

Encapsulación de la asparaginasa en partículas pseudovirales como estrategia para mejorar sus propiedades farmacológicas

Francisca Villanueva-Flores^{1,2*} y Alejandro Huerta-Saquero^{1*}

ISSN IMPRESO 2954-4327. ISSN ELECTRÓNICO 2992-7277
<https://dx.doi.org/10.58713/rf.v1i1.1> Ciudad de México

Resumen

La encapsulación de fármacos en nanoacarreadores es una prometedora técnica para mejorar la farmacocinética y farmacodinamia de enzimas con fines terapéuticos. Entre los diversos acarreadores se destacan el uso de partículas pseudovirales (VLPs) por su capacidad intrínseca de autoensamblaje, biodegradabilidad, biocompatibilidad, fácil modificación y escalabilidad. Se presentan los resultados que hemos obtenido en la encapsulación de la asparaginasa (ASNasa), una enzima ampliamente utilizada en el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda (LLA), en VLPs del bacteriófago P22 y del Virus del Mosaico del Bromo (BMV). Con esta tecnología se espera sea posible disminuir

las reacciones alérgicas asociadas al uso de la ASNasa, mejorar su estabilidad y prolongar su tiempo de vida media y en última instancia, ofrecer una formulación novedosa que prometa un mejor pronóstico a los pacientes con LLA.

Palabras clave:

Partículas pseudovirales, Asparaginasa, Leucemia Linfocítica Aguda, Bacteriófago P22, Virus del Mosaico del Bromo.

1 Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Km. 107 carretera Tijuana-Ensenada. 22860. Ensenada, BC. México.

2 Dirección actual: Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ave. Universidad 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, México. 62210.

* Autores de correspondencia: E-mail: francisca.villanueva@ibt.unam.mx ORCID 0000-0001-6092-4211, saquero@ens.cnyn.unam.mx ORCID 0000-0002-0156-6773

Introducción

La leucemia linfocítica aguda (LLA) es una proliferación maligna que se produce cuando los glóbulos blancos primitivos de origen linfoide se reproducen en la médula ósea, la sangre y los sitios extramedulares de manera descontrolada sin convertirse en linfocitos B y T maduros. La LLA es el principal cáncer infantil en pacientes menores de 14 años. En 2020 se diagnosticaron 6,955 casos nuevos de leucemia en México y se le considera uno de los 10 cánceres con mayor incidencia y mortalidad (1).

El tratamiento convencional comprende tres fases: 1) fase de inducción a la remisión (IR), 2) fase de consolidación y 3) fase de mantenimiento. La fase IR se define como aquella donde existe una presencia de menos del 5% de blastos en médula ósea, y donde se busca la restauración de la hematopoyesis normal mediante una quimioterapia combinada. En los esquemas infantiles, la asparaginasa (ASNasa) es un fármaco fundamental durante la fase IR. La administración por 26 a 30 semanas de ASNasa mejora la tasa de remisión en más del 90% (2). Sin embargo, en México se tiene una de las frecuencias de mortalidad durante la IR más elevadas del mundo e incluso si se compara con otros países en vías de desarrollo, probablemente debido al abandono del tratamiento con ASNasa asociado a los severos efectos secundarios y la falta de alternativas en el mercado mexicano (3).

La ASNasa (EC 3.5.1.1) es una enzima homotetramérica que cataliza la hidrólisis de asparagina (Asn) en aspartato (Asp) y amonio. El mecanismo de acción consiste en reducir la concentración de Asn disponible para las células, donde las células leucémicas son especialmente sensibles

a esta disminución en la concentración dados los bajos niveles de expresión de la asparagina sintetasa, lo que conduce a su muerte por apoptosis (4).

Entre los principales inconvenientes del uso de la ASNasa se encuentran las reacciones alérgicas asociadas a los 7-8 sitios de reconocimiento en la superficie de la enzima. Las reacciones de hipersensibilidad pueden ocurrir en el 30% a 75% de los pacientes y más del 70% desarrollan anticuerpos al sitio activo de la enzima, lo que conduce a la inactivación silenciosa del fármaco. Otros inconvenientes del uso de la ASNasa son los cortos tiempos de vida media en sangre, su rápida eliminación por el sistema reticuloendotelial, así como los efectos secundarios relacionados a la acumulación de amonio y la actividad de glutaminasa (5).

