



New pharmaceutical formulations from nanotechnology for cancer treatment based on gene therapy strategies

Title in Spanish: *Nuevas formulaciones farmacéuticas basadas en la nanotecnología dirigidas al tratamiento del cáncer mediante estrategias de terapia génica*

Mercedes Fructuoso¹, Laura Blanco¹, Conchita Tros de Ilarduya^{1,*}

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra. C/ Irunlarrea s/n, 31080 Pamplona.

ABSTRACT: In this project we have characterized and evaluated the *in vitro* and *in vivo* transfection efficiency of lipid/DNA (lipoplexes) and PEI 25/DNA (poliplexes), formed with the ligands transferrin and asialofetuin, and the peptide protamine. Both types of complexes were characterized showing an homogeneous particle size in the nanometer range and positive surface charge. It has been shown a good transfection efficiency of transferrin and asialofetuin formulations, and in all cases transfection further increased in the presence of ligands with protamine. In HepG2 cells (human hepatoblastoma) we have obtained the best transfection efficiency with both lipoplexes and polyplexes in the presence of asialofetuin with protamine. In HeLa cells (human cervix-uterine carcinoma) and CT-26 (murine colon carcinoma) the best results were obtained in the presence of transferrin with protamine. The toxicity of lipoplexes was much lower than poliplexes both *in vitro* and *in vivo*. After 24 hours of intravenous injection of lipoplexes, gene expression led us to specific transfection in the lung with the transferrin-protamine formulation, and in the liver in the case of the administration of asialofetuin-protamine complexes. The good transfection efficiency and high viability *in vitro* and *in vivo* indicates that lipoplexes could be an interesting alternative to viral vectors in the treatment of some diseases through gene therapy strategies.

RESUMEN: La acción terapéutica de un gen vehiculizado en diferentes formulaciones galénicas depende de forma relevante de su correcta liberación desde la forma farmacéutica y de su correcta llegada al lugar de acción. Por ello, un adecuado diseño de este tipo de formulaciones constituye un factor decisivo en la investigación farmacéutica. Las formulaciones preparadas en este trabajo han sido diseñadas con el fin de ser aplicadas a la terapia de una enfermedad de gran relevancia, como es el cáncer. La liberación de genes terapéuticos vehiculizados en estas nuevas formulaciones farmacéuticas se presenta como una prometedora alternativa en el tratamiento de esta enfermedad. Las formulaciones estudiadas reducen considerablemente el tamaño del DNA y su carga final positiva favorece la entrada en la célula por endocitosis. Son formulaciones estables, fáciles de preparar (incluso a gran escala), presentan una morfología homogénea y condensan el DNA de manera eficaz. Las formulaciones desarrolladas son capaces de proteger el material genético de la degradación por las nucleasas presentes en el suero. Por otra parte, se ha demostrado que las nuevas formulaciones son capaces de transferir material genético a las células tumorales de hepatocarcinoma humano, carcinoma de cérvix y de cáncer de colon murino. Se debe también tener en cuenta que, en ocasiones, muchos de los vectores que presentan una alta eficacia de transferencia de genes también poseen una alta toxicidad y/o inmunogenicidad, como sería el caso de los sistemas basados en virus. Frente a esto, otra ventaja importante de estos sistemas es su baja citotoxicidad.

*Corresponding Author: ctros@unav.es

Received: March 6, 2018 Accepted: March 19, 2018

Premio CINFA en el Concurso Científico 2017 de la RANF.

An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 1 (2018), pp. 72-85

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Concepto de terapia génica

La terapia génica es la administración de ácidos nucleicos con fines terapéuticos. Supone el tratamiento de una enfermedad mediante la transmisión de material génico a células específicas de un paciente con el fin de

corregir, activar o generar una nueva actividad, proporcionando una terapia alternativa a los fármacos convencionales para el tratamiento de enfermedades genéticas hereditarias, adquiridas, infecciosas o metabólicas. Podemos diferenciar dos tipos de terapia génica según las células sobre las que se actúe.

La terapia génica **somática** consiste en la inserción de

genes funcionales ausentes en el individuo. Se realiza en todas las células y tejidos del organismo con el objetivo de tratar una enfermedad o realizar un marcaje, de manera que las modificaciones introducidas, si consiguen perdurar en la célula, no son heredables y solo tienen lugar en dicho paciente.

La terapia génica **germinal**, por otro lado, provoca que la expresión génica del material genético administrado se mantenga en los descendientes. Actualmente existen muchos conflictos éticos y jurídicos con este tipo de terapia génica en líneas celulares germinales, por lo que no está permitida.

Las formas de administración que existen en terapia génica son las terapias *in vivo* y *ex vivo*. La que mejores resultados obtiene es la terapia *ex vivo*, que consiste en la extracción de una muestra del paciente, su tratamiento, y posterior reimplantación. Aun así, es la alternativa más costosa y presenta un alto riesgo de contaminación tanto de la formulación como de las células en cultivo. Sin embargo, la terapia *in vivo* permite la administración directa de la formulación con un coste menor y disminuyendo el riesgo de inmunogenicidad.

