, *Polymers (Basel).* 11 (2019) 243. <https://doi.org/10.3390/polym11020243>.
- [179] L. Tönges, P. Lingor, R. Egle, G.P.H. Dietz, A. Fahr, M. Bähr, Stearylated octaarginine and artificial virus-like particles for transfection of siRNA into primary rat neurons, *RNA.* 12 (2006) 1431–1438. <https://doi.org/10.1261/rna.2252206.effects>.
- [180] I. Bagdonaite, H.H. Wandall, Global aspects of viral glycosylation, *Glycobiology.* 28 (2018) 443–467. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy021>.
- [181] M. Rodrigues, B.G. De, D. Andreu, N.C. Santos, Kinetic uptake profiles of cell penetrating peptides in lymphocytes and monocytes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1830 (2013) 4554–4563. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.020>.
- [182] A. Helenius, Virus Entry: Looking Back and Moving Forward, *J. Mol. Biol.* 430 (2018) 1853–1862. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.03.034>.
- [183] S.W. Jones, R. Christison, K. Bundell, C.J. Voyce, S.M. V Brockbank, P. Newham, M.A. Lindsay, Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery, *Br. J. Pharmacol.* 145 (2005) 1093–1102. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706279>.
- [184] Z. Shen, H. Ye, X. Yi, Y. Li, Membrane Wrapping Efficiency of Elastic Nanoparticles during Endocytosis: Size and Shape Matter, *ACS Nano.* 13 (2019) 215–228. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.8b05340>.
- [185] C. Calcines-Cruz, I.J. Finkelstein, A. Hernandez-Garcia, CRISPR-Guided Programmable Self-Assembly of Artificial Virus-Like Nucleocapsids, *Nano Lett.* 21 (2021) 2752–2757. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c04640>.
- [186] S.P. Loughran, C.M. McCrudden, H.O. McCarthy, Designer peptide delivery systems for gene therapy, *Eur. J. Nanomedicine.* 7 (2015) 85–96. <https://doi.org/10.1515/ejnm-2014-0037>.

13. Producción científica:

A continuación, se enlistan los productos en los que participé durante mi doctorado:

- Artículo científico: R.E. Cárdenas-Guerra, **D.S. Moreno-Gutierrez**, O. de J. Vargas-Dorantes, B. Espinoza, A. Hernandez-Garcia, **Delivery of Antisense DNA into Pathogenic Parasite Trypanosoma cruzi Using Virus-Like Protein-Based Nanoparticles**, Nucleic Acid Ther. (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1089/nat.2020.0870>.
- Artículo científico: **D.S. Moreno-Gutierrez**, J. Zepeda-Cervantes, L. Vaca, A. Hernandez-Garcia, **An artificial virus-like triblock protein shows low in vivo humoral immune response and high stability**, Mater. Sci. Eng. C. 129 (2021) 112348. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112348>.
- Artículo científico: **Moreno-Gutierrez DS**, Del Toro-Ríos X, Martinez-Sulvaran NJ, Perez-Altamirano MB, Hernandez-Garcia A. **Programming the Cellular Uptake of Protein-Based Viromimetic Nanoparticles for Enhanced Delivery**. Biomacromolecules. 2023 Mar 6. doi: 10.1021/acs.biomac.2c01295. Epub ahead of print. PMID: 36877960.
- Capítulo de libro: **Creating artificial viruses using self-assembled proteins and polypeptides**. David Silverio Moreno Gutiérrez, Ximena del Toro Ríos, Armando Hernández García. Physical Virology. Enviado al Dr. Mauricio Comas García (UASLP), encargado de la publicación del libro.
- Solicitud de patente: Nanopartículas acarreadoras y método de transfección a *Trypanosoma cruzi*. Solicitud realizada a través de la oficina de vinculación del Instituto de Química, UNAM en 2020.



An artificial virus-like triblock protein shows low *in vivo* humoral immune response and high stability

David Silverio Moreno-Gutierrez^a, Jesús Zepeda-Cervantes^{b,c}, Luis Vaca^{b,d}, Armando Hernandez-García^{a,*}

^a Laboratory of Biomolecular Engineering and Bionanotechnology, Department of Chemistry of Biomacromolecules, Institute of Chemistry, UNAM, 04510 Mexico City, Mexico

^b Department of Cellular and Developmental Biology, Institute of Cellular Physiology, UNAM, Mexico

^c Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, UNAM, Mexico

^d Department of Physiology and Biophysics, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, United States

ARTICLE INFO

Keywords:

Artificial virus
Gene therapy
Adeno-associated virus
Nanoparticle
Delivery systems

ABSTRACT

The use of viral vectors for *in vivo* gene therapy can be severely limited by their immunogenicity. Non-viral vectors may represent an alternative, however, reports analyzing their immunogenicity are still lacking. Here, we studied the humoral immune response in a murine model triggered by artificial virus-like particles (AVLPs) carrying plasmid or antisense DNA. The AVLPs were assembled using a family of modular proteins based on bioinspired collagen-like and silk-like sequences that produce virus-like particles. We compared our AVLPs against an Adeno Associated Virus 1 (AAV), a widely used viral vector for *in vivo* gene delivery that has been approved by the FDA and EMA for gene therapy. We found that a 1000-fold higher mass of AVLPs than AAV are necessary to obtain similar specific antibody titers. Furthermore, we studied the stability of AVLPs against relevant biological reagents such as heparin and fetal bovine serum to ensure nucleic acid protection in biological media. Our study demonstrates that the AVLPs are stable in physiological conditions and can overcome safety limitations such as immunogenicity. The scarce humoral immunogenicity and high stability found with AVLPs suggest that they have potential to be used as stealth non-viral gene delivery systems for *in vivo* studies or gene therapy.

1. Introduction

Gene therapy is still hindered by the need of safe delivery systems [1,2]. Moreover, in some cases, transgene expression decreases over long-term periods which might hinder repeated vector administrations [3,4]. Thus, overcoming the immunogenic response against the vectors represents a major challenge [5–7]. Up to date, viral vectors (VVs) are the only option approved by regulatory entities such as FDA or EMA to deliver complete genes for therapeutic purposes due to their high delivery efficiency [8,9]; however, their immunotoxicity severely limits their therapeutic use in humans [6,10–14]. The pre-existence or induction of neutralizing antibodies and undesired allergic reactions have resulted in the death of a patient [15–17]. This fact clearly indicates that special care is required in both, the efficiency and safety of the gene delivery vectors and particularly on their immunoreactivity.

On the other hand, non-viral vectors (nVVs) offer some advantages

over VVs. They do not present risks of random insertions into the host genome and tumorigenesis and have less restrictions in nucleic acid type and size that they can incorporate. Moreover, the simple and modular design of some nVVs allows optimization by the incorporation or modification of biocompatible and low immunogenic components [18]. All this makes nVVs a safer alternative than VVs, specially suitable for applications that need repeated administrations [19]. On the other hand, nVVs are usually less efficient than VVs at delivering genes, because they do not bypass the intracellular barriers as VVs do. However, to gain efficiency, nVVs can be conjugated with functional blocks such as ligands for targeting receptors or membrane disturbing blocks for cell penetration and endosomal escape [20]. Moreover, strategies to increase the efficiency of nVVs often result in augmented cytotoxicity and immunogenicity and/or a decrease on cell specificity, which overall reduces their safety.

Design of nVVs that mimic some viral properties has been proposed

* Corresponding author.

E-mail address: armandohg@iquimica.unam.mx (A. Hernandez-Garcia).

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112348>

Received 22 February 2021; Received in revised form 13 July 2021; Accepted 24 July 2021

Available online 30 July 2021

0928-4931/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

as an alternative to optimize nVVs [21–25]. Recently, a family of *de novo* and modularly designed proteins that mimic the assembly and structural properties of Tobacco Mosaic Virus coat protein have been reported [26–28]. These proteins were rationally designed by fusing independent functional polypeptide blocks into a single polypeptide chain. These polypeptides were termed as “C-S-B” proteins alluding at each of their blocks that mimic different viral coat protein properties: colloidal stability (C), cooperative self-assembly (S) and binding to nucleic acids (B). First, colloidal stabilization, is a property provided by the C block, a very hydrophilic collagen-like (GXY)_n sequence, which forms a superficial corona around the particles. Second, viral coat proteins self-assemble into macromolecular complexes by specific interactions within the capsomers, mostly in a cooperative fashion. In this case, the S block, is produced by a silk-like motif (GAGAGAGQ)_n which cooperatively self-assembles into nanorods [29]. And third, viral proteins must interact with the viral genome to assemble, this is mostly done by electrostatic interactions. Thus, the B block, produced by 12 lysins, interacts electrostatically with nucleic acids. The combination of these three blocks generates elongated nanostructures similar to rod-shaped viruses. Previous reports have shown the potential application of these AVLPs in gene delivery. AVLPs formed with these proteins delivered nucleic acids *in vitro* into HeLa cells and protozoa [30,31]. Moreover, they showed negligible cytotoxicity and hemolytic activity. Here, we studied AVLPs stability and immunogenicity in order to forward these particles for future gene delivery applications.

The delivery efficiency is severely affected by vector stability. The vector must be stable enough to protect the nucleic acid until it is delivered into the cells, then, the vector must release its cargo to carry out its function. As most of the nVVs rely on electrostatic interaction between the gene delivery system and the nucleic acid, anionic glycosaminoglycans may compete with the nucleic acid, impeding the transport towards the targeted cell and limiting cellular uptake [32]. In fact, nVVs formed by distinct types of cationic polymers such as peptides, chitosan, polyurethane and polyethyleneimine (PEI) have shown different grades of meta-stability against anionic glycosaminoglycans including heparin [32–36]. This is an important characteristic for *in vitro* and *in vivo* applications, thus, AVLPs stability characterization against polyanions and in relevant biological media is required.

Immunogenicity is other important aspect that can severely limit the delivery capacity of a vector. Stimulating an immune response is tightly linked to the biophysicochemical properties of the vector [37–39]. Previous studies have shown how nVVs can elicit low immune responses when administered *in vivo* [40]. Moreover, strategies such as chemical modification of the nucleic acids and particle coating with stealth blocks such as polyethylene glycol (PEG) and human cell-derived membranes can diminish their immune response [14,41,42]. However, some concerns about the use of PEG have arisen recently as it induces humoral response and accelerates vector clearance after repeated administrations [43,44]. Furthermore, there is broad evidence of highly immunogenic nVVs that are used in vaccine design rather than for gene therapy due to their adjuvant activity [45,46]. Moreover, AVLPs are non-human and can be prone to stimulate the immune system.

In the present study we evaluated the *in vitro* stability of the AVLPs in heparin and cell culture media supplemented with fetal bovine serum (FBS). Additionally, we tested the humoral immune response of our AVLPs *in vivo* using a mice model. We focused on the determination of humoral immune response, as this can severely limit the gene delivery efficiency of the vector. Moreover, this is the first time that the same study compares the humoral response of a nVV to a VV (Adeno-associated virus, AAV) that has been already approved for human use by regulatory entities. The study provides solid evidence of the safety and stability of the AVLPs that could be harnessed in further *in vivo* delivery studies.

2. Materials & methods

2.1. Production of recombinant proteins

Recombinant strains of GS115 *Komagataella phaffii* (previously known as *Pichia pastoris*) were used for the biosynthesis of the proteins C₄-B_{K12} and C₄-S₁₀-B_{K12} as previously reported [26]. Briefly, proteins were collected from the clarified cell culture supernatant and purified by serial fractional precipitation with 50% of ammonium sulfate (Sigma-Aldrich), and 40 and 80% of acetone (Alta Pureza Maquiladora, Mexico). Dialyzed and lyophilized proteins were stored in sealed tubes at –20 °C. Purity and integrity of recombinant proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectroscopy.

2.2. Preparation of AVLPs

Lyophilized proteins were dissolved in Mili-Q water at 3 µg/µL for C₄-S₁₀-B_{K12} and 4 µg/µL for C₄-B_{K12}. Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich, Saint Louis Mo, USA) at 0.1 mM final concentration was added to C₄-S₁₀-B_{K12} stock solution before its use and heated at 70 °C for 10 min to promote complete dissolution into monomers [29]. AVLPs were formed by mixing stock solutions of plasmid (pAcGFP1-N1 4.7 kpb, Clontech, CA) or antisense DNA oligonucleotide (5'-GTCCCTCCCTTTCGGTGTGT-3', Integrated DNA Technologies; San Diego, CA) with proteins at different NP ratio (molar ratio between positively charged groups (N) of protein B block and the negatively-charged phosphate groups (P) of the DNA template) in HEPES buffer (Gold Biotechnology) 10 mM pH 7.4. Typically, 10 ng/µL of pDNA were used during the AVLP preparation. Mixtures were incubated overnight at room temperature.

2.3. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Samples were mixed with 6× loading buffer (Thermo Fisher) and loaded in a 0.8% agarose gel (Life Technologies, Canada) for electrophoresis. All electrophoresis gels were run for 1 h at 90 V using 1× TAE buffer pH 8.0 (Thermo Fisher Scientific, MA). DNA bands were visualized using SYBR Safe DNA Gel stain (CA, USA) and an Azure c300 Imaging System (CA, USA) using epi-blue fluorescence filter. Relative fractions of free or coated DNA were measured by means of the intensity of the bands of interest and compared to the intensity of the control using the software *ImageJ*.

2.4. Morphological characterization of ALPs

Morphological characterization of AVLPs was carried out using Atomic Force Microscopy (AFM) with a MultiMode 8-H (Bruker, MA, USA). Typically, 5 µL of samples containing 1 ng/µL of DNA were deposited onto freshly cleaved mica samples discs and incubated for 5 min, washed with 500 µL of Mili-Q water and dried with air stream. Imaging was performed using *ScanAsyst* mode, at a scanning rate between 750 and 1000 Hz and 500–1000 samples/line on an area of 5 × 5 µm. First-order flattened images were processed and analyzed with NanoScope Analysis 1.8.

2.5. Hydrodynamic diameter and surface zeta potential of AVLPs

Hydrodynamic diameter (D_H) and surface zeta potential of AVLPs were measured by dynamic light scattering (DLS). Samples containing 2 × 10⁹ pDNA copies/µL or 1 µg/µL of AVLPs protein alone or with pDNA (NP = 3) in PBS (pH 7.4) were measured using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, United Kingdom). Reported values are the average of three measurement of at least 13 runs each at 25 °C using a backscatter angle of 173°.

2.6. Stability of AVLPs in different media

Stability of AVLPs was tested in presence of the anionic polymer heparin and in cell culture media. Heparin (0–8 ng/ μ L, Pisa, Mexico) or culture media (Opti-MEM, DMEM, or DMEM +5, 10 or 20% FBS or FBS 100%, Gibco, Life Technologies) were mixed 1:1 with previously prepared AVLPs (100 ng of pDNA at NP = 3) and then incubated at 37 °C for 30 min (heparin) or 24 h (media). Samples were loaded into a 0.8% agarose gel for EMSA analysis. Release control samples were performed to reveal the integrity of the pDNA inside the AVLPs by incubating them with 1.0 ng of heparin per ng of plasmid at 37 °C for 30 min before electrophoresis.

2.7. AAV vectors

AAV vectors pAAV.Syn.GCaMP6s.WPRE.SV40 (AAVa) and the pAAV.Syn.NES-jRGECO1a.WPRE.SV40 (AAVb), kindly provided by Dr. Fatuel Tecuapetla (Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México), were obtained from Addgene, Ma. Both vectors contain the capsid from AAV1, one of the most used viral vectors in gene therapy [47–49]. AAVa was used for immunization experiments, while AAVb was used only for enzyme linked immunosorbent assays (ELISA).

2.8. Quantification of genomic copies in the AVLPs and AAVs

The genomic copies (gc) in AAV particles (AAVs) or AVLPs were quantified using quantitative PCR (qPCR) of the gene coding for the enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP). eGFP is present in the 5.9 kb genome of AAVa and the plasmid pAcGFP1-N1 used for the preparation of the AVLPs. Previous to the qPCR, AAVa samples were treated with DNase I (New England Biolabs, MA USA) according to manufacturer's protocol. The pDNA of AVLPs samples was purified using phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, Invitrogen) extraction followed by ethanol precipitation. Forward and reverse primers 5' ATGGTGAGCAAGGGCG 3' and 5' CACGCTGAACCTGTGGC 3', respectively, were designed for the amplification of a 117 pb fragment from the eGFP gene. qPCR was performed according to manufacturer's instructions. Briefly, reactions containing 1 \times SYBR supermix (BioRad), 0.1 μ M of each primer and sample diluted in nuclease free water were processed in PCR plates and a Bio-Rad CFX96™ thermocycler. The qPCR protocol consisted of an initial step of denaturation at 95 °C for 10 min followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing/extension at 60 °C for 30 s. A standard curve of DNA from the plasmid pAcGFP1-N1 was used for DNA quantification. Samples were analyzed in duplicated. Data analysis was carried out by using the Bio-Rad CFX Manager 3.1 Software [50].

2.9. Total protein quantification by BCA protocol

Total protein quantification of AAVs and AVLPs was done by a Micro BCA™ Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, IL USA). A modification to the test tube protocol was implemented to reduce the amount of sample used. Briefly, 25 μ L of the sample solution was mixed with 25 μ L of working reagent solution. The remaining procedure followed the manufacturer's specifications.