Para superar estas limitaciones se han propuesto nuevas formulaciones de ASNasa con propiedades mejoradas (eficacia, seguridad, tolerabilidad, estabilidad o dosificación) comparadas con el fármaco original. Estas formulaciones reciben el nombre de "biobetters". Hoy en día los biobetters son un excelente mercado en constante crecimiento, ya que son preparaciones patentables con un considerable menor tiempo y costo de desarrollo comparado con el biofármaco de referencia. El biofármaco de referencia de la ASNasa es aquel derivado de *E. coli* y comercializado como Elspar® desde 1978. Posteriormente, solo dos biobetters de ASNasa han sido lanzados al mercado. El primero una versión funcionalizada con polietilenglicol (PEG), Oncaspar®, aprobada en 1994 que ha resultado muy exitosa por tener una efectividad comparable al biofármaco de referencia y menor inmunogenicidad. Sin embargo, se

ha reportado la formación de anticuerpos antiPEG que conducen a la inactivación silenciosa. El segundo, una ASNasa de *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase®) en 2011, que también exhibe una menor inmunogenicidad, aunque éste no se vende en México, y su costo es muy elevado (6).

Una estrategia que recientemente ha cobrado atención para mejorar las propiedades de diversos biofármacos basados en enzimas, ha sido la nano- y micro- encapsulación, ya que la cápsula protege a la molécula cargo de la acción de proteasas del medio, incrementa el tiempo de vida media *in vivo* y en algunos casos, reduce su inmunogenicidad (7).

Se han utilizado diversas nano- y micro- cápsulas, cada una con ventajas y limitantes. La cápsula ideal deberá ser biocompatible, escalable, no inmunogénica, estable, de bajo costo, además debe permitir la dinámica enzimática y permitir la difusión del sustrato a través de la membrana de la cápsula. Entre las nano- y micro- cápsulas que se han estudiado destacan los liposomas (8); biopolímeros (9); polimerosomas (10); nanopartículas magnéticas (11); vesículas poliónicas (12); eritrocitos (13); nanoesferas huecas (14); y más recientemente partículas pseudovirales (VLPs) (15).

Las VLPs son estructuras de multiproteínas que mimetizan la arquitectura de los virus, pero al carecer de material genético éstas no pueden replicarse dentro de las células. A diferencia de otras nanopartículas, las VLPs pueden ser tanto química como genéticamente modificadas para desplegar antígenos en su superficie y ser usadas como vacunas. Asimismo, también pueden ser cargadas con fármacos, material genético o enzimas (16). A continuación, se presentarán los avances que hemos conseguido en nuestro grupo de trabajo con

el primer encapsulamiento reportado de la ASNasa en VLPs. Además, se discutirán las propiedades cinéticas, estabilidad y actividad antineoplásica de esta novedosa formulación de nanorreactores con actividad de ASNasa.

Resultados

Nuestro grupo de trabajo recientemente ha reportado la primera encapsulación de ASNasa en VLPs. La encapsulación genéticamente dirigida, se llevó a cabo mediante una doble transformación de *E. coli* (BL21 DE3/*pLysS*) con un plásmido que contiene la secuencia codificante para la ASNasa fusionada a la proteína de andamiaje (sp) (ASNasa-sp) y otro plásmido que contiene la secuencia de la proteína de capa del bacteriófago P22 (CP). Mediante una sobreexpresión diferencial de la ASNasa-sp seguida por la CP, se llevó a cabo el autoensamblaje *in vivo* de los nanorreactores ASNasa-P22 (**Fig. 1a**). Una micrografía electrónica de los nanorreactores ASNasa-P22 se muestra en la **Fig. 1b**. Se caracterizaron los parámetros cinéticos de la enzima encapsulada y se observó que el valor de la constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) fue 15 veces mayor respecto a la enzima libre. Esta diferencia indica que la afinidad por el sustrato de la enzima encapsulada disminuye probablemente debido a las limitaciones en la difusión del sustrato a través de las VLPs. Es importante destacar que la ASNasa encapsulada fue estable, mantuvo el 80% de su actividad hasta por 24 h a 37° C, independientemente de la presencia de 20% de suero sanguíneo humano (**Fig. 1c**). Además, se demostró que los nanorreactores ASNasa-P22 fueron tóxicos para las líneas celulares leucémicas MOLT-4 y Reh de manera directamente

proporcional a la concentración usada (**Fig. 1d**). Por lo anterior se demostró por primera vez que es posible encapsular ASNasa en VLPs, manteniendo su actividad antineoplásica y estabilidad en óptimas condiciones (15).