Existen gran cantidad de enfermedades que se pueden tratar con terapia génica. Algunas de ellas son enfermedades metabólicas como el cáncer, inmunodeficiencias, hemofilias, hipercolesterolemia familiar, etc., o enfermedades infecciosas como el SIDA. El cáncer es una de las enfermedades más estudiadas en el campo de la biomedicina. Las diferentes alternativas de las que se disponen hoy en día a la hora de combatir esta enfermedad incluyen la inactivación de oncogenes, la administración de genes supresores de tumores, las terapias suicidas, inmunoterapias génicas, terapias génicas antiangiogénicas y las basadas en telomerasa entre otros tipos. Aunque todavía en desarrollo, estas técnicas, sobre todo en combinación con otras terapias más convencionales, como la quimio o radioterapia, prometen ser eficaces en un futuro próximo, ya que su diversidad y sobre todo su especificidad permiten una precisión respecto al tumor en tratamiento que no alcanzan otras terapias antitumorales.

1.2. Vectores en terapia génica

Uno de los procesos más importantes en terapia génica es la introducción del gen terapéutico en la célula diana, de forma que se alcance el núcleo. Es importante tener en cuenta, que la entrada de ADN exógeno desencadena una respuesta inmunológica que puede generar procesos inflamatorios y activar la inmunidad humoral y celular. Desde hace tiempo se dispone de diversos métodos para introducir material genético en células eucarióticas, pero algunos como la electroporación, no son adecuados para la terapia génica, debido a la gran mortalidad que producen en las células o a la dificultad que implica su aplicación *in vivo*. Los métodos más eficientes y apropiados son los que se basan en el uso de vectores, elementos capaces de transportar el material genético dentro de sí y ser captados por la célula, de forma que el material aportado pase al

interior de ésta. Actualmente los tipos de vectores empleados en terapia génica son virales o no virales (1,2).

1.2.a. Vectores virales

Los vectores virales se basan en virus que han sufrido modificaciones. Se elimina del virus su capacidad de replicación y todo efecto patogénico en su estado natural, sin afectar a su capacidad de infectar la célula huésped e introducir en ella el material genético que contienen. Aunque los vectores virales han demostrado una gran capacidad de transferencia génica, son deficientes en otras áreas igual de imprescindibles. Por ejemplo, los vectores adenovirales inducen respuestas inflamatorias e inmunológicas, por lo que son rechazados en cuanto a la utilización en el caso de administraciones repetidas. El empleo de vectores no virales evita este tipo de problemas, por lo que la búsqueda actual de vectores no basados en virus se ha potenciado (1).

1.2.b. Vectores no virales

Son compuestos capaces de formar complejos con el ADN y unirse a la membrana celular para depositarlo dentro de la célula. La formulación no viral debe tener presente los obstáculos que aparecen en las sucesivas etapas que intervienen entre el exterior de la célula diana y el núcleo de ésta. Los problemas a tener en cuenta son entre otros: compactación del material genético y su defensa ante agentes mecánicos y enzimáticos extracelulares, asociación del material genético a la superficie celular para facilitar su entrada, transfección del material genético exógeno en el núcleo y su integración en el genoma celular, y finalmente un factor a superar muy importante, el transporte por la sangre. La transfección con un vector no viral se ve limitada por el suero de la sangre que genera una interacción inespecífica y provoca una modificación de los niveles de transfección tanto en el organismo como en cultivos celulares. Los diferentes tipos de vectores no virales se han diseñado para suplir todas estas condiciones, pero también es posible que se ignore la existencia de alguna barrera más que no sea del todo eficiente o se encuentre ausente a la hora de la transferencia. Dentro de este grupo de vectores se encuentran los lípidos catiónicos, polímeros, y péptidos, con los que trabajamos en este proyecto. La contrapartida que comprende este tipo de vectores es la baja capacidad de transfección debido al gran número de barreras a superar (3), pero en cualquier caso, su buena biocompatibilidad y su potencial producción a gran escala hacen que sean la mejor apuesta. Debido a que aún no hay un vector no viral que consiga vencer las diferentes barreras que existen en el organismo y sea útil en un amplio abanico de enfermedades, se hace necesario investigar los mecanismos de transfección y diseñar nuevos sistemas de liberación de genes específicos y seguros (1).