2.10. Animal welfare and mice immunization

We performed independent experiments consisting of six groups ($n = 3$ or 5) of 6 to 8-week-old female BALB/c mice obtained from biotarium of the Instituto de Fisiología Celular-UNAM (IFC-UNAM). All the mice groups were isolated in filtered air boxes and maintained with water and food *ad libitum* during all the experiments according to the protocol number LVD138-18 approved by the Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL) of the IFC-UNAM. Prior to intramuscular immunization, the solution containing the AVLPs were diafiltrated using a 30 kDa MWCO Vivaspin column of

polyethersulfone (Sartorius, CA, USA) to remove excess of monomeric protein in samples. First, we evaluated the production of specific antibodies comparing same doses of genomic copies of the DNA of interest. Thus, mice groups ($n = 5$) were immunized once with 10^{10} genomic copies contained in AVLPs or AAVa as determined by qPCR. Then, we compared the specific antibodies production when same doses of mass of protein are used. Here, mice groups ($n = 5$) were immunized once with 50 ng of total protein from AAVa or AVLPs in PBS determined by BCA. Finally, we studied the humoral immune response of the AVLPs in a high dose regimen. Six mice groups ($n = 3$) were immunized with 50 μ g of total protein coming from AVLPs prepared with C₄-S₁₀-B_{K12} or C₄-B_{K12} and ASO. A boost of the same dose was given two weeks later. Control mice groups were immunized with AVLPs or AAVa carrying pDNA or ASO with adjuvant co-administration based on aluminum hydroxide (Alhydrogel adjuvant from Invivogen). In all experiments, blood samples were taken immediately before immunization and each two weeks. Sera were collected by centrifugation at 3000 \times g for 15 min and stored at –70 °C until their analysis.

2.11. ELISA for the detection of specific antibodies against AVLPs and AAVs

96-well polystyrene microplates were coated overnight with 50 μ L of suspension containing 1 μ g/mL of C₄-S₁₀-B_{K12} or 0.1 μ g/mL of AAVb. These concentrations were chosen to have high sensitivity as well as to give similar absorbance as determined by a serial dilution analysis for standardization (see Supplementary data, Fig. S3). Microplates were blocked with 300 μ L of a solution containing 5% of non-fat dry milk and incubated for 1 h at 37 °C. Sera from mice were taken before and after immunization and were analyzed at a 1:100 dilution in PBS with 5% of non-fat dry milk, and 50 μ L of this dilution were placed in each well. Microplates were incubated at 37 °C for 1 h and washed 5 times with 300 μ L of PBS containing Triton X-100 0.2%. Antibody-antigen complexes were detected incubating the microplates with horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C. Microplates were washed again 5 times more and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) was used as a substrate. Plates were incubated for 20 min in darkness and the reaction was stopped with sulfuric acid solution at 0.16 M. HRP activity was measured by reading the absorbance at a wavelength of 450 nm with the ELISA plate reader SkanIt for Multiskan FC 3.1. ELISA positive values were given when the absorbance values were higher than the average of the negative values plus three standard deviations.

2.12. Statistical analysis

The analyses were performed using the GraphPad Prism 8.0.2 software (GraphPad Software, Inc.). Results are shown as the mean \pm standard error of the mean. Statistically significant differences between groups were determined by assuming normal distribution and using a two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results & discussion

3.1. Formation of AVLPs

First, we characterized the formation of AVLPs formed by C₄-S₁₀-B_{K12} or C₄-B_{K12} proteins by analyzing the interaction between pDNA and the proteins by EMSA. Fig. 1 shows the change in the electrophoretic mobility of pDNA when it interacts with increasing amounts of protein. We found that the negative charges of the pDNA are fully neutralized by the proteins forming DNA-protein complexes at a NP = 3 (Fig. 1A). This result agrees with previous reports [51,52]. Thus, further experiments were carried out at NP = 3.

Next, we characterized the topology of the protein-pDNA complexes

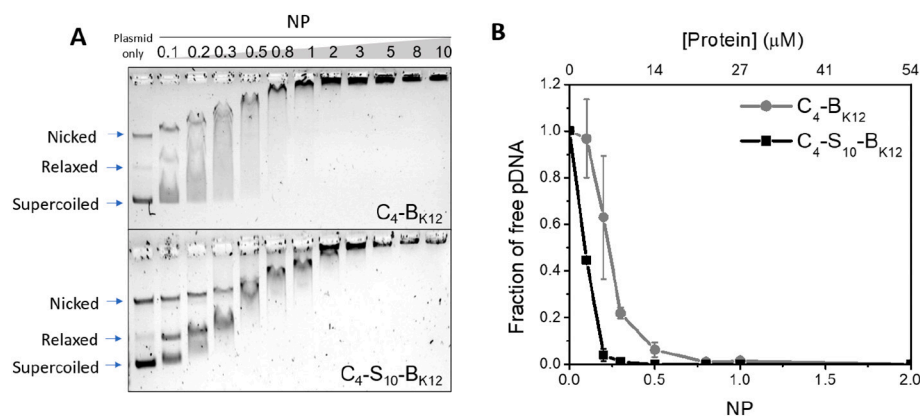


Fig. 1. Formation of the AVLPs. A) EMSA showing the complex formation of pDNA with protein (C_4 - B_{K12} or C_4 - S_{10} - B_{K12}) at different NP ratios. B) Plot of free pDNA fraction relative to total pDNA with respect to the NP used. Band's intensity was measured by densitometry analysis using ImageJ software. Results in B are expressed as means \pm standard error of the mean.

by atomic force microscopy (AFM, Fig. 2). Particles formed by pDNA and C_4 - S_{10} - B_{K12} protein had a rod-like shape (Fig. 2.A, B and C). As shown in Fig. 2.A, we found two populations of nanoparticles with different high-aspect ratio with contour lengths (L_c) of approximately 250 and 475 nm; however, both had a height \approx 3.5 nm (Fig. 2.G and H) [53]. In contrast, particles formed by pDNA and C_4 - B_{K12} protein seem more flexible and similar to naked pDNA (Fig. 2.D and E). They had an average $L_c = 1425$ nm and a height \approx 1.5 nm (Fig. 2.G and H). Since the pDNA $L_c \approx 1600$ nm, in accordance with previous reports, the results suggest that C_4 - B_{K12} protein coats a single pDNA molecule without condensation whereas C_4 - S_{10} - B_{K12} is condensing the pDNA.

The D_H of AVLPs measured by DLS showed a broad distribution in size with at least two peaks ranging from 50 to 950 nm, whereas D_H for pDNA, C_4 - B_{K12} and C_4 - S_{10} - B_{K12} alone was 468.4 ± 90.58 , 11.09 ± 1.704 and 12.62 ± 2.98 nm, respectively (Fig. 2.I). The D_H for the peaks of C_4 - B_{K12} and C_4 - S_{10} - B_{K12} AVLPs were 91 and 342, and 220 and 531 nm, respectively. Note that D_H reflects only the equivalent diameter of a diffusing hard sphere; therefore, it does not reflect the actual size of the AVLPs with rod-like shape. However, the change in the size distribution comparing the proteins and pDNA alone with respect to the AVLPs, clearly indicates the formation of macromolecular complexes.

Moreover, the zeta potential of AVLPs formed in PBS at pH 7.4 by C_4 - B_{K12} and C_4 - S_{10} - B_{K12} proteins were in average -5.8 ± 2.2 mV and -5.8 ± 0.7 mV, respectively. In contrast, pDNA alone has a zeta potential of -20 ± 1.9 mV. Furthermore, AVLPs were slightly more negative than proteins alone (3.4 ± 1.5 mV for C_4 - B_{K12} and -3.2 ± 0.7 mV for C_4 - S_{10} - B_{K12} , Fig. 2.J). All this indicates that the negative charge of the pDNA is neutralized when it is incubated with the proteins. The change in the size distribution of the AVLPs and the neutralization of the negative charge of the pDNA in presence of the C_4 - B_{K12} and C_4 - S_{10} - B_{K12} proteins clearly indicate the formation of AVLPs.

3.2. AVLPs show high stability in biological relevant-media

After characterizing of the formation of AVLPs, we evaluated their stability upon incubation in heparin and culture media. This is relevant since an efficient gene delivery system must prevent extracellular degradation of the nucleic acid cargo previous to cellular uptake. We incubated AVLPs with increasing concentrations of heparin, a highly anionic polymer present in blood serum [54], to compete for the AVLp protein. EMSA allowed us to follow the disassembly of the near-neutral protein-coated DNA (top band) into free and uncoated pDNA (lower band, Fig. 3.A). AVLPs made of C_4 - B_{K12} were completely disassembled above 5.8 ng/ μ L of heparin. In contrast, 20% of the C_4 - S_{10} - B_{K12} AVLPs remained fully assembled when up to 8 ng/ μ L of heparin was added. This indicates that AVLPs can tolerate heparin concentration levels that

are equivalent to over 3 times the heparin concentration in blood (Fig. 3. B) [54].

We conducted further studies to evaluate the effect in the stability of AVLPs after incubation up to 24 h at 37 °C in commonly used cell culture media for growth and transfection of mammalian cells (Opti-MEM, DMEM and DMEM supplemented with FBS). As shown in Fig. 4, for both proteins, no free pDNA was observed when incubated in Opti-MEM or DMEM (Fig. 4.A, B, C, and D). However, when using media supplemented with 5% FBS, a smear was seen for AVLPs formed by C_4 - B_{K12} protein after incubation for at least 12 h (Fig. 4.E). The pDNA released from these AVLPs with a high excess of heparin looks similar to naked pDNA incubated in the same conditions (Fig. 4.E). This means that AVLPs formed by C_4 - B_{K12} protein could not offer protection to pDNA after 12 h of incubation with 5% FBS. On the other hand, AVLPs formed by C_4 - S_{10} - B_{K12} protein did not show liberation nor degradation of pDNA upon 24 h of incubation (Fig. 4.F). The results together indicate that pDNA was stable in both AVLPs formed by C_4 - B_{K12} or C_4 - S_{10} - B_{K12} protein incubated in Opti-MEM or DMEM for 24 h.

Interestingly, AVLPs formed by C_4 - S_{10} - B_{K12} protein protected pDNA against release and degradation in DMEM supplemented with 5% FBS for 24 h. Though, these AVLPs formed by C_4 - S_{10} - B_{K12} protein did not fully protect DNA when incubated with media supplemented with higher FBS percentage after 24 h (Fig. S1). Therefore, attention is required to facilitate the cellular uptake of AVLPs at lower times or to optimize their design to increase their stability. However, note that other nVVs that presented partial stability in 10% FBS could deliver pDNA in *in vivo* studies [34]. All this suggests that C_4 - S_{10} - B_{K12} could be more suitable for *in vivo* gene delivery where the presence of many anionic molecules in natural conditions could induce the disassembly of the AVLPs by unspecific interactions before transfection of the targeted cells.

3.3. AVLPs show reduced humoral response compared to AAVs

Next, we studied the immunogenic response towards AVLPs and AAVs in an *in vivo* murine model (Fig. 5, Table 1). We immunized mice with a single dose of 54.5 ng of protein from each antigen, which is comparable with a low dose range commonly used in gene therapy [55–57]. Interestingly, AVLPs generated a low antibody level, even when adjuvant was co-administrated (Fig. 5.A). In contrast, the same amount of protein coming from AAVa prompted a higher antibody level than the AVLPs.

Since equal mass of protein between AAVs and AVLPs represents at least one order of magnitude lower genomic copies (or particles) for the AVLPs (Table 1), we compared the immune response in the mice after immunization with the same dose of 10^{10} gc of AVLPs or AAVa.

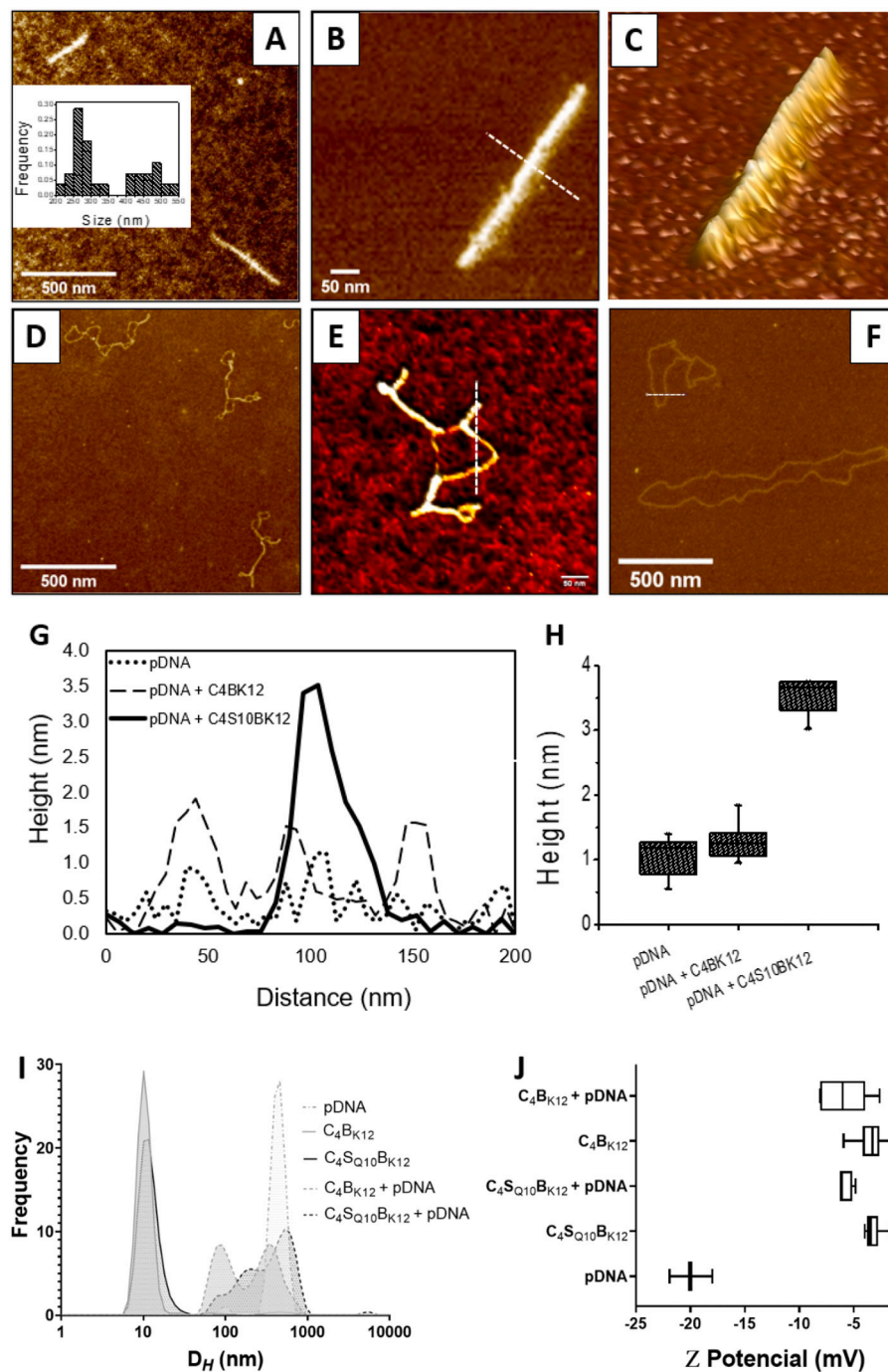


Fig. 2. Morphology, size and surface zeta potential of AVLPs. AFM of: A-C) AVLPs prepared with C_4 -S $_{10}$ -B $_{K12}$ + pDNA. D-E) AVLPs prepared by C_4 -B $_{K12}$ + pDNA. F) pDNA alone. G) Height profiles of AVLPs + pDNA showed in B, E and F. H) Average height of AVLPs. I) D_H of the AVLPs measured by DLS. J) Zeta potential of AVLPs measured by DLS. Results in H and I are expressed as means \pm standard deviation.

Likewise, AAVs prompted a higher level of antibodies than the AVLPs. Indeed, specific antibodies against the AVLPs were not detectable in these conditions (Fig. 5.B). Moreover, the antibody titers against AAVs are comparable (or lower) to those observed in other studies [58].

3.4. High doses of AVLPs induced mild but acceptable humoral responses

In the following studies we decided to immunize the mice with two doses of 50 μ g of AVLp protein without any DNA or carrying an ASO (Fig. 6). These high doses of antigen are typically required to induce a humoral immune response in mice [59]. Surprisingly, also at this high

protein amounts no evident IgG levels were detected with AVLPs of C_4 -B $_{K12}$ + ASO, even in the presence of adjuvant. Interestingly, AVLPs of C_4 -S $_{10}$ -B $_{K12}$ alone and with ASO induced a mild immune response (Fig. 6) with very low titers of 1:400 and 1:200, respectively (Fig. S4).