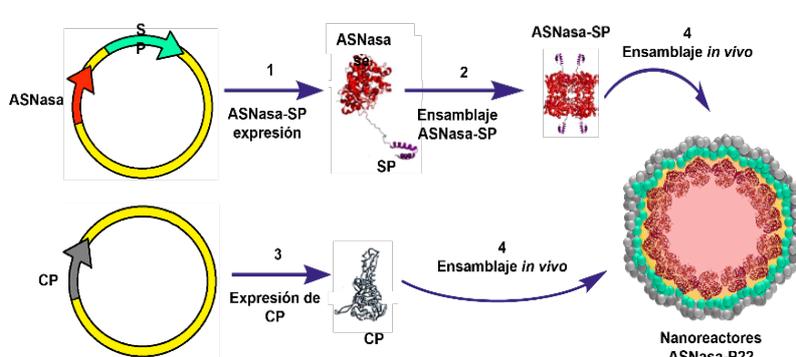


Fig. 1a

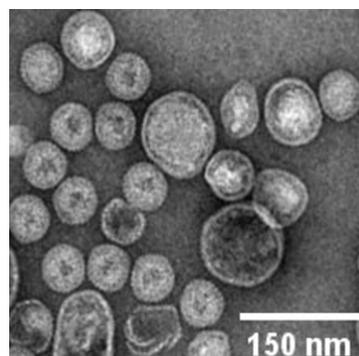


Fig. 1b

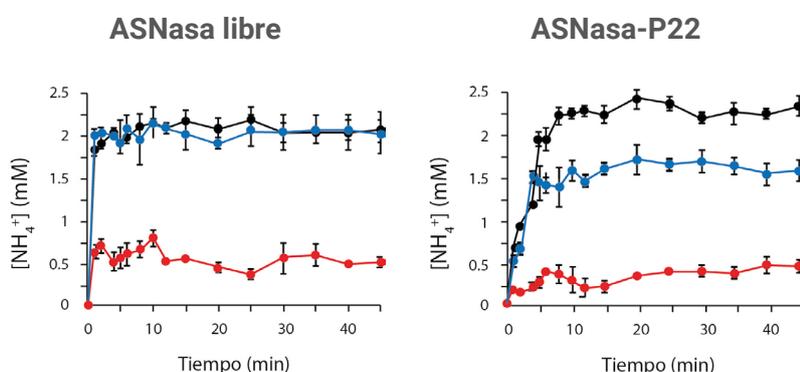


Fig. 1c

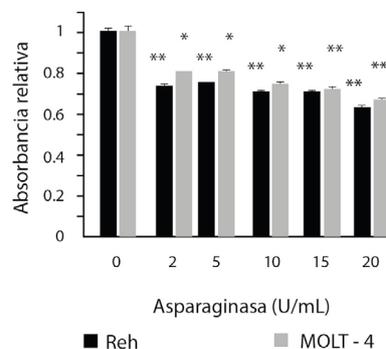


Fig. 1d

Fig. 1. Producción y caracterización de los nanobiorreactores ASNasa-P22. **a)** Esquema de la encapsulación genéticamente dirigida de la ASNasa en VLPs del bacteriófago P22. **b)** Micrografía electrónica de transmisión de los nanobiorreactores ASNasa-P22. **c)** Análisis de la estabilidad de ASNasa-P22 incubada a 37° C en presencia de 20% v/v de suero sanguíneo humano. Negro, 0 h; azul, 24 h; y rojo, 48 h. **d)** Análisis de la citotoxicidad de ASNasa-P22 hacia las líneas celulares humanas de leucemia linfocítica aguda MOLT-4 y Reh (n = 3). Las barras de error representan la desviación estándar. Las significaciones estadísticas se calcularon mediante un método bidireccional de análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey. (*) p<0.05, (**) p<0.01. Modificado de (Díaz-Barriga C., et al., 2021).