a) Vectores lipídicos

Un buen ejemplo de vectores no virales son los vectores lipídicos. Los liposomas catiónicos pueden formar complejos con el ADN formando lipoplejos a

través de una combinación de interacciones electrostáticas. Sin embargo, estos vectores carecen de especificidad tumoral y muestran una baja eficiencia de transfección *in vivo* en comparación con los vectores virales (4). Como se ha demostrado recientemente los lipoplejos a base de lípidos catiónicos, son partículas más estables. Para su preparación se requieren compuestos que presenten, por un extremo, un grupo extremadamente polar y por el otro una pareja de ácidos grasos (por ejemplo, colesterol). Al hidratarse, estos compuestos catiónicos son capaces de formar complejos con esta molécula de naturaleza polianiónica para formar vesículas de doble membrana, con los grupos polares situados tanto en el exterior como en el interior, por donde se asocian con el ADN. La estructura de los lipoplejos facilita que al contacto del liposoma con la célula, ambas estructuras se fundan y el contenido del liposoma sea directamente vertido en el citoplasma. Dentro de los vectores no virales, los lipoplejos constituyen la alternativa más prometedora en terapia génica. Cumplen cuatro objetivos muy importantes como vectores: protección de la degradación por DNAsas y condensación del ADN; mediar en la adhesión celular al superar la polaridad generalmente negativa de la mayoría de las superficies celulares; y facilitar la localización intracitoplasmática de la molécula de ADN (5). Sin embargo, defectos en la formación del lipoplejo y la exposición del ácido nucleico pueden dar lugar a agregados y por lo tanto, a una eficiencia de transfección deficitaria.

Dada la diversidad en los posibles mecanismos de entrada, es de interés determinar si las propiedades físico-químicas de las nanopartículas definen la trayectoria de entrada. Claramente, el tamaño de partícula representa un importante parámetro que contribuye en este proceso de internalización. Es importante destacar que las nanopartículas basadas en lípidos, formuladas con ADN, tienen un diámetro comprendido entre 80-120 nm, ideal para su uso *in vivo*. Es bien sabido que ciertos péptidos como la protamina, actúan como condensadores del ADN, pudiendo disminuir el tamaño de partícula, y manteniéndolos en un rango nanométrico ideal, que parece estar directamente relacionado con la eficacia de transfección (6). Además, también contribuye a la protección frente a la degradación por DNAsas. Por otra parte, la protamina presenta señales de localización nuclear (SLN) con alto contenido de arginina que mejora la entrada de ADN al núcleo. Se ha demostrado que este alto contenido de arginina mejora los sistemas de suministro de genes virales y no virales, aunque no ha respondido favorablemente cuando se ha utilizado únicamente la arginina (7).

b) Vectores poliméricos

Entre los vectores poliméricos más utilizados, existen los basados en polietilenimina ramificada de 25 kDa. La

polietilenimina se une al ADN formando los llamados poliplejos, los cuales han sido muy utilizados ya que eran muy prometedores, al conseguir la liberación del ADN de una forma eficiente tanto *in vitro* como *in vivo* (8). Este polímero es un compuesto, que debido a la presencia en su estructura de un nitrógeno triplemente protonado le confiere una alta capacidad amortiguadora que hace que los poliplejos de PEI 25 permitan que el material genético no sea degradado por el medio ácido de los endosomas y se libere fácilmente. Dado que la eficacia de entrada y liberación intracelular puede depender del tamaño de partícula, la polidispersión de una formulación puede contribuir también a la eficiencia de entrega del material en el citoplasma, por lo que dependerá además de la naturaleza de la partícula. En concreto, la liberación de ADN a partir de los poliplejos, se puede comparar al denominado efecto de “esponja de protones”, mientras que los lipoplejos a base de lípidos catiónicos poseen mecanismos de disrupción endosomal que facilitan la liberación del ADN en el citosol tras la endocitosis (2). Otros autores han concluido que tanto la línea celular como el tipo de polímero y formulación utilizada, influyen en la expresión génica del vector administrado (8). En cuanto a la toxicidad que presentan los complejos de PEI, están implicados ciertos parámetros como el peso molecular y el grado de ramificaciones del polímero, así como el tamaño y la carga superficial de las formulaciones. Se han hecho experimentos que demuestran que estos complejos presentan alta toxicidad (9).

1.3. Direccionamiento de vectores mediante la utilización de ligandos

La mayoría de los objetivos en transferencia génica consisten en tomar como estrategia la liberación del material genético en un órgano o tejido específico (10). Existen múltiples moléculas que entran en las células a través de un proceso que comienza por la unión a receptores de membrana. La interacción ligando-receptor es específica (Figura 1). Se han hecho múltiples estudios de competición en los que se observa cómo tras el bloqueo de los receptores, dichas moléculas no entran en las células. Con el objetivo de aumentar la especificidad y la eficacia de transfección génica, durante los últimos años se ha estudiado cómo afecta la unión de determinados ligandos a la superficie de los vectores en el proceso de liberación del material genético, como por ejemplo, asialoglicoproteínas, la transferrina, el ácido fólico, la insulina, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), entre muchos otros. Una de las estrategias perseguidas en este estudio, ha sido introducir el ADN en las células mediante un ligando y explotar la especificidad natural de una endocitosis mediada por receptor (5).