The mice groups immunized with AVLPs formed by C_4 -S $_{10}$ -B $_{K12}$ alone and with ASO + adjuvant had a notorious immune response with higher antibodies titers of 1:64000 and 1:32000, respectively (Fig. S4). We also noticed that the IgG levels were higher in the sample of C_4 -S $_{10}$ -B $_{K12}$ alone and they decreased when the protein was forming complexes with the ASO. This reduction in the humoral response could be due to a neutralization of the 12 cationic charges present in the binding block B

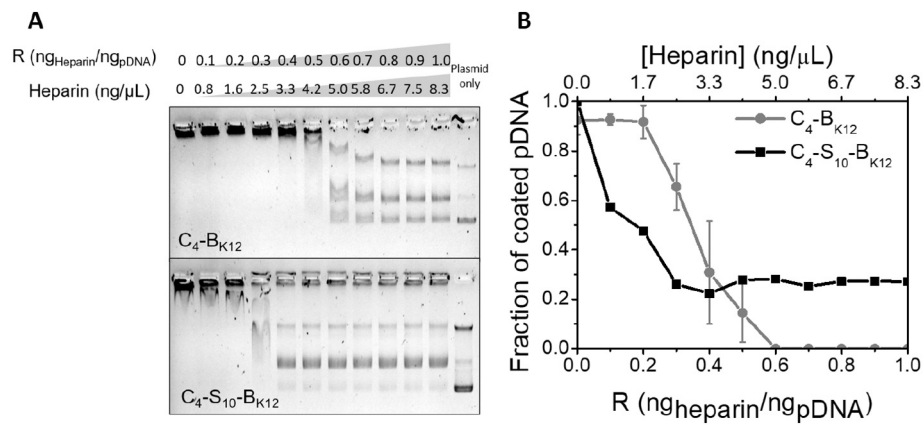


Fig. 3. Stability of AVLPs in the presence of heparin. A) EMSA of the AVLPs prepared with pDNA and the C₄-B_{K12} or the C₄-S₁₀-B_{K12} protein incubated with increasing concentrations of heparin. B) Effect of increasing amounts of heparin over the fraction of coated pDNA in the AVLPs (top band in the EMSA). Results in B are expressed as means ± standard error of the mean.

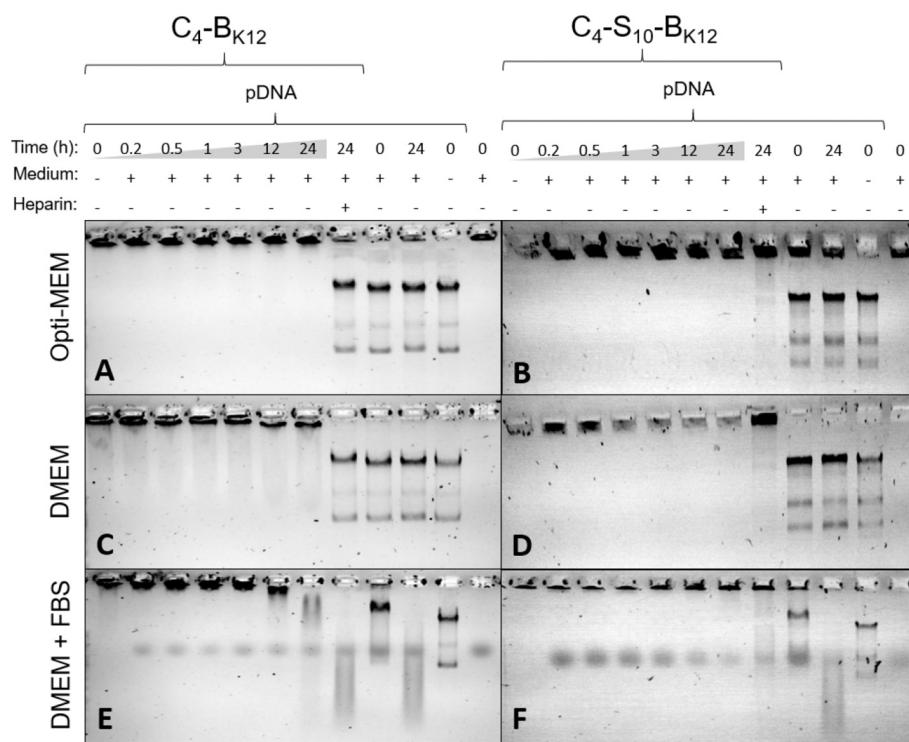


Fig. 4. EMSAs showing stability of AVLPs incubated in different cell culture media at 37 °C. AVLPs prepared with C₄-B_{K12} + pDNA incubated in Opti-MEM (A), DMEM (C) or DMEM + 5% FBS (E). AVLPs prepared with C₄-S₁₀-B_{K12} + pDNA incubated in Opti-MEM (B), DMEM (D) or DMEM + 5% FBS (F). In each EMSA, heparin was used as a control to induce liberation of the pDNA from the AVLPs after the incubation in the media. Controls showing free pDNA in the culture media at 0 or 24 h of incubation, free DNA in buffer and medium alone, are shown.

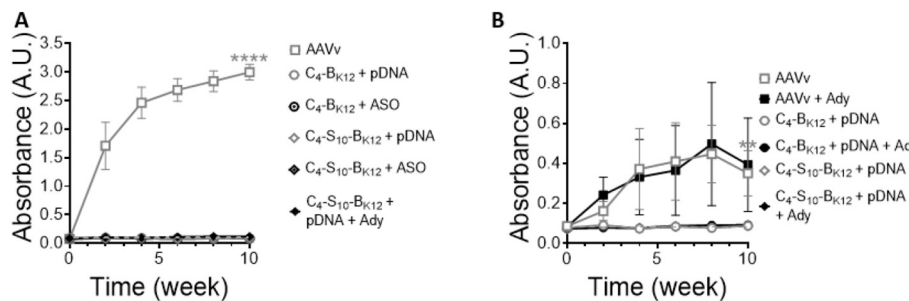


Fig. 5. Measurements of IgG levels against the AVLPs and AAVs in a murine model. ELISAs showing the presence of specific IgG against AAVs or AVLPs in immunized mice sera. A) A single dose of 54.5 ng of total protein was used to immunize mice. B) A single dose containing 10¹⁰ gc was used to immunize mice. Each point represents the average of a group (n = 5). Vertical lines represent the standard error of the mean. Dotted gray line shows the negative/positive threshold. Two-way ANOVA analysis was used for significance and compared against absorbance from pre-immune sera (**p < 0.01, ****p < 0.0001).

of the protein by the ASO. It has been reported that cationic particles can interact with antigen presenter cells, inducing both strong cellular and humoral immune responses [60,61]. Here, although the proteins alone

have a negative surface zeta potential, the B block represents a highly condensed cationic region that might promote its entry to antigen presenting cells. In fact, many natural viruses also have negative values of

Table 1
Doses used in immunization experiments.

Experiment	Fig.	AAVA		AVLPs	
		Protein (ng)	gc ($\times 10^{10}$)	Protein (ng)	gc ($\times 10^{10}$)
Equal protein mass	5.A	54.5 ^a	3 ^b	54.5 ^a	0.1 ^d , 0.09 ^e
Equal genomic copies (gc)	5.B	18.15 ^a	1 ^b	502 ^d , 585 ^e	1 ^b
High dose	6	–	–	5×10^4 ^{c,a}	7.8 ^{c,d} , 6.7 ^{c,e}

^a Total protein mass determined by BCA.

^b gc determined by qPCR.

^c Experiments in which a boost was given two weeks post-immunization.

^d Determined theoretically based on the molecular weight of C₄-B_{K12} and a single protein for each 12 nucleotides.

^e Determined theoretically based on the molecular weight of C₄-S₁₀-B_{K12} and a protein each 12 nucleotides.

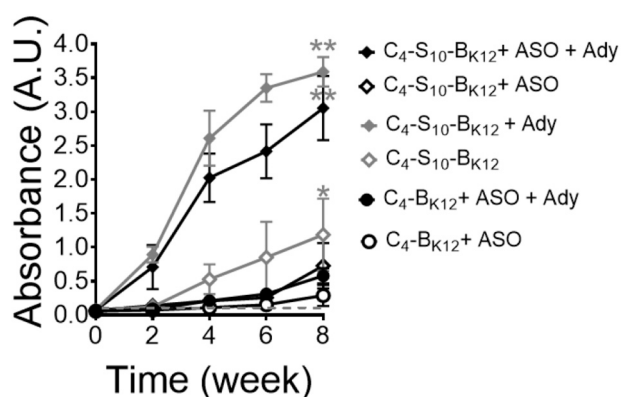


Fig. 6. IgG production against C₄-S₁₀-B_{K12} protein before and after the immunization of high doses of AVLPs in mice. ELISA showing the presence of IgG against AVLPs after the immunization of mice with AVLPs formed with or without ASO. Two doses of 50 μ g of protein from AVLPs or protein alone were used to immunize groups of mice ($n = 3$). Vertical lines represent the standard error of the mean. Dotted gray line shows the negative/positive threshold. Two-way ANOVA analysis was used for significance and compared against pre-immune response ($*p \leq 0.5$, $**p \leq 0.01$).

zeta potentials at neutral pH but are decorated with cationic glycoproteins that facilitate their attachment to the negatively charged membrane of cells [62,63].

It is clear that the AVLPs have a large range of doses in which the humoral immune response is not detected. From an immunogenic perspective, our study suggests that the AVLPs are a potential alternative for *in vivo* gene delivery. The low immunogenicity represents an advantage over other non-viral vectors also. These are the case of polyplexes composed by PEI, which showed adjuvant properties. If used for gene delivery, PEI could induce a non-desired humoral response even to the transgene product [64,65].

3.5. Implications of AVLPL design on humoral response

The low immunogenicity observed in the AVLPs could be due to the presence of the colloidal stability C block in the proteins. First, this block was designed using the collagen-like sequence (GXY)_n, where X and Y are hydrophilic amino acids. However, unlike other collagen-like peptides that form triple-helices [66], the C block is a random coil, making it a singular collagen-like peptide. Despite of this, many studies have reported low immunogenicity of collagen-like biomaterials and biocompatibility [67–69]. Second, it forms a corona around the bound nucleic acid, and hence it is exposed outside of the nanoparticles [70]. And

third, the C block represents a major part of the protein, over 80% of the molecular weight of the proteins corresponds to this block. These properties of the C block could explain the low immunogenic observed with AVLPs.

When we compared C₄-B_{K12} and C₄-S₁₀-B_{K12} proteins, we found that the second one produced higher levels of specific antibodies. This possibly could be due to differences in the morphology of the particle when the S block is present, since silk-like proteins have been previously reported to elicit little to none humoral response [71,72]. Moreover, Western-Blot analysis shows that specific antibodies produced against C₄-S₁₀-B_{K12} cross-reacted with C₄-B_{K12} (Fig. S2), meaning that antibodies could be produced against a common sequence of the AVLPs such as C block, which is forming the corona around the particles. In fact, the S block is known to confer rigidity and compaction to the particles (Fig. 2). These differences in size and shape of the AVLPs might made the C₄-S₁₀-B_{K12} AVLPs more available to antigen presenting cells. All this suggests that particles with differences in morphology, size and other structural features, but not merely its composition and surface charge, could lead to important changes in the immune response.

3.6. Importance of immune response of particles for delivery

In previous studies, other types of AVLPs have also been designed without much attention on immunogenicity [73,74]. Pinnapireddy et al. [73], used the lipidic composition and glycosylation pattern of viral membranes to envelop PEI polyplexes. Although they favored the gene delivery of their particles *in vitro*, their viral mimicry strategy involves the glycosylation pattern as a critical factor for delivery, and because the glycosylation pattern of non-human particles are easily recognized by the immune system, they could have a high immunoreactivity [75]. Like those previous studies, our AVLPs also have shown adequate gene delivery *in vitro* [30,31]. Furthermore, here we provide additional evidence that supports the safe use of our AVLPs in therapeutic purposes. As for many drugs, the therapeutic effect is related to the dose. Thus, and adequate gene delivery efficiency is directly linked to the dose of vector administrated. The maximum dose for human use is regulated by the safety of the drug. The little humoral response of our AVLPs, which is many times lower than that of VVs approved for human use (Fig. 5), implies that our AVLPs have a higher range of doses without safety issues. Nevertheless, low immunogenicity is one of the features desired for gene delivery vectors. Further studies must also consider other factors such optimization of delivery to specific targets.

4. Conclusions

Proteins C₄-B_{K12} and C₄-S₁₀-B_{K12} self-assemble into AVLPs in the presence of different types of nucleic acids. These AVLPs are highly stable in biological relevant media, especially the protein C₄-S₁₀-B_{K12} offers practical protection to the nucleic acid from degradation in medium supplemented with serum. Both proteins, in free state or when forming particles with pDNA or ASO, induce a poor humoral immune response compared to that observed for clinically approved and commercially available gene delivery systems such as AVV1. Moreover, we report the first direct comparison between a viral and an artificially designed non-viral protein vector in terms of their humoral immune response. Although more research is still needed to know their cellular immune response and *in vivo* transfection efficiency, all this data suggests that a smart design of AVLPs based on blocks containing *de novo* amino acid sequences could potentially be used as gene delivery systems for *in vivo* applications without the risk of undesired immune reactions as compared to viral vectors.

CRedit authorship contribution statement

David S. Moreno-Gutierrez designed experiments, produced proteins and prepared materials, performed experiments, analysed results

and wrote manuscript. **Jesús Zepeda-Cervantes** designed experiments, performed experiments, analysed results and wrote manuscript. **L. Vaca** designed experiments, analysed results and wrote manuscript. **A. Hernández-García** supervised project, designed experiments, analysed results and wrote manuscript.

Declaration of competing interest

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

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Fatuel Tecuapetla for providing the AAVs and Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín and Dr. Alicia Sampieri for technical assistance. We thank the financial support for this project by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Atención a Problemas Nacionales 2016, project 2103). David Silverio Moreno-Gutierrez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México and received a doctoral fellowship (CVU: 662246) from CONACyT, México. LV thanks the support from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) to the project AN200920 "Diseño de una vacuna de última generación para coronavirus". JZC thanks the postdoctoral fellowship from DGAPA.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112348>.