No obstante, este sistema posee un inconveniente que es la alta inmunogenicidad asociada a las VLPs del bacteriófago P22. Para disminuir la respuesta inmune hacia las VLPs, éstas han sido funcionalizadas en su superficie con moléculas, siendo una de las más eficaces el PEG. Sin embargo, se ha observado que pacientes a los que se

les ha administrado ASNasa funcionalizada con PEG, 13% presentaron alergias y 6-8% desarrollaron anticuerpos antiPEG lo que conduce a una inactivación silenciosa y abatimiento del efecto del biofármaco (17).

Un tipo de VLPs que resulta promisorio como una nano cápsula no inmunogénica

hacia mamíferos, son aquellas basadas en virus de plantas. Un ejemplo de ello son las VLPs derivadas del BMV bajo la hipótesis de que estos pasarán desapercibidos para el sistema inmune (datos no publicados). Recientemente, se ha demostrado que VLPs basadas en BMV no activan macrófagos *in vitro*, lo cual sugiere que las VLPs de BMV podrían ser menos inmunogénicas y aplicarse potencialmente como nanoacarreadores no inmunogénicos que abatan la inmunogenicidad intrínseca de la ASNasa (18).

En nuestro grupo de trabajo estamos explorando esta hipótesis y hemos logrado la encapsulación de la ASNasa también en BMV. El virus BMV pertenece al género de los bromovirus que infecta las plantas de cebada (*Hordeum vulgare*). BMV tiene un diámetro exterior de 28 nm y peso molecular de 4.6×10^3 kDa. Está constituido por una cápside icosaédrica formada por 180 proteínas idénticas que forman 12 pentámeros y 20 hexámeros (19).

En el laboratorio, el virus BMV se obtuvo y purificó según lo reportado (18). BMV posee la capacidad de autoensamblarse dependiendo de las condiciones de pH y fuerza iónica como se muestra en el diagrama de fases de la Fig. 2a. A baja fuerza iónica las proteínas del BMV se autoensamblan. A elevadas fuerzas iónicas y pH menores a 6.5 el virus se dilata y libera su material genético. A pH mayor de 6.5 y elevada fuerza iónica la cápside se desensambla por completo en monómeros y oligómeros.

Esta propiedad de autoensamblarse electrostáticamente regulado puede aprovecharse para el encapsulamiento de cargos de interés en el interior de las cápsides virales como la ASNasa. El procedimiento para el desensamblado de virus BMV y su posterior reensamblado en VLPs cargadas con ASNasa se muestra en la Fig. 2b. A la ASNasa encapsulada en VLPs de BMV les hemos denominado nanobiorreactores ASNasa-BMV y se muestran en la Fig. 2c.