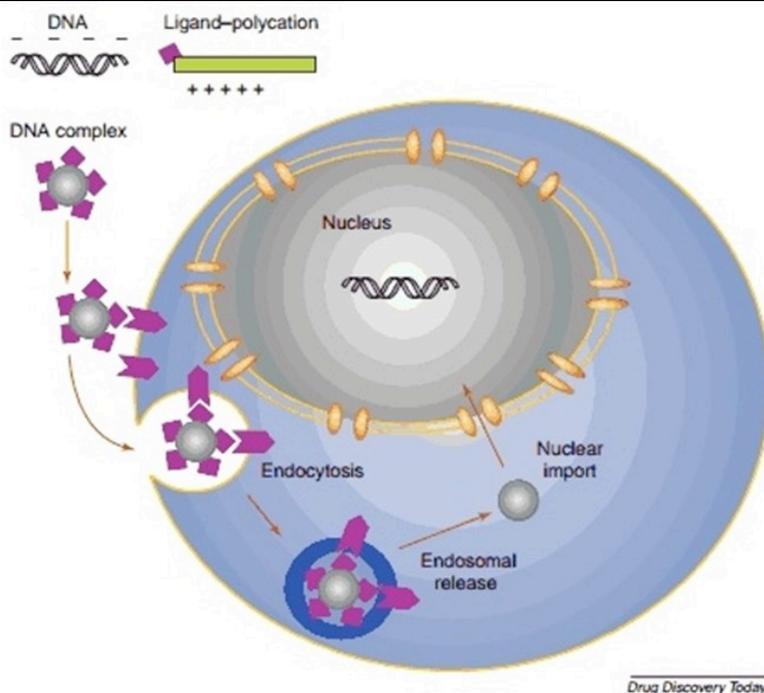


Figura 1. Transporte al interior del núcleo para acceder a la maquinaria de transcripción nuclear (13).

La transferrina es sintetizada en el sistema retículo endotelial (S.R.E.), pero principalmente en el hígado, por lo que el proceso de endocitosis mediada por receptor ha sido descrito especialmente en los hepatocitos. Los lipoplejos con transferrina han demostrado ser una prometedora estrategia de focalización (4). Existe sobreexpresión de este receptor en la superficie de las células tumorales, por lo que su utilización como ligando estaría más que justificado para obtener tratamientos más específicos. Otra estrategia ha sido la utilización de asialofetuína, una proteína que se une a las partículas mediante la unión por interacciones electrostáticas. Las fenestraciones del endotelio de los capilares del hígado son ventajosas a la hora de direccionar las partículas. Las células del parénquima (hepatocitos) tienen asialoglicoproteínas, receptores capaces de reconocer cadenas de galactosa. La asialofetuína es una molécula de glicoproteína que posee varias cadenas del azúcar galactosa, lo cual implica un reconocimiento específico entre la asialofetuína y los receptores de asialoglicoproteínas de los hepatocitos (11). Estos receptores se encuentran sobreexpresados en el caso de un hígado enfermo, por lo tanto es una estrategia interesante en el tratamiento del cáncer de hígado (6). En general, la terapia génica es una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer, que requiere de dos entidades principales, el gen terapéutico y vector responsable de su transporte y entrega en la célula diana de forma intacta. Aunque hay una variedad de vectores disponibles que muestran una eficaz transferencia genética en cultivos celulares, la entrega eficiente y la especificidad *in vivo* sigue siendo el principal objetivo a alcanzar (12).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material

2.1.a. Material génico

El ADN plasmídico (ADNp) utilizado que contiene el gen de la luciferasa bajo el promotor del citomegalovirus (CMV) pCMV-Luc (VR-1216) es de Promega Corporation (EE.UU.). Su crecimiento se llevó a cabo en *Escherichia coli* y su purificación utilizando Quiagen EndoFree® Plasmid Giga Kit (Alemania), de acuerdo con el protocolo del fabricante, como se explica en el apartado de “métodos”.

2.1.b. Productos y reactivos

En la elaboración de los liposomas se utilizaron los lípidos catiónicos 1,2- Dioleoiloxi-3-(trimetilamonio) propano (DOTAP) de Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL (EE.UU.) y colesterol de Sigma-Aldrich (EE.UU.). Para la elaboración de las distintas formulaciones de lipoplejos se utilizaron los ligandos transferrina humana, de Becton Dickinson (EE.UU.), y asialofetuína y el péptido protamina, ambos de Sigma-Aldrich (EE.UU.). La cuantificación del ADNp se realizó utilizando el NanoDrop™ ND-1000 de Thermo Fisher Scientific Inc. (EE.UU.). Para formular los poliplexos se utilizó polietilimina ramificada de 25 kDa de Aldrich Chemical Company, Inc (EE.UU.). En los ensayos de viabilidad se utilizó el reactivo “Alamar Blue” de Accumed International Companies (Westlake, OH, EE.UU.).