References

- [1] Y.K. Sung, S.W. Kim, Recent advances in the development of gene delivery systems, *Biomater. Res.* 23 (2019), <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0156-z>.
- [2] M.G. Katz, A.S. Fargnoli, R.D. Williams, C.R. Bridges, Gene therapy delivery systems for enhancing viral and nonviral vectors for cardiac diseases: current concepts and future applications, *Hum. Gene Ther.* 24 (2013) 914–927, <https://doi.org/10.1089/hum.2013.2517>.
- [3] S. Ferrari, U. Griesenbach, D.M. Geddes, E.A. Uk, Immunological hurdles to lung gene therapy, *Clin. Exp. Immunol.* 132 (2003) 1–8, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02124.x>.
- [4] R.W. Herzog, Encouraging and unsettling findings in long-term follow-up of AAV gene transfer, *Mol. Ther.* 28 (2020) 341–342, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.007>.
- [5] B.E. Jaski, M.L. Jessup, D.M. Mancini, T.P. Cappola, D.F. Pauly, B. Greenberg, K. Borow, H. Dittrich, K.M. Zsebo, R.J. Hajjar, Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial, *J. Card. Fail.* 15 (2009) 171–181, <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2009.01.013>.
- [6] M. Moskalenko, L. Chen, M. van Roey, B.A. Donahue, R.O. Snyder, J.G. McArthur, S.D. Patel, Epitope mapping of human anti-Adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure, *J. Virol.* 74 (2000) 1761–1766, <https://doi.org/10.1128/jvi.74.4.1761-1766.2000>.
- [7] C.D. Scallan, H. Jiang, T. Liu, S. Patarroyo-white, J.M. Sommer, S. Zhou, L. B. Couto, G.F. Pierce, Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice, *Blood.* 107 (2016) 1810–1818, <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3229.Supported>.
- [8] A.N. Lukashov, A.A. Zamyatnin, Viral vectors for gene therapy: current state and clinical perspectives, *Biochem.* 81 (2016) 700–708, <https://doi.org/10.1134/S0006297916070063>.
- [9] M. Mendicino, Y. Fan, D. Griffin, K.C. Gunter, K. Nichols, Current state of U.S. Food and Drug Administration regulation for cellular and gene therapy products: potential cures on the horizon, *Cytotherapy.* 21 (2019) 699–724, <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.04.002>.
- [10] X.M. Anguela, K.A. High, Entering the modern era of gene therapy, *Annu. Rev. Med.* 70 (2019) 273–288, <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>.
- [11] R. Goswami, G. Subramanian, L. Silayeva, I. Newkirk, D. Doctor, K. Chawla, S. Chattopadhyay, D. Chandra, N. Chilukuri, V. Betapudi, Gene therapy leaves a vicious cycle, *Front. Oncol.* 9 (2019) 297, <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00297>.
- [12] C.L. Halbert, T.A. Standaert, M.L. Aitken, I.E. Alexander, D.W. Russell, A.D. Miller, Transduction by adeno-associated virus vectors in the rabbit airway: efficiency, persistence, and readministration, *J. Virol.* 71 (1997) 5932–5941, <https://doi.org/10.1128/jvi.71.8.5932-5941.1997>.
- [13] L. Vannucci, M. Lai, F. Chiuppesi, L. Ceccherini-nelli, M. Pistello, Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology, *New Microbiol.* 36 (2013) 1–22.
- [14] H.S. Zhou, D.P. Liu, C.C. Liang, Challenges and strategies: the immune responses in gene therapy, *Med. Res. Rev.* 24 (2004) 748–761, <https://doi.org/10.1002/med.20009>.
- [15] C.S. Manno, G.F. Pierce, V.R. Arruda, B. Glader, M. Ragni, J.J.E. Rasko, M.C. Ozelo, K. Hoots, P. Blatt, B. Konkle, M. Dake, R. Kaye, M. Razavi, A. Zajko, J. Zehnder, P. K. Rustagi, H. Nakai, M. Sommer, M. Tigges, A. Chew, D. Leonard, J.F. Wright, R. R. Lessard, D. Sabatino, A. Luk, H. Jiang, F. Mingozzi, L. Couto, H.C. Ertl, K. A. High, M.A. Kay, Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-factor IX and limitations imposed by the host immune response, *Nat. Med.* 12 (2006) 342–348, <https://doi.org/10.1038/nm1358>.
- [16] F. Mingozzi, K.A. High, Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges, *Nat. Rev. Genet.* 12 (2011) 341–355, <https://doi.org/10.1038/nrg2988>.
- [17] S.E. Raper, N. Chirmule, F.S. Lee, N.A. Wivel, A. Bagg, G. Gao, J.M. Wilson, M. L. Batshaw, Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer, *Mol. Genet. Metab.* 80 (2003) 148–158, <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.08.016>.
- [18] D.W. Pack, A.S. Hoffman, S. Pun, P.S. Stayton, Design and development of polymers for gene delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 581–593, <https://doi.org/10.1038/nrd1775>.
- [19] R.M. Blaese, K.W. Culver, A.D. Miller, C.S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. Chiang, P. Tolstoshev, J.J. Greenblatt, S.A. Rosenberg, H. Klein, M. Berger, C.A. Mullen, W.J. Ramsey, L. Muul, R.A. Morgan, W.F. Anderson, T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years, *Science* (80-). 270 (1995) 475–480. doi:<https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475>.
- [20] M.E. Morrey, P.A. Anderson, G. Chambers, R. Paul, Optimizing nonviral-mediated transfection of human intervertebral disc chondrocytes, *Spine J.* 8 (2008) 796–803, <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2007.05.010>.
- [21] E. Mastrobattista, M. van der Aa, W.E. Hennik, D.J.A. Crommelin, Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 115–121.
- [22] P. Lehn, S. Fabrega, N. Oudrhiri, J. Navarro, Gene delivery systems: bridging the gap between recombinant viruses and artificial vectors, *Adv. Drug Deliv.* 30 (1998) 5–11, [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00102-6).
- [23] S.D. Li, L. Huang, Non-viral is superior to viral gene delivery, *J. Control. Release* 123 (2007) 181–183, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.004>.
- [24] G.F. Walker, C. Fella, J. Pelisek, J. Fahrmeir, S. Boeckle, M. Ogris, E. Wagner, Toward synthetic viruses: endosomal pH-triggered deshielding of targeted polyplexes greatly enhances gene transfer in vitro and in vivo, *Mol. Ther.* 11 (2005) 418–425, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.11.006>.
- [25] M. Somiya, Q. Liu, S. Kuroda, Current progress of virus-mimicking nanocarriers for drug delivery, *Nanotechnology.* 1 (2017) 415–429, <https://doi.org/10.7150/ntno.21723>.
- [26] A. Hernandez-Garcia, D.J. Kraft, A.F.J. Janssen, P.H.H. Bomans, N.A.J. M. Sommerdijk, D.M.E. Thies-weesie, M.E. Favretto, R. Brock, F.A. De Wolf, M.W. T. Werten, P. Van Der Schoot, M.C. Stuart, R. De Vries, Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viral particles, *Nat. Nanotechnol.* (2014) 1–5, <https://doi.org/10.1038/nnano.2014.169>.
- [27] A. Hernandez-Garcia, N.A. Estrich, M.W.T. Werten, J.R.C. Van Der Maarel, T. H. LaBeau, F.A. De Wolf, M.A. Cohen Stuart, R. De Vries, Precise coating of a wide range of DNA templates by a protein polymer with a DNA binding domain, *ACS Nano* 11 (2017) 144–152, <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b05938>.
- [28] A. Hernandez-Garcia, M.W.T. Werten, M.C. Stuart, F.A. de Wolf, R. De Vries, Coating of single DNA molecules by genetically engineered protein diblock copolymers, *Small.* 8 (2012) 3491–3501, <https://doi.org/10.1002/sml.201200939>.
- [29] E.C. Vargas, A.C. Stuart, R. De Vries, A. Hernandez-garcia, Template-free self-assembly of artificial de novo viral coat proteins into nanorods: effects of sequence, concentration, and temperature, *Chem. Eur. J.* 25 (2019) 1–9, <https://doi.org/10.1002/chem.201901486>.
- [30] R.E. Cárdenas-Guerra, D.S. Moreno-Gutierrez, O. de J. Vargas-Dorantes, B. Espinoza, A. Hernandez-Garcia, Delivery of antisense DNA into pathogenic parasite Trypanosoma cruzi using virus-like protein-based nanoparticles, *Nucleic Acid Ther.* 00 (2020) 1–10, <https://doi.org/10.1089/nat.2020.0870>.
- [31] S. Jekhmane, R. De Haas, O.P. da Silva Filho, A.H. Van Asbeck, M.E. Favretto, A. Hernandez-Garcia, R. Brock, R. De Vries, Virus-like particles of mRNA with artificial minimal coat proteins: particle formation, stability, and transfection efficiency, *Nucleic Acid Ther.* 00 (2017) 1–9, <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0660>.
- [32] S. Danielsen, S. Strand, C. De Lange, T. Stokke, Glycosaminoglycan destabilization of DNA – chitosan polyplexes for gene delivery depends on chitosan chain length and GAG properties, *Biochem. Biophys. Acta.* 1721 (2005) 44–54. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.10.011>.
- [33] S. Lu, V.B. Morris, V. Labhasetwar, Codelivery of DNA and siRNA via arginine-rich PEI-based polyplexes, *Mol. Pharm.* 2 (2015) 621–629, <https://doi.org/10.1021/mp5006883>.
- [34] S.R. Pinnipireddy, J. Giselbrecht, B. Strehlow, C. Janich, C. Husteden, A. Meister, H. Loppnow, D. Sedding, F. Erdmann, G. Hause, G. Brezesinski, T. Groth, A. Langner, U. Bakowsky, C. Wölk, A triple polycation peptide-mimicking amphiphile - efficient DNA-transfer without co-lipids, *Biomater. Sci.* 8 (2020) 232–249, <https://doi.org/10.1039/c9bm01093a>.
- [35] L. Zhou, Y. Xi, M. Yu, M. Wang, Y. Guo, P. Li, P.X. Ma, B. Lei, Highly antibacterial polypeptide-based amphiphilic copolymers as multifunctional non-viral vectors for

- enhanced intracellular siRNA delivery and anti-infection, *Acta Biomater.* 58 (2017) 90–101, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.010>.
- [36] B. Lou, R. Jin, J. Cheng, X. Wen, P. Zhao, C. Lin, A hierarchical assembly strategy to engineer dextran-enveloped polyurethane nanopolyplexes for robust ovarian cancer gene therapy, *Acta Biomater.* (2018) 1–14, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.049>.
- [37] D.F. Moyano, M. Goldsmith, D.J. Sölflied, D. Landesman-milo, O.R. Miranda, D. Peer, V.M. Rotello, Nanoparticle hydrophobicity dictates immune response, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 3965–3967, <https://doi.org/10.1021/ja2108905>.
- [38] M. Urello, W. Hsu, R.J. Christie, Peptides as a material platform for gene delivery: emerging concepts and converging technologies, *Acta Biomater.* 117 (2020) 40–59, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.027>.
- [39] B. Gantenbein, S. Tang, J. Guerrero, N. Higuera-castro, A.I. Salazar-Puerta, A. S. Croft, A. Gazdhar, D. Purmessur, Non-viral gene delivery methods for bone and joints, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020), 598466, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.598466>.
- [40] H. Hatakeyama, H. Akita, E. Ito, Y. Hayashi, M. Oishi, Y. Nagasaki, R. Danev, K. Nagayama, N. Kaji, H. Kikuchi, Y. Baba, H. Harashima, Biomaterials systemic delivery of siRNA to tumors using a lipid nanoparticle containing a tumor-specific cleavable PEG-lipid, *Biomaterials.* 32 (2011) 4306–4316, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.045>.
- [41] F.M. Veronese, A. Mero, The impact of PEGylation on biological therapies, *Biodrugs.* 22 (2008) 315–329.
- [42] T. Malachowski, A. Hassel, Engineering nanoparticles to overcome immunological barriers for enhanced drug delivery, *Eng. Regen.* 1 (2020) 35–50, <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2020.06.001>.
- [43] K. Shiraishi, M. Yokoyama, Toxicity and immunogenicity concerns related to PEGylated-micelle carrier systems: a review, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 20 (2019) 324–336, <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1590126>.
- [44] T. Ishida, M. Ichihara, X.Y. Wang, K. Yamamoto, J. Kimura, E. Majima, H. Kiwada, Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes, *J. Control. Release* 112 (2006) 15–25, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.01.005>.
- [45] S. Chattopadhyay, J. Chen, H. Chen, C.J. Hu, Nanoparticle vaccines adopting virus-like features for enhanced immune potentiation, *Nanotheranostics.* 1 (2017) 244–260, <https://doi.org/10.7150/ntno.19796>.
- [46] F. Boato, R.M. Thomas, A. Ghasparian, A. Freund-renard, K. Moehle, J. A. Robinson, Synthetic virus-like particles from self-assembling coiled-coil lipopeptides and their use in antigen display to the immune system, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 9015–9018, <https://doi.org/10.1002/anie.200702805>.
- [47] F. Mingozzi, J.J. Meulenberg, D.J. Hui, E. Basner-tschakarjan, N.C. Hasbrouck, S. A. Edmonson, N.A. Hutnick, M.R. Betts, J.J. Kastelein, E.S. Stroes, K.A. High, AAV-1 – mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells, *Blood.* 114 (2009) 2077–2087, <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-167510.An>.
- [48] D. Gaudet, J. Me, J. Kastelein, Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency, *Curr. Opin. Lipidol.* 23 (2012) 310–320, <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283555a7e>.
- [49] W. Xiao, N. Chirmule, S.C. Berta, G. Gao, J.M. Wilson, B.M.C. Cullough, Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1 gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1, *J. Virol.* 73 (1999) 3994–4003, <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.3994-4003.1999>.
- [50] C. Aurnhammer, M. Haase, N. Muether, M. Hausl, C. Rauschhuber, I. Huber, H. Nitschko, U. Busch, A. Sing, A. Ehrhardt, A. Baiker, Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences, *Hum. Gene Ther. Methods.* 23 (2012) 18–28, <https://doi.org/10.1089/hgtb.2011.034>.
- [51] W.J. Kim, J.W. Yockman, M. Lee, J.H. Jeong, Y.H. Kim, S.W. Kim, Soluble Flt-1 gene delivery using PEI-g-PEG-RGD conjugate for anti-angiogenesis, *J. Control. Release* 106 (2005) 224–234, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.04.016>.
- [52] G. Osman, J. Rodriguez, S.Y. Chan, J. Chisholm, G. Duncan, N. Kim, A.L. Tatler, K. M. Shakesheff, J. Hanes, J.S. Suk, J.E. Dixon, PEGylated enhanced cell penetrating peptide nanoparticles for lung gene therapy, *J. Control. Release* 285 (2019) 35–45, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.07.001>. PEGylated.
- [53] A. Klug, The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly, *Philos. Trans.: Biol. Sci.* 354 (1999) 531–535.
- [54] B.H. Engelberg, Plasma heparin levels in normal man, *Circulation XXIII* (2015) 578.
- [55] J.D. Harris, S. Schepelmann, T. Athanasopoulos, I.R. Graham, A.K. Stannard, Z. Mohri, V. Hill, D.G. Hassall, J.S. Owen, G. Dickson, Inhibition of atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice following muscle transduction with adeno-associated virus vectors encoding human apolipoprotein-E, *Gene Ther.* 9 (2002) 21–29, <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301615>.
- [56] A. Delluc-Clavières, C. Le Bec, L. Van den Berghe, C. Conte, V. Allo, O. Danos, A. C. Prats, Efficient gene transfer in skeletal muscle with AAV-derived bicistronic vector using the FGF-1 IRES, *Gene Ther.* 15 (2008) 1090–1098, <https://doi.org/10.1038/gt.2008.49>.
- [57] P.D. Kessler, G.M. Podsakoff, X. Chen, S.A. McQuiston, P.C. Colosi, L.A. Matelis, G. J. Kurtzman, B.J. Byrne, Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 14082–14087, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.14082>.
- [58] V. Anand, B. Duffy, Z. Yang, N.S. Dejneka, A.M. Maguire, J. Bennett, A deviant immune response to viral proteins and transgene product is generated on subretinal administration of adenovirus and adeno-associated virus, *Mol. Ther.* 5 (2002) 125–132, <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0525>.
- [59] F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology*: Preface, 2010, <https://doi.org/10.1002/0471142727.mbpref66>.
- [60] A. Caputo, K. Sparnacci, B. Ensolì, L. Tondelli, Functional polymeric nano/microparticles for surface adsorption and delivery of protein and DNA vaccines, *Curr. Drug Deliv.* 5 (2008) 230–242, <https://doi.org/10.2174/156720108785914961>.
- [61] X. Chen, Y. Liu, L. Wang, Y. Liu, W. Zhang, B. Fan, X. Ma, Q. Yuan, G. Ma, Z. Su, Enhanced humoral and cell-mediated immune responses generated by cationic polymer-coated PLA microspheres with adsorbed HBsAg, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 1772–1784, <https://doi.org/10.1021/mp400597z>.
- [62] B. Michen, T. Graule, Isoelectric points of viruses, *J. Appl. Microbiol.* 109 (2010) 388–397, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04663.x>.
- [63] F. Penin, C. Combet, G. Germanidis, P. Frainais, G. Dele, I. De Biologie, Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment, *J. Virol.* 75 (2001) 5703–5710, <https://doi.org/10.1128/JVI.75.12.5703>.
- [64] C. Shen, J. Li, Y. Zhang, Y. Li, G. Shen, J. Zhu, J. Tao, Polyethylenimine-based micro/nanoparticles as vaccine adjuvants, *Int. J. Nanomedicine* 12 (2017) 5443–5460, <https://doi.org/10.2147/IJN.S137980>.
- [65] F. Wegmann, K.H. Gartlan, A.M. Harandi, S.A. Brinckmann, W.R. Hillson, W. L. Kok, S. Cole, L. Ho, T. Lambe, M. Puthia, C. Svanborg erin M. Scherere, G. Krashias, A. Williams, J.N. Blattman, P.D. Greenberg, R.A. Flavell, A. Moghaddam, N.C. Sheppard, Q.J. Sattentau, Polyethylenimine is a potent mucosal adjuvant for glycoproteins with innate and adaptive immune activating properties, *Nat. Biotechnol.* 30 (2013) 883–888, <https://doi.org/10.1038/nbt.2344>. Polyethylenimine.
- [66] S. Gorgieva, V. Kokol, Biomaterials and their biocompatibility: review and perspectives, *Biomater. Appl. Nanomed.* (2011), <https://doi.org/10.5772/24118>.
- [67] G. Charriere, M. Bejot, L. Schnitzler, G. Ville, D.J. Hartmann, Reactions to a bovine collagen implant, *Am. Acad. Dermat.* 21 (1989) 1203, [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(89\)70330-3](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(89)70330-3).
- [68] Z. Yu, B. An, J.A.M. Ramshaw, B. Brodsky, Bacterial collagen-like proteins that form triple-helical structures, *J. Struct. Biol.* 186 (2014) 451–461, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.01.003>.
- [69] D.I. Rozkiewicz, Y. Kraan, M.W.T. Werten, F.A. De Wolf, V. Subramaniam, J. Ravoo, D.N. Reinhoudt, Covalent microcontact printing of proteins for cell patterning, *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 6290–6297, <https://doi.org/10.1002/chem.200501554>.
- [70] M. Marchetti, D. Kamsma, E. Cazaes Vargas, A. Hernandez García, P. Van Der Schoot, R. De Vries, G.J.L. Wuite, W.H. Roos, Real-time assembly of viruslike nucleocapsids elucidated at the single-particle level, *Nano Lett.* 19 (2019) 5746–5753, <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02376>.
- [71] Charu Vepari, David L. Kaplan, Silk as biomaterial, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 991–1007, <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. Investigations.
- [72] M. Dewair, X. Baur, K. Ziegler, Use of immunoblot technique for detection of human IgE and IgG antibodies to individual silk proteins, *J. Allergy Clin. Immunol.* 76 (1985) 537–542, [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(85\)90772-9](https://doi.org/10.1016/0091-6749(85)90772-9).
- [73] S.R. Pinnapireddy, M. Raafat, E. Assy, P. Schlote, U. Bakowsky, Glycosylated artificial virus-like hybrid vectors for advanced gene delivery, *Polymers (Basel)* 11 (2019) 243, <https://doi.org/10.3390/polym11020243>.
- [74] L. Tönges, P. Lingor, R. Egle, G.P.H. Dietz, A. Fahr, M. Bähr, Stearylated octaarginine and artificial virus-like particles for transfection of siRNA into primary rat neurons, *RNA.* 12 (2006) 1431–1438, <https://doi.org/10.1261/rna.2252206.effects>.
- [75] I. Bagdonaite, H.H. Wandall, Global aspects of viral glycosylation, *Glycobiology.* 28 (2018) 443–467, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy021>.