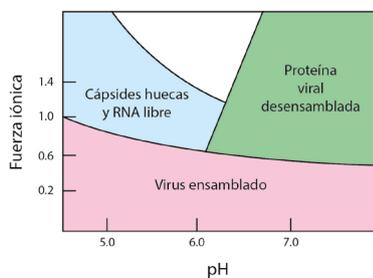


Fig. 2a

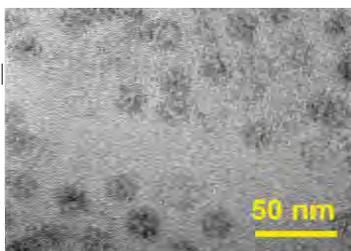


Fig. 2c

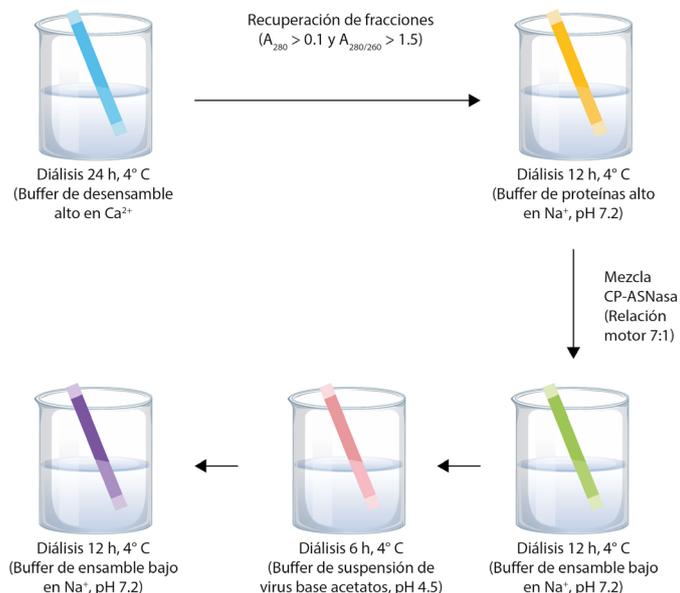


Fig. 2b

Fig. 2. Proceso de encapsulación de la ASNasa en VLPs del BMV. a) Diagrama de fases para el ensamble y desensamble de BMV. (Modificado de 20). b) Encapsulación de ASNasa en VLPs de BMV. c) Micrografía electrónica de transmisión de los nanobiorreactores ASNasa-BMV. (Resultados no publicados).

Se caracterizaron las propiedades cinéticas de los nanobiorreactores ASNasa-BMV encontrándose que la constante aparente de Michaelis-Menten (Km) es 1.7 veces mayor y la velocidad máxima (Vmax) 0.46 veces menor en el caso de la ASNasa encapsulada con respecto a la enzima libre. Esta diferencia podría indicar que la enzima encapsulada tiene una menor afinidad por el sustrato probablemente debido a que la cápside viral provoca una limitación en la difusión de la Asn, lo cual reduce la velocidad de la reacción (datos no mostrados).

Posteriormente se evaluó la citotoxicidad de los nanobiorreactores ASNasa-BMV hacia las líneas celulares leucémicas de linfoblastos humanos T (MOLT-4) (sensible a ASNasa) y células de linfoblastos humanos (Reh) (tolerantes a ASNasa) y se comparó su efecto con la enzima libre comercial. De acuerdo con nuestros resultados, los nanobiorreactores ASNasa-BMV y la ASNasa libre tuvieron una toxicidad comparable en ambas líneas celulares, siendo ligeramente mayor en la línea sensible que en la tolerante, como se esperaba. A las 24 h post tratamiento, ambas líneas expuestas a ASNasa libre o encapsulada disminuyeron su viabilidad 10%, mientras que a las 132 h MOLT-4 disminuyó 60% su viabilidad inicial y Reh 50% (datos no publicados).

Los resultados obtenidos en cultivos celulares abren la puerta para explorar la respuesta inmune hacia la ASNasa encapsulada en VLPs de BMV comparada con la enzima libre. Para ello estamos actualmente evaluando los niveles de anticuerpos tipo IgM (respuesta inmediata) e IgG (respuesta tardía) en ratones retados con nuestras formulaciones. Estos experimentos se están realizando en colaboración con la Dra. Laura A. Palomares, investigadora del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo los criterios del comité de bioética de dicho instituto según lo establecido por la NOM-062-ZOO-1999.

Conclusiones

Las formulaciones disponibles actualmente de ASNasa en el mercado generan frecuentemente reacciones alérgicas severas en los pacientes, lo que propicia el abandono del tratamiento e impide alcanzar la remisión de la LLA; por otro lado, no se venden en México y/o los costos pueden ser muy elevados. La falta de formulaciones alternativas clínica y económicamente viables en el mercado mexicano es un reto para la salud pública. De ahí la necesidad de ser autosuficientes en la producción de fármacos mexicanos que sean efectivos y accesibles para nuestra población. La nano- y micro- encapsulación de enzimas recientemente ha cobrado gran relevancia al conferir resistencia a proteólisis e incrementar el tiempo de vida media de las enzimas cargo en suero sanguíneo. Nuestro grupo de trabajo es pionero en la encapsulación de la ASNasa en VLPs del bacteriófago P22 y BMV. Estas novedosas formulaciones se encuentran actualmente en ensayos preclínicos con ratones para determinar de manera rigurosa su inmunogenicidad y bioseguridad. Esperamos que nuestros resultados sirvan de base para futuros ensayos clínicos, y en última instancia fructifiquen en una tecnología mexicana para el beneficio social.