2.1.c. Cultivos celulares

Las células HepG2 (hepatocarcinoma humano), HeLa (cáncer cérvico-uterino humano) y CT-26 (cáncer de colon

murino), utilizadas en los ensayos *in vitro*, se obtuvieron de American Type Culture Collection, MD (EE.UU.). Se mantuvieron a 37°C con un 5% de CO₂ en un incubador Forma Scientific, Inc, CO₂ Water Jacked Incubator 3121 (EE.UU.), y crecieron en DME-10, Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose con 4500 mg/L de glucosa y Glutamax-I, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Como tampón fosfato se utilizó PBS (pH 7,4, 0,15 M). Todos los productos se obtuvieron de Gibco BRL (Reino Unido).

2.2. Métodos

2.2.a. Purificación del ADNp

El plásmido utilizado en los experimentos fue el pCMV-Luc. Para su crecimiento y purificación se tomó una unidad formadora de colonias de una cepa de *Escherichia coli* modificada y se hizo crecer primero en 5 ml de precultivo LB Broth (1% p/v de triptona, 0,5% p/v de extracto de levadura y 1% de NaCl) con 50 µg/ml de kanamicina durante 4 horas a 37°C y después en 2 L del mismo medio durante 12 horas a la misma temperatura y en agitación en un agitador Shaker 625, New Brunswick Scientific, Co. Inc, Edison (EE.UU). Tras la centrifugación de las bacterias a 6000 g y 4°C durante 15 minutos en una centrífuga Beckman J2-HS, la purificación se llevó a cabo con el Quiagen EndoFree® Plasmid Giga Kit de acuerdo con el protocolo del fabricante hasta conseguir el plásmido, que fue resuspendido en 1 ml de agua estéril. La determinación de la pureza y concentración del plásmido se realizó utilizando el NanoDrop™ ND-1000 de Thermo Fisher Scientific Inc. (EE.UU.).

2.2.b. Preparación y caracterización físico-química de los vectores lipídicos y poliméricos

En la preparación de los poliplexos, se partió del polímero PEI 25 (10 mM) que se disolvió en agua estéril (pH 7,4, HCl 1 N), se filtró por un dispositivo Millipore 0,22 µm Corning® N414831 (Alemania) y se conservaron a 4°C hasta su utilización. Para la preparación de los liposomas, DOTAP: Colesterol (1:0,9), se partió de una solución de lípidos (5 mg/ml) en cloroformo. Tras la eliminación del disolvente a presión reducida mediante el uso de un rotavapor, el film de lípidos resultante se hidrató con tampón HEPES 10 Mm (pH 7,4) glucosado al 10% (p/v). Las vesículas resultantes se filtraron a través de una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm de diámetro, y de dos filtros de apoyo (Avanti, Polar Lipids, Inc. (EE.UU.)). Finalmente, los liposomas se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Los complejos poliméricos para los ensayos *in vitro* se realizaron a una relación PEI 25/ADN N/P 4, añadiéndose 4 grupos protonables por cada grupo fosfato negativo del ADNp. Por otro lado, los lipoplejos, se prepararon a una relación de cargas lípido/ADN (+/-) 5/1. En total se realizaron 10 formulaciones por simple mezcla de los componentes, 5 de poliplexos y 5 de lipoplejos, que se describen a continuación:

- Formulación 1
PEI 25
- Formulación 2
PEI 25 + transferrina (32 µg/µg ADN)
- Formulación 3
PEI 25 + transferrina (32 µg/µg ADN) + protamina (0,5 µg/µg ADN)
- Formulación 4
PEI 25 + asialofetuína (0,5 µg/µg ADN)
- Formulación 5
PEI 25 + asialofetuína (0,5 µg/µg ADN) + protamina (0,4 µg/µg ADN)
- Formulación 6
DOTAP/Colesterol
- Formulación 7
DOTAP/Colesterol + transferrina (32 µg/µg ADN)
- Formulación 8
DOTAP/Colesterol + transferrina (32 µg/µg ADN) + protamina (0,5 µg/µg ADN)
- Formulación 9
DOTAP/Colesterol + asialofetuína (0,5 µg/µg ADN)
- Formulación 10
DOTAP/Colesterol + asialofetuína (0,5 µg/µg ADN) + protamina (0,4 µg/µg ADN)

Todas las formulaciones están realizadas con una concentración de ADN de 10 µg/ml.

Los ligandos transferrina y asialofetuína, y el péptido protamina, se adicionaron siempre a DOTAP/Colesterol o a PEI 25, según la formulación. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió la cantidad de plásmido y tampón HEPES (c.s.p 200 µl) y se mezcló suavemente.

En cuanto a la caracterización fisicoquímica, el tamaño de partícula y el potencial zeta (carga superficial), tanto de los liposomas como de los lipoplejos y los poliplexos, se determinaron en búffer HEPES glucosado por difractometría de láser utilizando un analizador de partículas denominado Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments Inc., Reino Unido). Las medidas se realizaron por triplicado.