Programming the Cellular Uptake of Protein-Based Viromimetic Nanoparticles for Enhanced Delivery

David S. Moreno-Gutierrez, Ximena del Toro-Ríos, Natalia J. Martinez-Sulvaran, Mayra B. Perez-Altamirano, and Armando Hernandez-Garcia*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01295>



Read Online

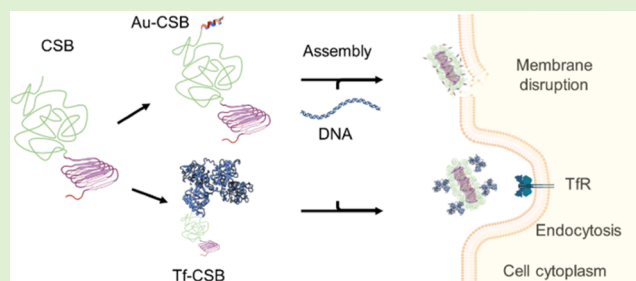
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Viral mimetics is a noteworthy strategy to design efficient delivery systems without the safety drawbacks and engineering difficulties of modifying viral vectors. The triblock polypeptide CSB was previously designed *de novo* to self-assemble with DNA into nanocomplexes called artificial virus-like particles (AVLPs) due to their similarities to viral particles. Here, we show how we can incorporate new blocks into the CSB polypeptide to enhance its transfection without altering its self-assembly capabilities and the stability and morphology of the AVLPs. The addition of a short peptide (aurein) and/or a large protein (transferrin) to the AVLPs improved their internalization and specific targeting to cells by up to 11 times. Overall, these results show how we can further program the cellular uptake of the AVLPs with a wide range of bioactive blocks. This can pave the way to develop programmable and efficient gene delivery systems.



INTRODUCTION

The growing number of gene therapies and genetic vaccines approved by regulatory entities, such as the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicine Agency (EMA), indicates that there is a high demand for novel tools to effectively deliver nucleic acids into cells.^{1,2} While there is a wide variety of types of particles designed for this purpose, viral vectors are still considered the main option. This is because they offer high efficiency to get into the cells and reach high levels of expression of the gene of interest.² However, there are important safety limitations that, in certain cases, can severely hinder their use. For example, some viruses can trigger undesired immune reactions or randomly insert the transgene into the host genome, which could be tumorigenic.^{3–5} Furthermore, viral particles have limited tolerance to be engineered. Modifications to viral structural proteins, such as point mutations or domain indels, frequently result in the loss of their functions, interference to assemble into capsids, or particles with lower stability.^{6–12} Moreover, viral vectors have some restrictions regarding the nucleic acid type and length they can deliver, and they often require specific packaging signals.^{13–15}

Viromimetics is an alternative to develop gene delivery systems that try to imitate viruses to preserve their delivery advantages and attend to their safety drawbacks. Virus-inspired vectors are designed to imitate viral properties such as self-assembly, nanometric size, protection of the genetic cargo against enzymatic degradation, cell targeting, etc.¹⁶ Viromimetic vectors can be built from lipids, polymers, dendrimers,

and polypeptides.^{17,18} However, the use of polypeptides offers the possibility to manipulate important physical properties such as surface charge, hydrophobicity, geometry, and structure by controlling their amino acid sequence.¹⁹ Moreover, polypeptide-based vectors offer high biocompatibility, biodegradability, and stability and can be produced recombinantly with high yields using low-cost raw materials.²⁰

One attractive alternative for the design of artificial capsids is to use virus-like nanocages as building blocks. Examples of these particles that can encapsulate nucleic acids have been obtained through directed evolution, rational design, and protein engineering.^{21–23} However, these studies demand high resources to predict *in silico* the structure of the particles and to experimentally evolve the proteins. Moreover, their possibility to be used as delivery vectors remains to be determined. On the other hand, the modular design involves the fusion of different peptides into a single polypeptide chain that could be able to carry out the three most basic functions of a viral coat protein.²⁴ Thus, it would require the fusion of three blocks: (1) a solvent-exposed hydrophilic sequence that is able to provide colloidal stability to the particle, (2) a hydrophobic core that drives the self-assembly process through noncovalent inter-

Received: November 4, 2022

Revised: February 19, 2023

molecular interactions, and (3) a positively charged segment that binds to the nucleic acid.^{20,25} Often, surfactant-like peptides at specific ratios of hydrophobicity and hydrophilicity are used as colloidal stability and self-assembly blocks.^{26,27} For DNA binding blocks, lysine and arginine-rich peptides play an important role in nucleic acid condensation.^{24,28}

Designing a viromimetic system with all of the properties needed for gene delivery and conformed entirely by peptides is still challenging. Quite often, some non-peptidic components, such as polymers and lipids, are added to the peptides to increase their delivery efficiency, but the non-peptide part raises issues regarding toxicity and thermodynamic stability.²⁰ Furthermore, some examples also include viral-derived peptides, which could be cytotoxic and immunogenic.^{29–31}

In this work, we use a previously designed modular polypeptide CSB as a vector that mimics the physical properties of natural nucleocapsids, such as self-assembly and the formation of monodisperse particles with a single genome each. The three blocks that build up CSB are: (i) the C block that corresponds to a collagen-like hydrophilic motif (GXY)_n, (ii) the S-block made by 10 repetitions of the fiber-forming silk-like sequence GAGAGAGQ, and (iii) the B block that has 12 lysines.²⁵ Previous studies of CSB have shown the self-assembly with DNA into rod-like artificial virus-like particles (AVLPs) via a mechanism similar to the one observed for the Tobacco Mosaic Virus.³² Moreover, we previously reported that the AVLPs made by the CSB or CB (a version of the CSB that lacks the S-block) triggered a very low immunogenic response in mice, which was even lower than that for an adeno-associated viral vector (currently used for gene delivery into humans).³³ The modular design, composition from biocompatible modules, and low immunogenicity make the AVLPs an interesting system for gene delivery. However, previous reports have shown that AVLPs have a low gene delivery efficiency.^{34,35}

Here, we took advantage of the modular design of the AVLPs and added extra blocks to the polypeptides to increase their nucleic acid delivery efficiency. These blocks were exclusively aimed at enhancing their cellular uptake. Particularly, we studied the effect of aurein 1.2 (Au) and human transferrin (Tf). Au is a nonspecific cell-penetrating peptide that has membrane-disrupting capacity.^{36–38} Tf is a well-studied ligand known for targeting tumoral cell lines that overexpress the Tf receptor and for entering cells via endocytosis.³⁹ Following this strategy and using a combination of physical, chemical, biochemical, and biological methods, we demonstrated a considerable increase in the transfection capacity of the AVLPs formed by CSB and CB polypeptides. Also, we explored their possible mechanism of cell entry and how this affects their intracellular distribution. This study could pave the way to more efficient viromimetic gene delivery systems with programable properties.

MATERIALS AND METHODS

Production of Artificial Virus-Like Polypeptides. Proteins CSB, CB, Au-CSB, and Au-CB were produced using the recombinant yeast expression system of *Komagataella phaffii* (previously known as *Pichia pastoris*) strain GS115. We inserted the DNA sequence coding for aurein 1.2 at the 5' end of the CSB or CB gene using specific PCR primers. Then, the resulting amplicons were inserted into the pPIC9 plasmid using the *Xho*I and *Eco*RI restriction sites. The resultant plasmids were digested using the *Sa*II endonuclease and used to transform the cells by electroporation. Recombinant yeast cells were used to produce the polypeptides via methanol induction and purified

using previously reported protocols.^{25,40} Variations were made to the purification protocol only with respect to the percentage of ammonium sulfate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) used for fractional precipitation, being 50% (for CSB and CB) and 80% (for Au-CSB and Au-CB).

Preparation of CSB, Au-CSB, CB, and Au-CB Artificial Virus-Like Particles. All lyophilized polypeptides were weighed and dissolved at a concentration of 1 μ g/ μ L in Milli-Q water. Samples containing CSB and Au-CSB proteins were supplemented with 0.1 mM dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich). The polypeptide stock solutions were heated to 70 °C for 10 min to ensure their disassembly into monomers prior to the preparation of the AVLPs.⁴¹ Different molar ratios between the positively charged amino acids (N) present in the B block of the polypeptide and the negatively charged phosphate groups (P) of the DNA template (N/P) were tested. Briefly, the stock solutions of polypeptides were mixed with the nucleic acid of interest (10 ng/ μ L) in 10 mM HEPES buffer, pH 7.4 (Gold Biotechnology, St Louis, Mo.), and incubated overnight at room temperature. DNA concentration was measured using Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific). For fluorescence assays, AVLPs were prepared using a 742 bp dsDNA labeled at 5' with ATTO594 (prepared by PCR using labeled primers).

Preparation of Tf-CSB AVLPs. Tf-CSB AVLPs were obtained by conjugating Tf to previously formed CSB particles. The amine groups from lysine residues present in the Tf were cross-linked to a sulfhydryl group of the unique cysteine in CSB located at its N-terminal extreme using the sulfo-SMCC (sulfosuccinimidyl 4-N-maleimidomethyl)-(cyclohexane-1-carboxylate) cross-linking reagent (Sigma-Aldrich). First, Tf (Product number T 3309, Sigma-Aldrich) was incubated with Sulfo-SMCC for 8 h at 4 °C. Next, we removed the excess sulfo-SMCC by ultrafiltration (Amicon filters of 10 kDa MWCO) and added the solution containing CSB AVLPs. The mixture was incubated at 4 °C for 8 h. Finally, the product was washed through a 100 kDa MWCO filter to remove unreacted reagents. The reactions were performed in phosphate-buffered saline solution (PBS), pH 7.4, using Tf/Sulfo-SMCC/CSB in a molar ratio of 1:20:1.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Samples were mixed with 6 \times loading buffer (Thermo Fisher Scientific, MA), loaded in 0.8% agarose gels (Thermo Fisher Scientific, Canada), and run at 90 V for 1 h using 1 \times TAE buffer, pH 8.0 (Thermo Fisher Scientific, Lithuania). DNA bands were dyed using SYBR Safe DNA Gel stain (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) and documented in an Azure c300 Imaging System (Azure biosystems, Dublin, CA) using an epi-blue fluorescence filter. The relative fractions of free or protein-bound DNA in the samples were compared to a naked DNA control measured by densitometry analysis using ImageJ software.

Morphological Characterization of AVLPs. The shape, length, and height of the AVLPs were studied using atomic force microscopy (AFM) and transmission electron microscopy (TEM). For AFM, the samples were prepared in the following way: 5 μ L of AVLPs containing 1 ng/ μ L DNA were deposited onto freshly cleaved mica discs and incubated for 5 min, washed with 500 μ L of Milli-Q water, and dried with the air stream. AFM images of 5 μ m² were captured using a MultiMode 8-HR (Bruker, MA) in ScanAsyst mode at a scanning rate between 0.75 and 1 Hz and 500–1000 samples/line. First-order flattened images were processed and analyzed with NanoScope Analysis 1.8 software. For characterization of samples by TEM, 6 μ L of AVLPs containing 10 ng/ μ L dsDNA were loaded on formvar/carbon-supported 300 mesh copper grids (TED PELLA, Redding, CA, USA) and stained with 6 μ L of 2% uranyl acetate for 1 min. Imaging was done on a FEI T20 iCorr Electron Microscope (EICNS, UCLA) at 55,000 \times magnification.

Study of the Stability of AVLPs. The complexation or release of DNA from AVLPs was tested in the presence of the anionic polymer heparin and Opti-MEM (Gibco, Life Technologies, United Kingdom). For this, heparin (0–8 ng/ μ L) (Pisa, Mexico) or culture media Opti-MEM was mixed with AVLPs (previously prepared with 100 ng of DNA at N/P = 5) and then incubated at 37 °C for 30 min (heparin) or 24 h (Opti-MEM media). AVLP stability or disassembly (DNA release) was analyzed by EMSA. Control samples of maximum

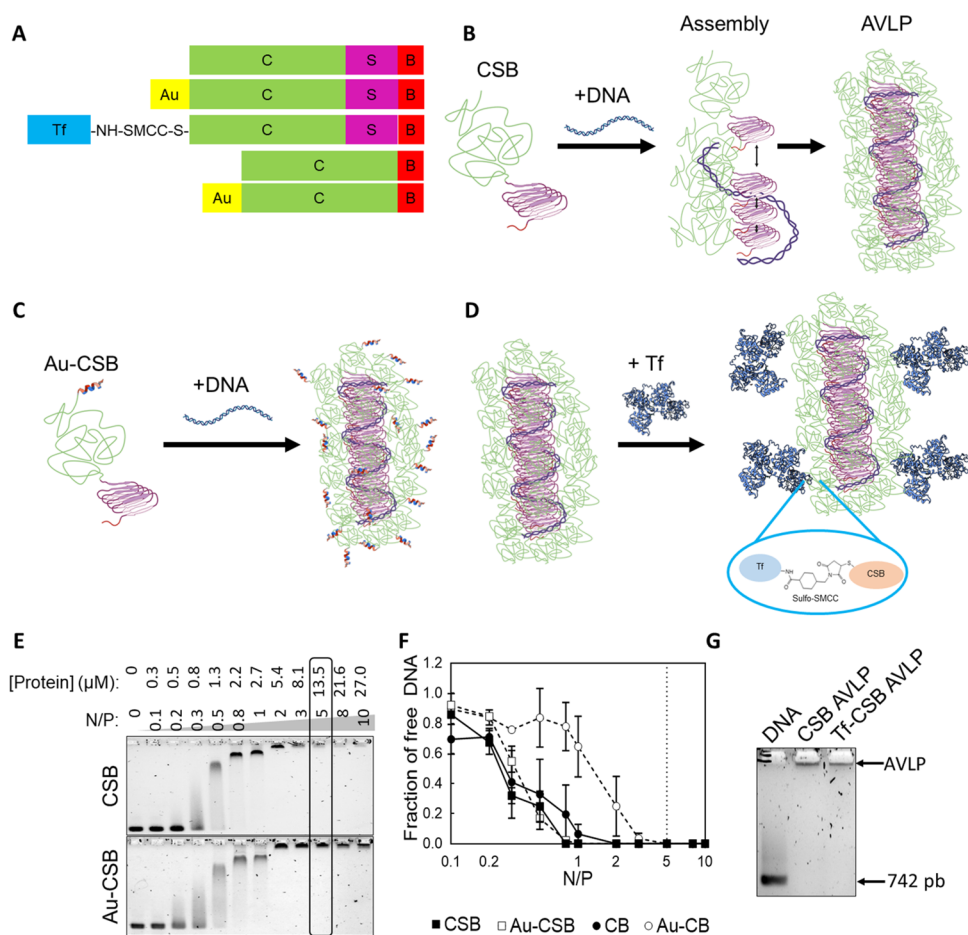


Figure 1. Design and assembly of AVLPs for enhanced cellular uptake. (A) The modular design of different polypeptides used in this work. Each block is genetically fused to the others, except for the Tf block. Here, “NH-SMCC-S” represents the covalent bond after the chemical conjugation using the sulfo-SMCC cross-linking reagent described in (D). (B) CSB self-assembles into AVLPs in the presence of nucleic acids. (C) The Au-CSB protein is produced as a recombinant fusion protein and self-assembles with nucleic acids to form particles. (D) The Tf-CSB protein is produced as a chemical conjugation between Tf and CSB AVLPs using the sulfo-SMCC cross-linking agent. (E) The electrophoretic mobility shift assay (EMSA) showing the formation of complexes between DNA and the polypeptides CSB and Au-CSB. (F) The plot of the fraction of free DNA relative to total DNA as a function of the N/P. Band's intensities were measured by densitometric analysis. Vertical lines represent the standard error media. (G) EMSA showing the integrity of the Tf-CSB AVLPs before and after conjugation of the CSB AVLPs with Tf.

release of the DNA from the AVLPs to reveal its integrity after the incubation in Opti-MEM were prepared by adding 8.3 ng/μL heparin to AVLPs and heated at 37 °C for 30 min.

Mammalian Cell Culture. Monolayers of cell lines U251 or HEK293 were grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were passed when confluency reached 70–90%.

In Vitro Cellular Uptake of AVLPs. Briefly, 7,500 cells per well (U251 or HEK293) were seeded onto 96-well plates and incubated for 24 h, then mixed with 100 ng of ATTO590-dsDNA in the form of AVLPs and incubated for 1, 4, or 24 h at 37 °C. The same amount of DNA or complexed with Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) were used as negative and positive controls, respectively. After incubation, the cells were fixed with 2% paraformaldehyde and stained with the nucleus-specific dye Hoechst 33342 (Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) at 5 μg/mL in PBS for 10 min. Cells were imaged by fluorescence microscopy using a Cytation 5.0 epifluorescence microscope (Agilent Biotek, Santa Clara, CA). Images were analyzed and processed using ImageJ software. To inhibit endocytosis and determine the extent of cellular internalization independent of energy, cells were incubated with the AVLPs in similar conditions but this time at 4 °C for 1 h.^{42,43}

Intracellular Distribution of AVLPs. Confocal microscopy was used to analyze in detail the intracellular distribution of AVLPs in

U251 cells. Here, 200,000 cells were seeded onto 8-well chamber slides (Thermo Fisher Scientific) 24 h before transfection with AVLPs or control samples containing 200 ng of ATTO590-dsDNA and incubated at 37 °C for 4 h in a humidified chamber with 5% CO₂. Then, LysoTracker (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR) was added to each well to a final concentration of 100 nM and incubated for 30 min at 37 °C. Finally, cells were washed and stained with Hoechst. Images and series of 3D z-stacks in living cells were collected using a Leica Sp5 confocal microscope. Pearson correlation colocalization coefficient (PCC) was obtained using the plugin Coloc2 in ImageJ.

Cytotoxicity Assay. Briefly, 7,500 cells were seeded onto 96-well plates and treated in conditions similar to those in the transfection experiments. Cells in Opti-MEM medium were incubated with AVLPs (containing 100 ng of DNA) for 24 h at 37 °C and then washed 3 times with PBS and later incubated for 4 h at 37 °C with 0.5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) in PBS. During incubation, the samples were protected from light using aluminum foil. After that, the solution was removed, and formazan crystals were dissolved using 50 μL of DMSO. Finally, the absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader (Agilent Biotek).