Financiamiento

PAPIIT-DGAPA UNAM (IN210618). Villanueva-Flores F, recibió una beca postdoctoral DGAPA durante su estancia postdoctoral.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Referencias

1. Alpar HO, Lewis DA. Therapeutic efficacy of asparaginase encapsulated in intact erythrocytes. *Biochem Pharmacol.* 1985; 34(2):257-61. doi: 10.1016/00062952(85)90133-9
2. Avramis VI, Tiwari PN. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int J Nanomedicine.* 2006; 1(3):241–254.
3. Bancroft JB, Hiebert E, Bracker CE. The effects of various polyanions on shell formation of some spherical viruses. *Virology.* 1969; 39(4):924-30. doi: 10.1016/0042-6822(69)90029-4
4. Broome J. Evidence that the L-Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma Effects. *Nature.* 1961; 191:1114–1115. doi: 10.1038/1911114a
5. Bueno CZ, Apolinário AC, Duro-Castano A, et al. L-Asparaginase Encapsulation into Asymmetric Permeable Polymersomes. *ACS Macro Lett.* 2020; 9(10):1471–1477. doi: 10.1021/acsmacrolett.0c00619
6. Chauhan K, Hernandez-Meza JM, Rodríguez-Hernández AG, et al. Multifunctionalized biocatalytic P22 nanoreactor for combinatory treatment of ER+ breast cancer. *J Nanobiotechnology.* 2018; 16(1):doi: 0345-2 10.1186/s12951-01817.
7. Crespo-Solis E, Espinosa-Bautista K, Alvarado-Ibarra M, et al. Survival analysis of adult patients with ALL in Mexico City: first report from the Acute Leukemia Workgroup (ALWG) (GTLA). *Cancer medicine.* 2018; 7(6):2423–2433. doi: 10.1002/cam4.1513
8. Cruz MEM, Gaspar MM, Lopes F, et al. Liposomal l-asparaginase: in vitro evaluation. *Int. J. Pharm.* 1993; 96(1-3):67-77. doi: 10.1016/0378-5173(93)90213-Y 10
9. Díaz-Barriga C, Villanueva-Flores F, Quester K, et al. Asparaginase-Phage P22 Nanoreactors: Toward a Biobetter Development for Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment. *Pharmaceutics.* 2021; 13(5):604. doi: 10.3390/pharmaceutics13050604
10. Tong WH, Pieters R, Tissing WJ, van der Sluis IM. Desensitization protocol should not be used in acute lymphoblastic leukemia patients with silent inactivation of PEGasparaginase. *Haematologica.* 2014 Jul; doi: 10.3324/haematol.2013.099663.
11. Gaspar MM, Blanco D, Cruz MEM, et al. Formulation of l-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. *J. Control. Release.* 1998; 52(1-2):53-62. doi: 10.1016/S0168-3659(97)00196-X
12. GLOBOCAN. Cancer in Mexico Factsheet 2020. Citado el 22 de septiembre del 2021. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/home>
13. Ha W, Meng XW, Li Q, et al. Self-assembly hollow nanosphere for enzyme encapsulation. *Soft Mat.* 2010; 6:14051408. doi: 10.1039/B925747K
14. Heo YA, Syed YY, Keam SJ. Pegaspargase: A Review in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Drugs.* 2019; 79(7):767777. doi: 10.1007/s40265-019-01120-1

15. Kato M, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int.* 2018; 60(1):4-12. doi: 10.1111/ped.13457
16. Lin HK, van der Schoot P, Zandi R. Impact of charge variation on the encapsulation of nanoparticles by virus coat proteins. *Phys Biol.* 2012; 9(6):066004. doi: 10.1088/1478-3975/9/6/066004
17. Mu X, Qiao J, Qi L, et al. Poly(2-vinyl-4,4-dimethylazlactone)-functionalized magnetic nanoparticles as carriers for enzyme immobilization and its application. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014; 6(23):21346-54. doi: 10.1021/am5063025
18. Nuñez-Rivera A, Fournier PGJ, Arellano DL, et al. Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein J Nanotechnol.* 2020; 11:372-382. doi:10.3762/bjnano.11.28
19. Sueyoshi D, Anraku Y, Komatsu T, et al. Enzyme-Loaded Polyion Complex Vesicles as in Vivo Nanoreactors Working Sustainably under the Blood Circulation: Characterization and Functional Evaluation. *Biomacromolecules.* 2017;18(4):1189-1196. doi: 10.1021/acs.biomac.6b01870
20. Ulu A, Ates B. Immobilization of L-Asparaginase on Carrier Materials: A Comprehensive Review. *Bioconj Chem.* 2017; 28(6):1598-1610. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00217