2.2.c. Estudios de transfección *in vitro*

Para los estudios *in vitro* se utilizaron células HepG2 (hepatocarcinoma humano), HeLa (cáncer cérvico-uterino humano) y CT-26 (cáncer de colon murino). Se platearon 1 x 10⁵ células por pocillo en placas Costar® 3548, 48 WellCell Culture Cluster (EE.UU.), suspendidas en DME-10, 300 µl de DME-10 y 200 µl del complejo correspondiente (conteniendo 1 µg de ADN). Tras 4 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se retiró el medio de transfección y se añadió DME-10 para la expresión del gen de la luciferasa durante 48 horas. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se lisaron con 100 µl de buffer de lisis 1X (RLB, Reporter Lysis Buffer), de Promega (EE.UU.). A continuación, se sometieron a dos

ciclos de congelación-descongelación a -80°C , se recogieron en tubos eppendorfs y se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos. Mediante el análisis en el luminómetro Sirius, Berthold detection system (Alemania), se determinaron los ng de luciferasa por mL en base a una recta patrón previamente calculada. Se normalizaron los resultados calculando los mg de proteína mediante el kit Bio-Rad DC™ Protein Assay.

2.2.d. Evaluación de la toxicidad de los poliplexos y lipoplejos

La viabilidad celular fue cuantificada mediante el ensayo “Alamar Blue”. 1 ml al 10% de “Alamar blue” resuspendido en DME-HG suplementado con un 10% (v/v) de suero fue añadido por pocillo 48 horas post-transfección. Después de 2,5 horas de incubación a 37°C , 200 μl del sobrenadante fueron analizados mediante la medida de la absorbancia a 570 y 600 nm. La viabilidad celular fue calculada según la fórmula $(A_{570}-A_{600})$ de las células tratadas $\times 100/(A_{570}-A_{600})$ de las células control.

2.2.e. Estudios *in vivo*

Todos los animales utilizados en este estudio fueron aprobados y controlados por el Comité Ético para la Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Navarra (protocolo ético, 075-11), y tratados de acuerdo a las guías de protección animal. Se utilizaron ratones hembra Balb-C de Harlan Ibérica Laboratories, (Barcelona, España). Se inyectó por ratón un volumen de 200 μl de complejo que contenía 60 μg de ADN. Todas las administraciones fueron llevadas a cabo mediante inyección en la vena de la cola.

En la preparación de los lipoplejos para su utilización *in vivo*, se tuvo en cuenta la caracterización fisico-química, ya que es importante el control de posibles agregados en las formulaciones, que puede provocar la muerte del animal. Para ello, preparamos las formulaciones y las centrifugamos en Amicones® 30K, de Merck Millipore Ltd. (Alemania). El tamaño de partícula y el potencial zeta se determinaron por difracción de láser utilizando un analizador de partículas denominado Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments Inc., Reino Unido). Las medidas se realizaron por triplicado. Para la cuantificación *ex vivo* de la actividad de la luciferasa, los animales fueron sacrificados 24 horas después de la administración de las formulaciones. Para evaluar la

distribución y la capacidad de transfección de los complejos *in vivo* se extrajeron los órganos corazón, hígado, pulmón y bazo, y se procedió de la misma manera indicada para la determinación de la expresión de luciferasa *in vitro*.

3. RESULTADOS

3.1. Formulaciones poliméricas.

3.1.a. Caracterización fisico-química

El tamaño de partícula se analizó mediante difracción de rayos láser. Se prepararon formulaciones con polietilimina 25 kDa (PEI 25) y el plásmido que codifica para la luciferasa a relación N/P 4. Se realizó un seguimiento de las partículas a lo largo del tiempo para asegurar que el tamaño y el potencial zeta eran constantes hasta el momento de su utilización. Se comprobó que, tanto el diámetro como el potencial zeta eran idóneos para realizar los ensayos *in vitro* e *in vivo* preparándose 5 formulaciones distintas:

Formulación 1

PEI 25

Formulación 2

PEI 25 + transferrina (32 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ADN)

Formulación 3

PEI 25 + transferrina (32 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ADN) + protamina (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ADN)

Formulación 4

PEI 25 + asialofetuína (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ADN)

Formulación 5

PEI 25 + asialofetuína (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ADN) + protamina (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ADN)

Todas las formulaciones están realizadas a una concentración de ADN de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

El tamaño obtenido fue óptimo para realizar las transfecciones al igual que el potencial zeta. La adición de los ligandos transferrina y asialofetuína no modificaron significativamente el tamaño de partícula. Sin embargo, sí podemos ver que al añadir transferrina, el potencial zeta disminuye, y que en el caso de la asialofetuína este valor no varía. El potencial zeta siempre fue positivo, el tamaño nanométrico y la polidispersión fue buena, manteniéndose siempre menor a 0,35 (Tabla 1).