Statistical Analysis. Results were expressed as mean ± standard deviation of biological triplicates. Differences between groups were evaluated using one or two-way analysis of variance followed by Tukey's test. Levels of statistically significant difference were set at *

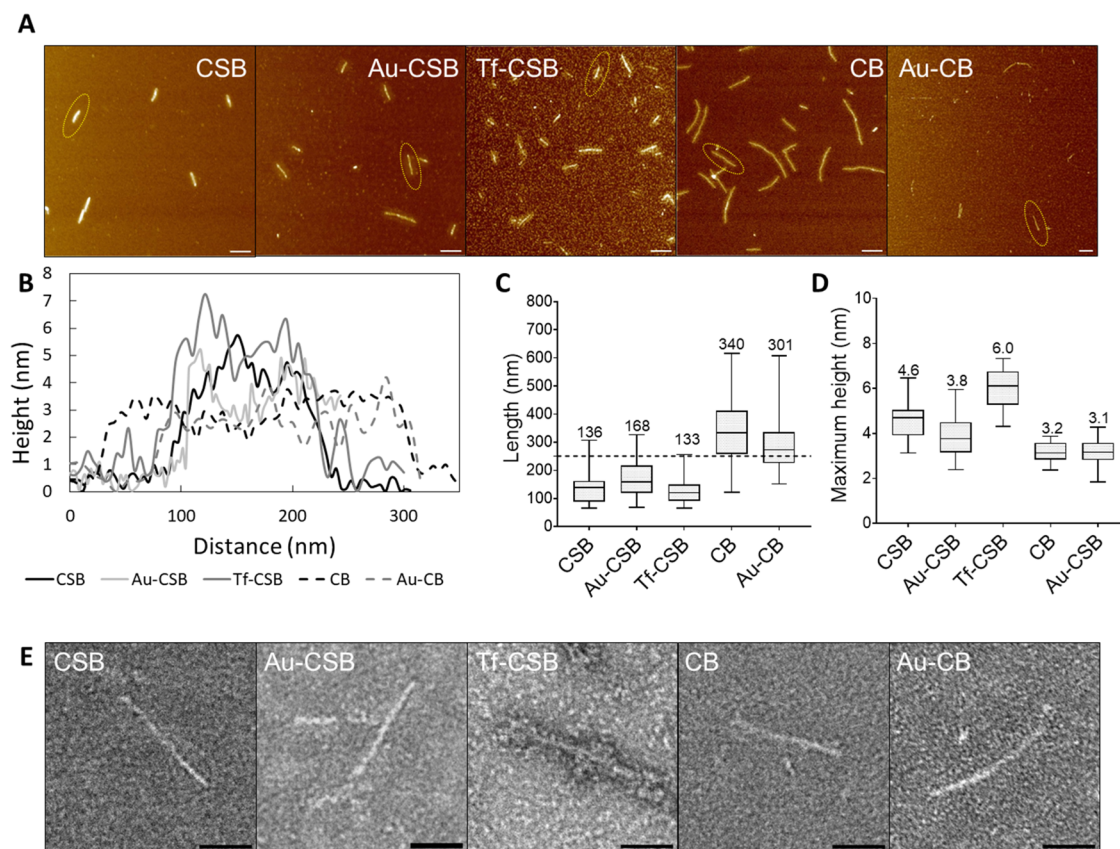


Figure 2. Morphological characterization of the AVLPs formed by CSB, AU-CSB, Tf-CSB, CB, or Au-CB polypeptides with 742 pb dsDNA. (A) Atomic force microscopy images of AVLPs. Scale bars = 200 nm. (B) Height profiles of AVLPs measured by AFM. These profiles correspond to the AVLPs inside the yellow dotted ovals in images from (A). A zoom-in and additional AFM images of each type of AVLPs are provided in Figure S8. (C) Length distribution of AVLPs. The horizontal dashed line at 250.8 nm corresponds to the contour length of the DNA template used to prepare the AVLPs. (D) Maximum height distribution of the AVLPs formed by DNA and the polypeptides measured by AFM. (E) Transmission electron micrographs of AVLPs. Scale bars = 50 nm. Numbers above the boxes in (C) and (D) correspond to the average.

p -value <0.5, ** p -value <0.01, *** p -value <0.001, and **** p -value <0.0001.

RESULTS

Design and Assembly of Modified AVLPs. The functional blocks Au and Tf were attached at the N-terminal end of the CSB to get the polypeptides Au-CSB and Tf-CSB (Figure 1A). In a similar manner, Au was added at the N-terminal extreme of CB to produce the Au-CB polypeptide (Figure S1). The CSB protein self-assembles in the presence of the DNA into rod-like AVLPs (Figure 1B), and according to Marchetti et al. in 2019, the DNA could be found around the stacked S-block.⁴⁴ One of the aims of this study was to self-assemble similar rod-like AVLPs when mixing DNA with Au-CSB or Tf-CSB (Figure 1C,D). In this way, we would obtain AVLPs displaying the targeting blocks Au and Tf on their surface.

First, we determined by EMSA the required amount of the polypeptides CSB and Au-CSB to form AVLPs. For this, we added increasing concentrations of the polypeptides to a constant amount of DNA to determine the N/P ratio needed to fully stop the electrophoretic mobility of DNA in the gel (Figure 1E). As the amount of polypeptide increases, the negative charges of the DNA phosphate backbone are neutralized and thus slow the migration of the DNA. At N/P of 2 or higher, both polypeptides completely neutralized the DNA. Subsequently, we measured the fraction of free DNA as

a function of the N/P ratio (Figure 1F). Given the similarity between the curves of the amount of free DNA as a function of N/P when using CSB or Au-CSB, we concluded that the fusion of Au to CSB did not interfere with its ability to interact with DNA and form AVLPs. Furthermore, we studied the AVLP formation of Au-CB and CB (Figures S2 and 1F), which lacks the self-assembly S-block. Here, a higher amount of Au-CB polypeptide than CB was needed to fully neutralize the DNA.

To obtain the AVLPs displaying the Tf block, we cross-linked the Tf onto CSB AVLPs (previously assembled) using sulfo-SMCC. In the first step, sulfo-SMCC forms a covalent bond with the NH_2 of solvent-exposed lysines present in the Tf, and then it forms a disulfide bridge with the cysteine of CSB located at its N-terminal end. This conjugation process did not alter the DNA binding capacity of Tf-CSB (Figure 2C).

Morphological Characterization of AVLPs. Next, we studied the morphology and dimensions of the AVLPs formed between dsDNA (742 bp) and polypeptides (Figure 2). AFM and TEM micrographs show the typical rod-shaped nanoparticles described for CSB.^{25,44} The length and height distributions of the AVLPs are shown in Figure 2C,D. Particles prepared with polypeptides had an average length (and height) of 136 ± 50 (4.6 ± 0.7) nm for CSB, 168 ± 59 (3.8 ± 0.8) nm for Au-CSB, and 133 ± 48 (6 ± 0.8) nm for Tf-CSB. Since the contour length of the DNA template is approximately 245 nm

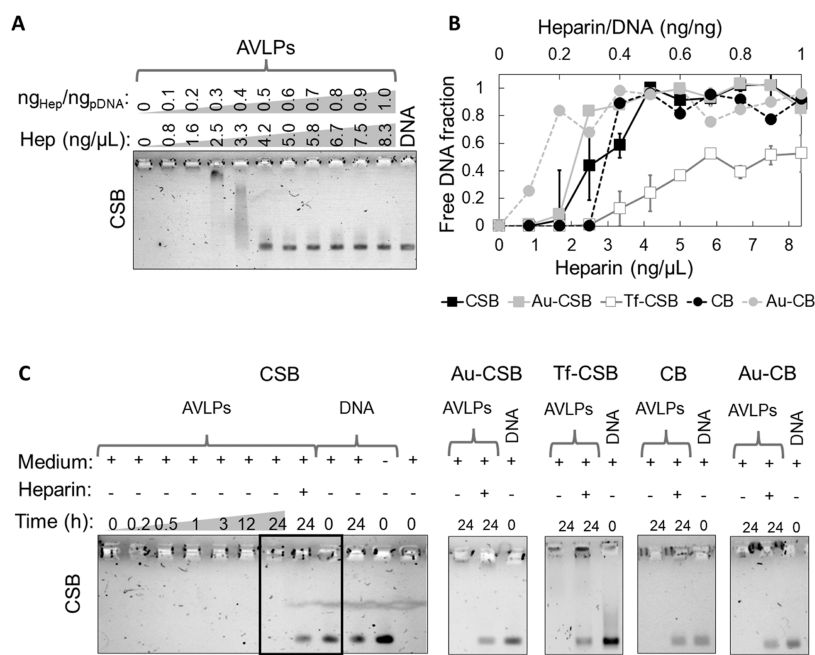


Figure 3. Stability of AVLPs in different conditions. The stability assay of the AVLPs ($N/P = 5$) with (A–B) heparin and (C–D) cell culture medium Opti-MEM. (A) The EMSA of CSB AVLPs incubated with heparin. (B) The fraction of free DNA as a function of the heparin concentration for different AVLPs. (C) The EMSA of CSB AVLPs incubated in Opti-MEM (right). EMSAs for different AVLPs in Opti-MEM (left panels). The conditions correspond to the equivalent lines in the highlighted square in the EMSA of CSB. Heparin was used as a control for the maximum DNA release.

(742 bp * 0.34 nm/bp), the polypeptides compacted the DNA 1.8, 1.45, and 1.84 times, respectively. In general, the particles show similar dimensions between them. The only two considerations are that the higher height for Tf-CSB could be due to the presence of the Tf protein at the top of the CSB protein and that Au-CSB compacts the DNA slightly less than CSB does, suggesting that Au could be disturbing the stacking of the S-block. Furthermore, CB and Au-CB AVLPs formed nanoparticles with very similar dimensions and with the expected rod-like morphology but less compact than CSB AVLPs.²⁵ These showed a length (and height) of 340 ± 106 (3.2 ± 0.4) nm for CB and 301 ± 120 (3.1 ± 0.6) nm for Au-CSB. The length of these AVLPs is longer than those derived from the CSB polypeptides, as CB does not compact the DNA as the CSB does.

Study of the Stability of AVLPs in Biologically Relevant Media. Another important question for the application of the AVLPs is if they remain assembled when dissolved in media with high amounts of competing polyanions and in culture media of interest. For this, we evaluated the stability of AVLPs by incubating them in cell culture media and solutions containing heparin, a highly anionic polymer that is present in blood serum. This could tell us how efficiently the nanoparticle could remain assembled before cellular uptake.

We followed the disassembly of the AVLPs along with increasing concentrations of heparin using EMSA. Top bands correspond to the fully formed AVLPs, whereas bands at the bottom correspond to free DNA, which indicates AVLP disassembly and DNA release (Figure 3A,B). AVLPs formed with Au-CSB started to disassemble at the lowest heparin concentration of 1.6 ng/μL, then Tf-CSB and CSB disassembled at 2.5 ng/μL. Moreover, Au-CSB fully disassembled at a concentration of 2.5 ng/μL, then CSB disassembled at 4.2 ng/μL, whereas Tf-CSB AVLPs did not

fully disassemble even at 8 ng/μL of heparin. In summary, the stability of the different AVLPs followed the following trend: Tf-CSB > CSB > Au-CSB. Similarly, for CB polypeptides, the trend was CB > Au-CB. CB AVLPs disassembled at 3.3 ng/μL, while Au-CB disassembled at 1.6 ng/μL. These results suggest that Au could have a negative effect on the stability of the AVLPs against heparin.

Furthermore, we found that all AVLPs (CSB, CB, Au-CSB, Au-CB, and Tf-CSB) showed high stability when incubated 24 h in Opti-MEM, one of the most used cell culture media for *in vitro* transfection studies (Figure 3C). AVLPs did not release any DNA during the incubation for 24 h, and the maximum DNA release control with high heparin concentrations showed the integrity of the DNA.

The lower stability of Au-AVLPs could be attributed to a possible interaction between Au and heparin since it has been reported that Au can strongly bind to polysaccharides when it is dimerized.^{38,45} Moreover, AVLPs conjugated with Tf were more stable, probably because multiple covalent cross-links were created between adjacent polypeptides during the conjugation process. As expected, CB AVLPs were less heparin resistant than the CSB counterparts, possibly due to their lack of the S-block that promotes the polypeptide–polypeptide interactions.³³ Moreover, all of the AVLPs, but Au-CB AVLPs, were completely disassembled at a heparin concentration higher than the endogenous levels in plasma (1.77 ng/μL).⁴⁶ These results show the metastability of the AVLPs, meaning that they remain assembled at endogenous heparin concentrations but disassemble at high concentrations. Furthermore, all AVLPs remained assembled after the incubation in cell culture media. Overall, this suggests that the AVLPs can protect their DNA cargo until it is delivered.

Cellular Uptake of AVLPs. We first prepared AVLPs containing an ATTO594-DNA as a template and then used

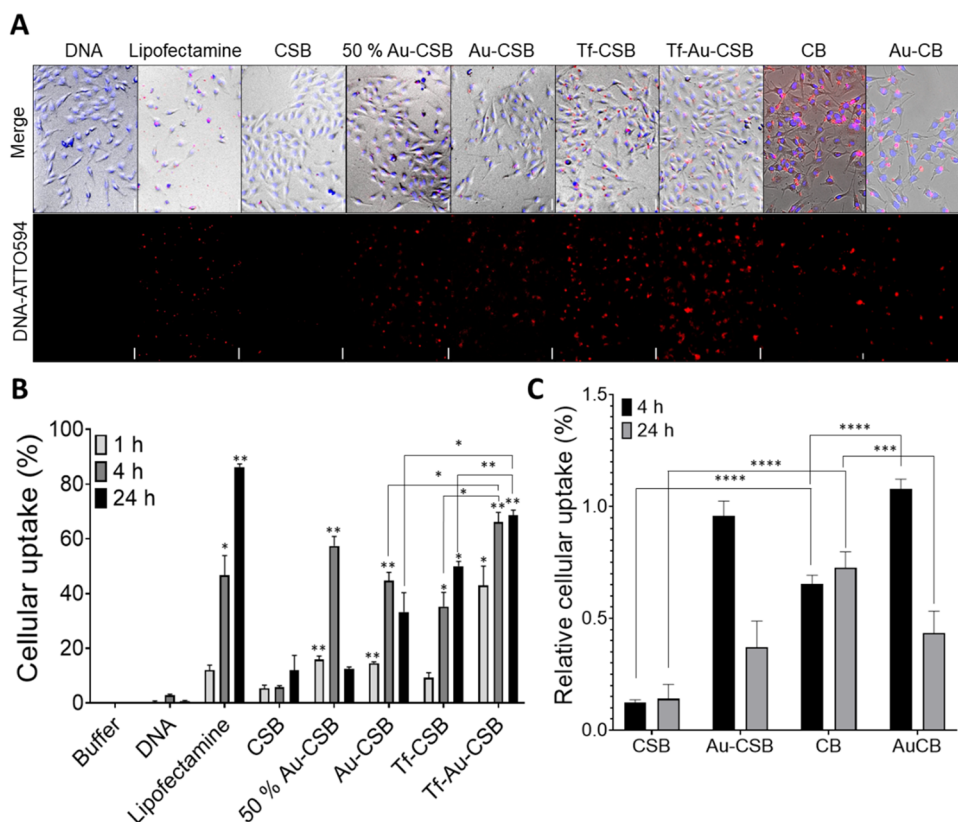


Figure 4. Cellular internalization of AVLPs. (A) Fluorescence microscopy images of U251 cells after 24 h of transfection with AVLPs carrying a 742 pb dsDNA labeled with ATTO594. Scale bars = 50 μ m. (B) Internalization kinetics of CSB, Au-CSB Tf-CSB, and Tf-Au-CSB by U251 cells. (C) Comparison of the relative cellular uptake of CSB, Au-CSB, CB, and Au-CB AVLPs. Relative cellular uptake is expressed as the percentage from the positive control with Lipofectamine for each independent experiment.

them to transfect in U251 cells that overexpress the transferrin receptor.⁴⁷ We measured the internalization of the AVLPs by epifluorescence microscopy. Figure 4A shows representative micrographs of cells 24 h after being transfected with AVLPs, and Figure 4B shows the percentage of cellular uptake at 1, 4, and 24 h. AVLPs made with Au-CSB, Tf-CSB, and Tf-Au-CSB (AVLPs formed with Au-CSB and posteriorly conjugated with Tf) displayed higher cellular uptake than the non-modified CSB AVLPs. Au-CSB AVLPs had a maximum peak of entry at 4 h (45%), which is 7.5 times higher than CSB AVLPs at this point (6%), whereas for Tf-CSB AVLPs, the percentage of fluorescent cells increased over time being 6 (35%) and 4 (50%) times higher than CSB AVLPs at 4 (6%) and 24 h (12%), respectively. Moreover, Tf-Au-CSB AVLPs showed the highest cellular internalization, even at 1 h post-transfection, and they reached 8 (43%) times the entry of CSB AVLPs at this time point. Thereafter, the percentage of fluorescent cells increased up to 68%, which was significantly higher than Au-CSB and Tf-CSB separately at 24 h.

We further transfected cells with AVLPs formed with CB and Au-CB polypeptides (Figure 4A, right panels). The comparison between the cellular uptake of CSB and CB AVLPs is shown in Figure 4C. Interestingly, CB AVLPs showed a higher cellular uptake than CSB. This implies that the S-block is detrimental to the cellular uptake of the AVLPs. However, as shown in Figure 3, the S-block offers higher stability, which is an important factor for *in vivo* delivery. Moreover, similar to Au-CSB, Au-CB had a higher cellular uptake than CB, and there were no significant differences between the uptake of Au-CSB and Au-CB AVLPs.

Insights into the Mechanism of Cellular Uptake. Once we have shown that the AVLPs are entering the cells, we explored and verified their possible mechanisms of cell internalization. First, we evaluated the effect of thermal inhibition of endocytosis by running transfection experiments at 4 °C for 1 h. In these conditions, cell metabolism and processes that require ATP, like endocytosis, are slowed down; thus, only those particles that rely on physical interaction and direct penetration of the membrane are able to get inside the cells.^{42,43} We compared the number of cells transfected with fluorescent AVLPs after incubation at 4 and 37 °C (Figure 5A) and quantified the change in the transfection efficiency at 4 °C relative to 37 °C (Figure 5B). The relative transfection efficiency of CSB AVLPs was 17% at 4 °C compared to 37 °C, meaning that it was reduced by 83%. For Tf-CSB AVLPs, the relative transfection efficiency at 4 °C was only 3% (a reduction of 97%). In contrast, Au-CSB AVLPs showed a relative transfection efficiency of 68% (reduction of 32%) and 58% (reduction of 42%) when AVLPs were formed by a 50/50 mixture of CSB and Au-CSB polypeptides (50% Au-CSB). Also, Lipofectamine internalization practically did not change, and it showed a 98% of transfection efficiency at 4 °C compared to 37 °C (reduction of 2%). The results point out that Au-CSB AVLPs are able to get inside the cells using an energy-independent mechanism, which is expected due to the capacity of the Au block to penetrate directly across cell membranes.⁴⁸ Moreover, 32% of cellular uptake of the Au-CSB AVLPs that was inhibited at 4 °C indicates that these AVLPs also enter the cell via endocytic pathways. Likewise, the large reduction in transfection efficiency for Tf-CSB AVLPs means

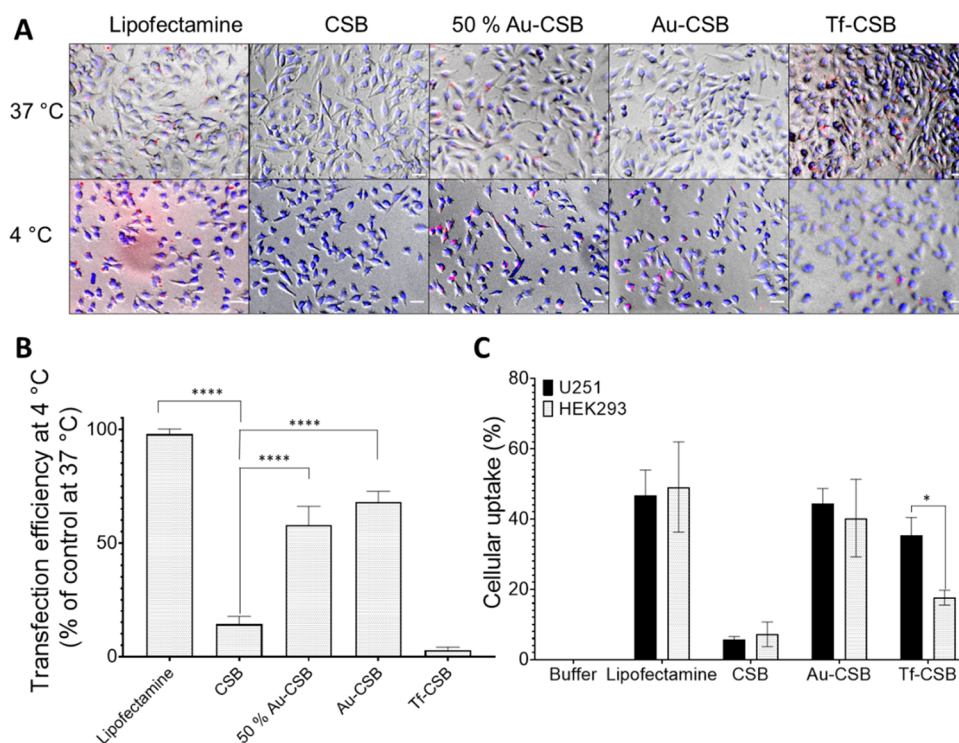


Figure 5. Insights into the mechanism of entry of the AVLPs. (A) Fluorescence microscopy images of U251 transfected with the AVLPs at 37 or 4 °C for 1 h. Scale bars = 50 μm. (B) Transfection efficiency of U251 cells after the inhibition of endocytosis at 4 °C. Results are reported as the percentage compared to the efficiency of transfection observed at 37 °C. (C) Comparison of cellular uptake of the AVLPs in U251 cells (that overexpress the transferrin receptor) versus HEK293 cells (that do not overexpress the transferrin receptor).

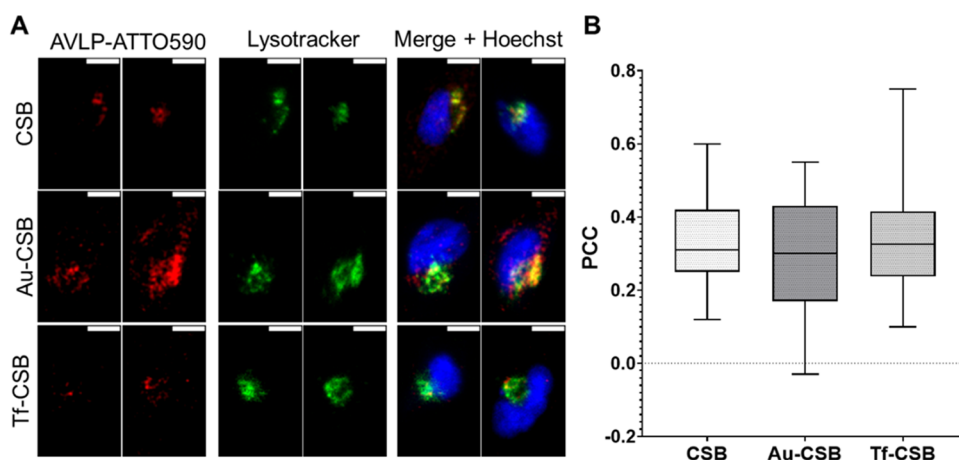


Figure 6. Intracellular distribution of the AVLPs. (A) Confocal microscopy of U251 cells transfected for 4 h with the AVLPs. Scale bars = 10 μm. (B) Pearson Correlation Coefficient (PCC) between the lysosomes and AVLPs.

that they mostly use energy-driven endocytosis, which is in strong agreement with the well-known entry mechanism of Tf via specific receptors.³⁹

To corroborate the cell-targeting specificity of Tf-CSB AVLPs, we compared the cellular uptake in U251 versus HEK293 cells (Figure 5C), where the former overexpresses the Tf receptor, and the latter expresses it at a lower level.^{47,49} We found a decrease in the cellular internalization of 50% in the HEK293 cells compared to U251 cells, which correlates with the differential expression of the Tf receptor in both cell lines and suggests that Tf-CSB AVLPs largely use the Tf receptor as a main route for cell entry. In contrast, CSB and Au-CSB AVLPs were internalized at a similar level in both cell types.

Intracellular Distribution of the AVLPs. Next, we explored the intracellular distribution of AVLPs in transfected cells and their colocalization with lysosomes to gain an insight into their possible endosomal escape (Figure 6). From micrographs showing Z-projections of transfected cells obtained by confocal microscopy (Figure 6A), we calculated the PCC between ATTO594-DNA and lysosomes stained with the Lysotracker (Figure 6B). ATTO594-DNA showed a high colocalization with lysosomes, and interestingly, none of the AVLPs tested were localized inside the nucleus at 4 h. All of the AVLPs had similar colocalization values (PCC ~0.3). Although Au has been reported to enhance the endosomal escape of proteins, we did not observe this effect in our results,

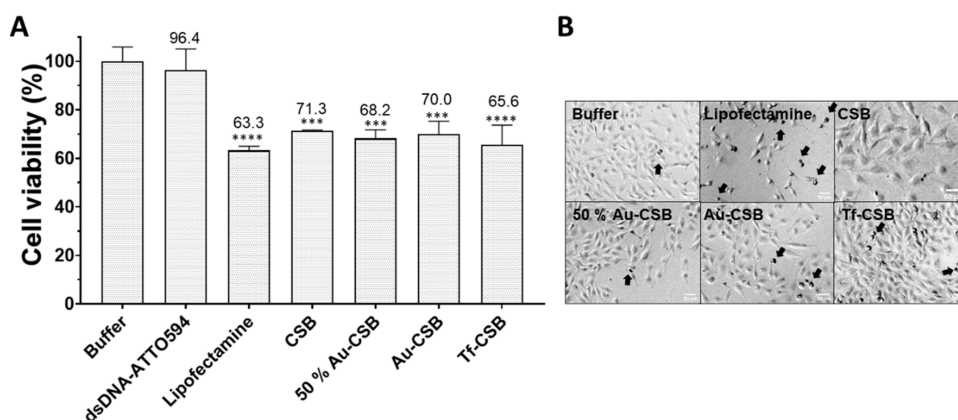


Figure 7. Effect of the AVLPs on cell viability. (A) Percentage of cell viability measured with the MTT assay when U251 cells were incubated with the AVLPs for 24 h at 37 °C. The level of statistical significance was compared to buffer. ***: p -value <0.001 and ****: p -value <0.0001. (B) Morphology of the cells treated with the AVLPs. Black arrows point rounded cells with abnormal morphology. Scale bars = 50 μm.

probably because we did the analysis at 4 h post transfection, which could be too early for the activity of Au, as other reports have observed the endosomal escape activity at 16 h post transfection. For Tf-CSB, we did not expect much difference compared to CSB, as Figure 5B suggests that CSB AVLPs are also internalized by the cells by endocytic pathways.

Cytotoxicity of AVLPs. Finally, we evaluated the cytotoxicity of AVLPs on U251 cells treated under the same conditions as transfection experiments (Figure 7). All AVLPs reduced cell viability by ~30% and showed no alterations in cell morphology, in contrast to Lipofectamine, which reduced cell viability by ~37%, and caused a huge alteration to the cells. Particularly, CSB reduced viability the least (28.7%), followed by Au-CSB (30%), 50%-Au-CSB (31.8%), Tf-CSB (34.5%), and finally Lipofectamine (36.7%). Overall, this indicates that AVLPs can transfect cells causing lower cellular damage than Lipofectamine, one of the most commonly used transfectant chemicals.

DISCUSSION

The modular design of the AVLPs resulted in an easy and straightforward functionalization of the polypeptides. The short Au peptide was successfully genetically fused to the N-terminal extreme of CSB and CB polypeptides, and this fusion had little to no effect on their ability to form rod-shaped nanoparticles. Here, assuming that all negative charges of the DNA are neutralized 1:1 by the lysines of the B block, each AVLP would be displaying around 124 Au peptides. These AVLPs that display peptides with a high density could offer an interesting opportunity for peptide display and drug delivery.

In the case of larger blocks such as Tf, the chemical conjugation onto assembled CSB AVLPs allowed us to successfully obtain AVLPs displaying the Tf block. The chemical conjugation was a successful alternative to genetic fusion since the recombinant Tf-CSB fusion protein failed to assemble well-formed nanoparticles (data not shown). We attribute this effect to the big difference in the molecular weight between Tf (74.7 kDa) and CSB (44.7 kDa), which possibly caused a steric hindrance during the assembly process. Similarly, recombinant functionalization of viruses can often prevent their assembly or result in less stable particles.^{6,50} Thus, the recombinant functionalization usually needs to be done on a small fraction of capsomers within the capsid and/or inserted at an external loop at the surface of the capsid.^{7,51}

Likewise, chemical conjugation with preassembled capsids has been widely used even with large proteins such Tf.^{52,53}

We showed that the addition of Au and Tf to CSB enhanced the cellular uptake of AVLPs, imitating the role of cell-penetrating or targeting peptides in natural capsids.^{54,55} The addition of Au to any of the polypeptides enhanced the cellular uptake after 4 h of incubation. However, after 24 h, the fraction of transfected fluorescent cells decreased, probably due to the degradation of the probe.⁵⁶ Moreover, these Au-AVLPs mainly rely on a membrane-disrupting mechanism to enter the cells. However, 30% also enter by endocytic pathways. Similarly, natural viral particles often use different routes to access the inside of the cell, depending on the context.⁵⁴ Tf-AVLPs entered via an endocytic pathway with slower kinetics. This could be because endocytic pathways are known to be highly ordered, controlled, and especially slow for this geometry of nanoparticles.^{57,58} Additionally, the combination of Au and Tf not only enhanced but accelerated the cellular uptake of the AVLPs into the cells. In summary, all of these insights into the mechanisms of cellular uptake support that our polypeptides have the capability of being reprogrammed to target specific cell types through conjugation to a variety of ligands that have different mechanisms of cell entry. To our knowledge, there are no examples of other designed virus-like nanoparticles that can efficiently encapsulate DNA and be reprogrammed to tether specific cell-targeting ligands.

Since the Au block has been reported to promote the endosomal escape of proteins,⁵⁹ it is possible that its conjugation to AVLPs might have lowered its activity. However, further studies are required to understand why the addition of the Au block did not significantly change the intracellular distribution of the AVLPs. All of these indicate that Au-CSB and Tf-CSB AVLPs are able to enter the cell in a more efficient way than CSB AVLPs, but it seems that a large amount of them is still trapped within the lysosomes after 4 h of transfection.

CONCLUSIONS

In this study, we demonstrated that we can add cellular targeting blocks into the modularly designed CSB polypeptides to increase the cellular uptake of AVLPs formed with DNA. The added blocks could be of a very different nature. We used the nonspecific cell-penetrating peptide aurein and the protein transferrin to promote endocytosis through specific cell

receptors. AVLPs modified with these additional blocks had a higher capacity to enter cells than non-modified AVLPs. Au-AVLPs had 7.5 times higher capacity than non-modified CSB, while for Tf-CSB it was 6 times. Furthermore, the combination of Au and Tf in the AVLPs further increased the cellular uptake up to 11 times. Also, all of the AVLPs had lower toxicity than the cationic-based delivery agent Lipofectamine. Moreover, we explored the mechanisms of cell entry of AVLPs and how these affect their intracellular distribution. We found that the main route of entry varied according to the nature of the added cell-uptake block. For Tf, it was via endocytosis, and for Au, through direct membrane penetration; however, so far, the addition of both blocks did not significantly change the intracellular distribution at 4 h.

Viral-inspired polypeptide CSB allowed and tolerated the addition of up to 2 new blocks (for a total of 5 blocks) without disrupting its functional properties. The addition of blocks had little impact on their ability to assemble together with DNA into rod-like AVLPs, which showed enough stability for *in vitro* transfection. These results show that CSB AVLPs are highly modular, versatile and allow the incorporation of new functional blocks into their design, which is a key factor for their further improvement for specific delivery applications. As another example to show the versatility of this system, CSB has also been conjugated with CRISPR-Cas proteins to target the assembly of AVLPs toward specific sequences.⁶⁰ Given that CSB polypeptide can be easily conjugated with a high variety of ligands, our study could pave the way for the use of viromimetic particles as a molecular platform for the delivery of nucleic acids, drugs, and peptides.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.2c01295>.

¹Amino acid sequence of the polypeptides; schematic designing of all of the AVLPs; SDS-PAGE of purified polypeptides; mass spectroscopy analysis of polypeptides; UV-vis spectra of polypeptides; Western-blot of polypeptides; and additional EMSAs, AFM of AVLPs and fluorescence microscopy images of transfected cells (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Armando Hernandez-Garcia – Laboratory of Biomolecular Engineering and Bionanotechnology, Department of Chemistry of Biomacromolecules, Institute of Chemistry, UNAM, 04510 Mexico City, Mexico; orcid.org/0000-0002-2401-8139; Email: armandohg@iquimica.unam.mx

Authors

David S. Moreno-Gutierrez – Laboratory of Biomolecular Engineering and Bionanotechnology, Department of Chemistry of Biomacromolecules, Institute of Chemistry, UNAM, 04510 Mexico City, Mexico; orcid.org/0000-0002-7363-8561

Ximena del Toro-Ríos – Laboratory of Biomolecular Engineering and Bionanotechnology, Department of Chemistry of Biomacromolecules, Institute of Chemistry, UNAM, 04510 Mexico City, Mexico; orcid.org/0000-0002-4778-8064

Natalia J. Martinez-Sulvaran – Laboratory of Biomolecular Engineering and Bionanotechnology, Department of Chemistry of Biomacromolecules, Institute of Chemistry, UNAM, 04510 Mexico City, Mexico

Mayra B. Perez-Altamirano – Laboratory of Biomolecular Engineering and Bionanotechnology, Department of Chemistry of Biomacromolecules, Institute of Chemistry, UNAM, 04510 Mexico City, Mexico; orcid.org/0000-0002-9273-2940

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.biomac.2c01295>

Author Contributions

A.H.G. and D.S.M.G. conceptualized and organized the project, designed the experiment, analyzed the data, and wrote the manuscript. D.S.M.G., X.D.T.R., N.J.S.M., and M.B.P.A. conducted the experiments. All authors reviewed the manuscript and have given approval to the final version of the manuscript.

Funding

This work was funded by 2019 UC MEXUS-CONACyT Collaborative Research Grant (CN-19-118), CONACyT Frontera de la Ciencia 2019 (160671), and CONACyT graduate doctoral fellowship 662246.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. William Gelbart for allowing us access to EM and for his support during the development of this work. David Silverio Moreno Gutiérrez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and received a doctoral fellowship (CVU: 662246) from CONACYT, México.