Tabla 1. Tamaño y potencial zeta de los poliplexos en las distintas formulaciones.

Formulaciones	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)
Formulación 1	134 \pm 6	26 \pm 1
Formulación 2	129 \pm 19	3 \pm 0
Formulación 3	216 \pm 13	5 \pm 2
Formulación 4	100 \pm 19	26 \pm 0
Formulación 5	179 \pm 18	25 \pm 0

3.1.b. Evaluación de la transfección de los complejos *in vitro*

La evaluación de la transfección de los poliplexos preparados con PEI 25 y un gen reportero codificante de la luciferasa se realizó en 3 líneas celulares, HepG2 (células de carcinoma hepatocelular humano), HeLa (células de cáncer cérvico-uterino humano) y CT-26 (células de carcinoma de colon murino). Los resultados obtenidos en las transfecciones, muestran la expresión génica de la luciferasa en presencia de los poliplexos formulados a una

relación N/P 4 y 1 μg ADN, los ligandos transferrina y asialofetuína, y el péptido protamina. En las tres líneas celulares existen receptores de transferrina, y por ello, se ve un aumento en la transfección al añadir transferrina y protamina. En cuanto a la asialofetuína, vemos un aumento en la transfección en el caso de las líneas celulares HepG2 y en CT26. Por otro lado, podemos ver cómo no existe aumento en la transfección con la línea HeLa donde no hay receptores de asialofetuína (Figura 2).

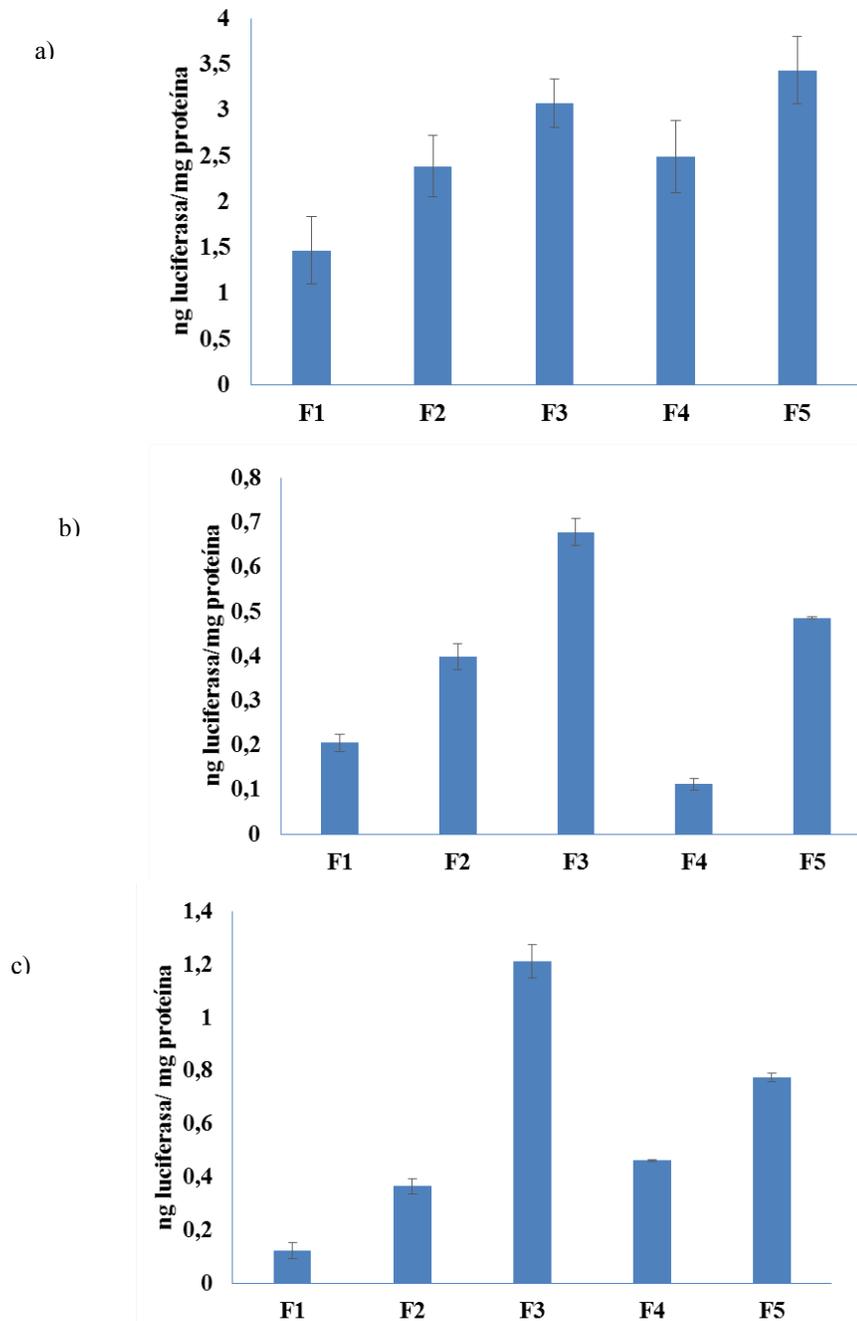


Figura 2. Eficacia de la transfección *in vitro* de los complejos con PEI 25 en células HepG2 (a), HeLa (b) y CT-26 (c). Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos con tres pocillos.