■ REFERENCES

- (1) Kimura, S.; Harashima, H. Current Status and Challenges Associated with CNS-Targeted Gene Delivery across the BBB. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, No. 1216.
- (2) Ma, C. C.; Wang, Z. L.; Xu, T.; He, Z. Y.; Wei, Y. Q. The Approved Gene Therapy Drugs Worldwide: From 1998 to 2019. *Biotechnol. Adv.* **2020**, *40*, No. 107502.
- (3) Goswami, R.; Subramanian, G.; Silayeva, L.; Newkirk, I.; Doctor, D.; Chawla, K.; Chattopadhyay, S.; Chandra, D.; Chilukuri, N.; Betapudi, V. Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, No. 297.
- (4) Manno, C. S.; Pierce, G. F.; Arruda, V. R.; Glader, B.; Ragni, M.; Rasko, J. J. E.; Ozelo, M. C.; Hoots, K.; Blatt, P.; Konkle, B.; Dake, M.; Kaye, R.; Razavi, M.; Zajko, A.; Zehnder, J.; Rustagi, P. K.; Nakai, H.; Sommer, M.; Tigges, M.; Chew, A.; Leonard, D.; Wright, J. F.; Lessard, R. R.; Sabatino, D.; Luk, A.; Jiang, H.; Mingozzi, F.; Couto, L.; Ertl, H. C.; High, K. A.; Kay, M. A. Successful Transduction of Liver in Hemophilia by AAV-Factor IX and Limitations Imposed by the Host Immune Response. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 342–348.
- (5) Raper, S. E.; Chirmule, N.; Lee, F. S.; Wivel, N. A.; Bagg, A.; Gao, G.; Wilson, J. M.; Batshaw, M. L. Fatal Systemic Inflammatory Response Syndrome in a Ornithine Transcarbamylase Deficient Patient Following Adenoviral Gene Transfer. *Mol. Genet. Metab.* **2003**, *80*, 148–158.
- (6) Wu, P.; Xiao, W.; Conlon, T.; Hughes, J.; Agbandje-McKenna, M.; Ferkol, T.; Flotte, T.; Muzyczka, N. Mutational Analysis of the Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2) Capsid Gene and

- Construction of AAV2 Vectors with Altered Tropism. *J. Virol.* **2000**, *74*, 8635–8647.
- (7) Warrington, K. H.; Gorbatyuk, O. S.; Harrison, J. K.; Opie, S. R.; Zolotukhin, S.; Muzyczka, N. Adeno-Associated Virus Type 2 VP2 Capsid Protein Is Nonessential and Can Tolerate Large Peptide Insertions at Its N Terminus. *J. Virol.* **2004**, *78*, 6595–6609.
- (8) Rabinowitz, J. E.; Xiao, W.; Samulski, R. J. Insertional Mutagenesis of AAV2 Capsid and the Production of Recombinant Virus. *Virology* **1999**, *265*, 274–285.
- (9) Thadani, N. N.; Zhou, Q.; Reyes-Gamas, K.; Butler, S.; Bueno, C.; Schafer, N. P.; Morcos, F.; Wolynes, P. G.; Suh, J. Frustration and Direct-Coupling Analysis to Predict Formation and Function of Adeno-Associated Virus. *Biophys. J.* **2021**, *120*, 489–503.
- (10) Yamamoto, Y.; Goto, N.; Miura, K.; Narumi, K.; Ohnami, S.; Uchida, H.; Miura, Y.; Yamamoto, M.; Aoki, K. Development of a Novel E Ffi Cient Method To Construct an Adenovirus Library Displaying Random Peptides on the Fiber Knob. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 1069–1074.
- (11) Körbelin, J.; Hunger, A.; Alawi, M.; Sieber, T.; Binder, M.; Trepel, M. Optimization of Design and Production Strategies for Novel Adeno-Associated Viral Display Peptide Libraries. *Gene Ther.* **2017**, *470*–481.
- (12) Skorupa, A.; Pfennings, S.; Mu, O.; Michelfelder, S.; Kohlschu, J. Successful Expansion but Not Complete Restriction of Tropism of Adeno-Associated Virus by In Vivo Biopanning of Random Virus Display Peptide Libraries. *PLoS One* **2009**, *4*, No. e5122.
- (13) Kotin, R. M.; Snyder, R. O. Manufacturing Clinical Grade Recombinant Adeno-Associated Virus Using Invertebrate Cell Lines. *Hum. Gene Ther.* **2017**, *28*, 350–360.
- (14) Bett, A. J.; Prevec, L.; Graham, F. L. Packaging Capacity and Stability of Human Adenovirus Type 5 Vectors. *J. Virol.* **1993**, *67*, 5911–5921.
- (15) Bulcha, J. T.; Wang, Y.; Ma, H.; Tai, P. W. L.; Gao, G. Viral Vector Platforms within the Gene Therapy Landscape. *Signal Transduction Targeted Ther.* **2021**, *6*, No. 53.
- (16) Mastrobattista, E.; van der Aa, M.; Hennik, W. E.; Crommelin, D. J. A. Artificial Viruses: A Nanotechnological Approach to Gene Delivery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 115–121.
- (17) Xu, X.; Yuan, H.; Chang, J.; He, B.; Gu, Z. Hierarchical Self-Assembly of Peptide Dendrimers and Linear Polypeptides into Nanoarchitectures Mimicking Viral Capsids. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3184–3187.
- (18) Walker, G. F.; Fella, C.; Pelisek, J.; Fahrmeir, J.; Boeckle, S.; Ogris, M.; Wagner, E. Toward Synthetic Viruses: Endosomal PH-Triggered Dethiolding of Targeted Polyplexes Greatly Enhances Gene Transfer in Vitro and in Vivo. *Mol. Ther.* **2005**, *11*, 418–425.
- (19) Urello, M.; Hsu, W.; Christie, R. J. Peptides as a Material Platform for Gene Delivery: Emerging Concepts and Converging Technologies. *Acta Biomater.* **2020**, *117*, 40–59.
- (20) Tarvirdipour, S.; Huang, X.; Mihali, V.; Schoenenberger, C.; Palivan, C. G. Peptide-Based Nanoassemblies in Gene Therapy and Diagnosis: Paving the Way for Clinical Application. *Molecules* **2020**, *25*, No. 3482.
- (21) Butterfield, G. L.; Lajoie, M. J.; Gustafson, H. H.; Sellers, D. L.; Nattermann, U.; Ellis, D.; Bale, J. B.; Ke, S.; Lenz, G. H.; Yehdego, A.; Ravichandran, R.; Pun, S. H.; King, N. P.; Baker, D. Evolution of a Designed Protein Assembly Encapsulating Its Own RNA Genome. *Nature* **2017**, *552*, 415–420.
- (22) Terasaka, N.; Azuma, Y.; Hilvert, D. Laboratory Evolution of Virus-like Nucleocapsids from Nonviral Protein Cages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2018**, *115*, 5432–5437.
- (23) Cannon, K. A.; Nguyen, V. N.; Morgan, C.; Yeates, T. O. Design and Characterization of an Icosahedral Protein Cage Formed by a Double-Fusion Protein Containing Three Distinct Symmetry Elements. *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9*, 517–524.
- (24) Loughran, S. P.; Mccruden, C. M.; Mccarthy, H. O. Designer Peptide Delivery Systems for Gene Therapy. *Eur. J. Nanomed.* **2015**, *7*, 85–96.
- (25) Hernandez-Garcia, A.; Kraft, D. J.; Janssen, A. F. J.; Bomans, P. H. H.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Thies-weesie, D. M. E.; Favretto, M. E.; Brock, R.; de Wolf, F. A.; Werten, M. W. T.; van der Schoot, P.; Stuart, M. C.; de Vries, R. Design and Self-Assembly of Simple Coat Proteins for Arti Fi Cial Viruses. *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9*, 698–702.
- (26) Wang, H.; Feng, Z.; Xu, B. T h e r a n o s t i c s Supramolecular Assemblies of Peptides or Nucleopeptides for Gene Delivery. *Theranostics* **2019**, *9*, 3213–3222.
- (27) Hartgerink, J. D.; Beniash, E.; Stupp, S. I. Peptide-Amphiphile Nanofibers: A Versatile Scaffold for the Preparation of Self-Assemblinh Materials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 5133–5138.
- (28) Canine, B. F.; Wang, Y.; Hatefi, A. Evaluation of the Effect of Vector Architecture on DNA Condensation and Gene Transfer Efficiency. *J. Control. Release* **2008**, *129*, 117–123.
- (29) Koren, E.; Apte, A.; Sawant, R. R.; Grunwald, J.; Torchilin, V. P. Cell-Penetrating TAT Peptide in Drug Delivery Systems: Proteolytic Stability Requirements. *Drug Delivery* **2011**, *18*, 377–384.
- (30) Lo, S. L.; Wang, S. An Endosomolytic Tat Peptide Produced by Incorporation of Histidine and Cysteine Residues as a Nonviral Vector for DNA Transfection. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2408–2414.
- (31) Rajagopalan, R.; Xavier, J.; Rangaraj, N.; Rao, N. M.; Gopal, V. Recombinant Fusion Proteins TAT-Mu, Mu and Mu-Mu Mediate Efficient Non-Viral Gene Delivery. *J. Gene Med.* **2007**, *9*, 275–286.
- (32) Punter, M. T. J. J. M.; Hernandez-Garcia, A.; Kraft, D. J.; de Vries, R.; van der Schoot, P. Self-Assembly Dynamics of Linear Virus-Like Particles: Theory and Experiment. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 6286–6297.
- (33) Moreno-Gutierrez, D. S.; Zepeda-Cervantes, J.; Vaca, L.; Hernandez-Garcia, A. An Artificial Virus-like Triblock Protein Shows Low in Vivo Humoral Immune Response and High Stability. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *129*, No. 112348.
- (34) Cárdenas-Guerra, R. E.; Moreno-Gutierrez, D. S.; Vargas-Dorantes, O.; de, J.; Espinoza, B.; Hernandez-Garcia, A. Delivery of Antisense DNA into Pathogenic Parasite Trypanosoma Cruzi Using Virus-Like Protein-Based Nanoparticles. *Nucleic Acid Ther.* **2020**, *30*, 392–401.
- (35) Jekhmame, S.; De Haas, R.; da Silva Filho, O. P.; Van Asbeck, A. H.; Favretto, M. E.; Hernandez-Garcia, A.; Brock, R.; De Vries, R. Virus-Like Particles of mRNA with Artificial Minimal Coat Proteins: Particle Formation, Stability, and Transfection Efficiency. *Nucleic Acid Ther.* **2017**, *27*, 159–167.
- (36) Lieser, R. M.; Li, Q.; Chen, W.; Sullivan, M. O. Incorporation of Endosomolytic Peptides with Varying Disruption Mechanisms into EGFR-Targeted Protein Conjugates: The E Ff Ect on Intracellular Protein Delivery and EGFR Speci Fi City in Breast Cancer Cells. *Mol. Pharm.* **2022**, *19*, 661–673.
- (37) Rozek, T.; Wegener, K. L.; Bowie, J. H.; Olver, I. N.; Carver, J. A.; Wallace, J. C.; Tyler, M. J. The Antibiotic and Anticancer Active Aurein Peptides from the Australian Bell Frogs Litoria Aurea and Litoria Raniformis The Solution Structure of Aurein 1. 2. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5330–5341.
- (38) Rai, D. K.; Qian, S. Interaction of the Antimicrobial Peptide Aurein 1.2 and Charged Lipid Bilayer. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, No. 3719.
- (39) Daniels, T. R.; Bernabeu, E.; Rodríguez, J. A.; Patel, S.; Kozman, M.; Chiappetta, D. A.; Holler, E.; Ljubimova, J. Y.; Helguera, G.; Penicet, M. L. The Transferrin Receptor and the Targeted Delivery of Therapeutic Agents against Cancer. *Biochem. Biophys. Acta* **2012**, *1820*, 291–317.
- (40) Hernandez-Garcia, A.; Werten, M. W. T.; Stuart, M. C.; de Wolf, F. A.; De Vries, R. Coating of Single DNA Molecules by Genetically Engineered Protein Diblock Copolymers. *Small* **2012**, *8*, 3491–3501.
- (41) Vargas, E. C.; Stuart, A. C.; Vries, R.; De; Hernandez-garcia, A. Template-Free Self-Assembly of Artificial De Novo Viral Coat Proteins into Nanorods: Effects of Sequence, Concentration, and Temperature. *Chem.–Eur. J.* **2019**, *25*, 11058–11065.
- (42) dos Santos, T.; Varela, J.; Lynch, I.; Salvati, A.; Dawson, K. A. Effects of Transport Inhibitors on the Cellular Uptake of

Carboxylated Polystyrene Nanoparticles in Different Cell Lines. *PLoS One* **2011**, *6*, No. e24438.

(43) Vercauteren, D.; Vandenbroucke, R. E.; Jones, A. T.; Rejman, J.; Demeester, J.; De Smedt, S. C.; Sanders, N. N.; Braeckmans, K. The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 561–569.

(44) Marchetti, M.; Kamsma, D.; Cazares Vargas, E.; Hernandez García, A.; Van Der Schoot, P.; De Vries, R.; Wuite, G. J. L.; Roos, W. H. Real-Time Assembly of Viruslike Nucleocapsids Elucidated at the Single-Particle Level. *Nano Lett.* **2019**, *19*, 5746–5753.

(45) Lorenzón, E. N.; Piccoli, J. P.; Cilli, E. M. Interaction between the Antimicrobial Peptide Aurein 1. 2 Dimer and Mannans. *Amino Acids* **2014**, *46*, 2627–2631.

(46) Engelberg, B. H.; Dudley, A. Plasma Heparin Levels in Normal Man. *Circulation* **1961**, *23*, 578–581.

(47) Calzolari, A.; Larocca, L. M.; Deaglio, S.; Finisguerra, V.; Boe, A.; Raggi, C.; Ricci-Vitani, L.; Pierconti, F.; Malavasi, F.; De Maria, R.; Testa, U.; Pallini, R. Transferrin Receptor 2 Is Frequently and Highly Expressed in Glioblastomas. *Transl. Oncol.* **2010**, *3*, 123–134.

(48) Fernandez, D. I.; Le Brun, A. P.; Whitwell, T. C.; Sani, M. A.; James, M.; Separovic, F. The Antimicrobial Peptide Aurein 1.2 Disrupts Model Membranes via the Carpet Mechanism. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 15739–15751.

(49) Ta, H.; Keller, J.; Haltmeier, M.; Saka, S. K.; Schmied, J.; Opazo, F.; Tinnefeld, P.; Munk, A.; Hell, S. W. Mapping Molecules in Scanning Far-Field Fluorescence Nanoscopy. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, No. 7977.

(50) Carreira, A.; Menéndez, M.; Reguera, J.; Almendral, J. M.; Mateu, M. G. In Vitro Disassembly of a Parvovirus Capsid and Effect on Capsid Stability of Heterologous Peptide Insertions in Surface Loops *. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 6517–6525.

(51) Judd, J.; Wei, F.; Nguyen, P. Q.; Tartaglia, L. J.; Agbandje-McKenna, M.; Silberg, J. J.; Suh, J. Random Insertion of MCherry Into VP3 Domain of Adeno-Associated Virus Yields Fluorescent Capsids With No Loss of Infectivity. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2012**, *1*, No. e54.

(52) Suchanova, J. Z.; Neburkova, J.; Spanielova, H.; Forstova, J.; Cigler, P. Retargeting Polyomavirus-Like Particles to Cancer Cells by Chemical Modification of Capsid Surface. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 307–313.

(53) Banerjee, D.; Liu, A. P.; Voss, N.; Schmid, S. L.; Finn, M. G. Multivalent Display and Receptor-Mediated Endocytosis of Transferrin on Virus-Like Particles. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1273–1279.

(54) Helenius, A. Virus Entry: Looking Back and Moving Forward. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 1853–1862.

(55) Freire, J. M.; Dias, S. A.; Flores, L.; Veiga, A. S.; Castanho, M. A. R. B. Mining Viral Proteins for Antimicrobial and Cell-Penetrating Drug Delivery Peptides. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 2252–2256.

(56) Rodrigues, M.; De, B. G.; Andreu, D.; Santos, N. C. Kinetic Uptake of Cell Penetrating Peptides in Lymphocytes and Monocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 4554–4563.

(57) Jones, S. W.; Christison, R.; Bundell, K.; Voyce, C. J.; Brockbank, S. M. V.; Newham, P.; Lindsay, M. A. Characterisation of Cell-Penetrating Peptide-Mediated Peptide Delivery. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145*, 1093–1102.

(58) Shen, Z.; Ye, H.; Yi, X.; Li, Y. Membrane Wrapping Efficiency of Elastic Nanoparticles during Endocytosis: Size and Shape Matter. *ACS Nano* **2019**, *13*, 215–228.

(59) Li, M.; Tao, Y.; Shu, Y.; Laroche, J. R.; Steinauer, A.; Thompson, D.; Schepartz, A.; Chen, Z.; Liu, D. R. Discovery and Characterization of a Peptide That Enhances Endosomal Escape of Delivered Proteins in Vitro and in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14084–14093.

(60) Calinescu, C.; Finkelstein, I. J.; Hernandez-garcia, A. CRISPR-Guided Programmable Self-Assembly of Artificial Virus-Like Nucleocapsids. *Nano Lett.* **2021**, *21*, 2752–2757.