3.1.c. Estudios de toxicidad in vitro

El ensayo “Alamar blue” demostró una viabilidad

superior al 75% en las células transfectadas en los tres tipos de líneas celulares (Figura 3).

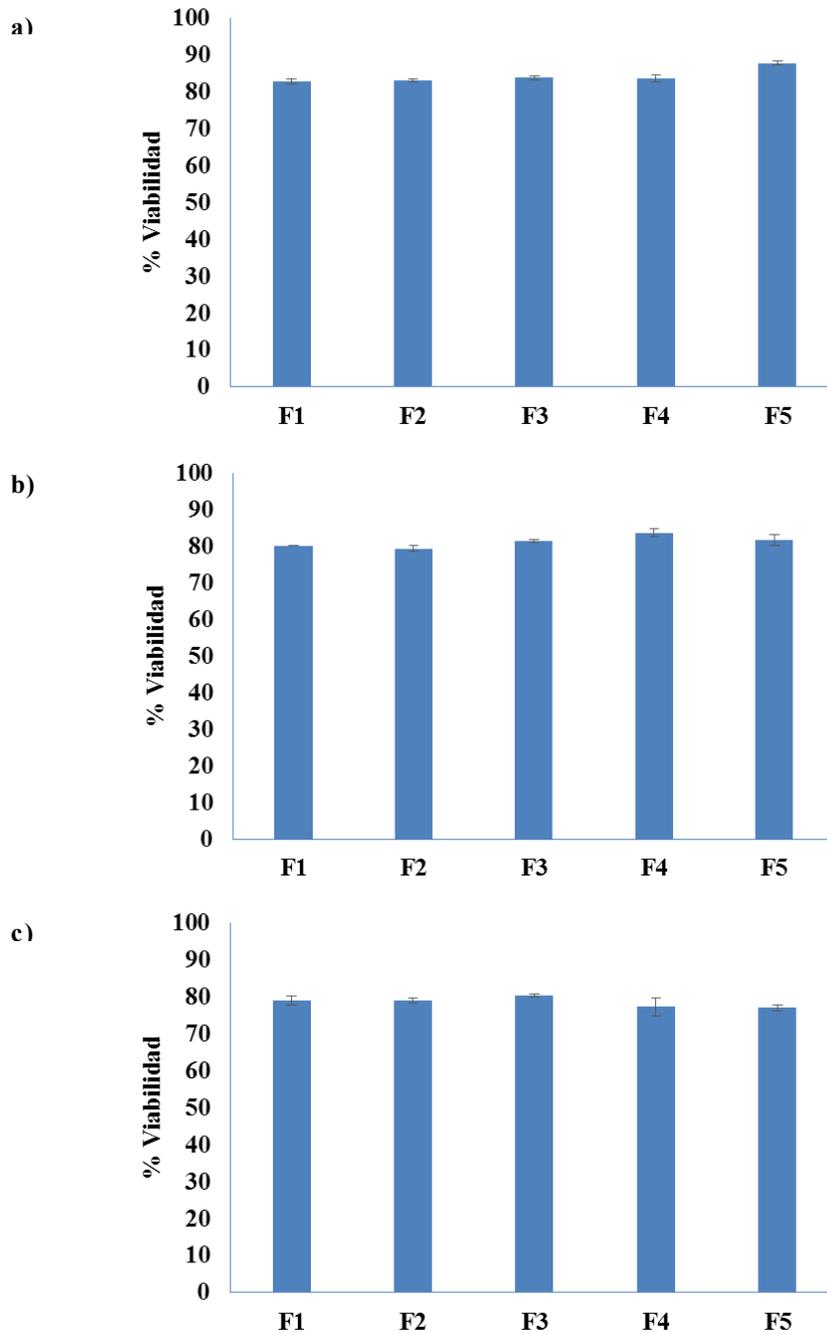


Figura 3. Viabilidad celular en las líneas HepG2 (a), HeLa (b) y CT-26 (c) tras ser transfectadas con poliplejos. Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos con tres pocillos.

3.2. Formulaciones lipídicas

3.2.a. Caracterización físico-química

Se realizaron 5 formulaciones diferentes:

Formulación 6

DOTAP/Colesterol

Formulación 7

DOTAP/Colesterol + transferrina (32 µg/µg ADN)

Formulación 8

DOTAP/Colesterol + transferrina (32 µg/µg ADN) + protamina (0,5 µg/µg ADN)

Formulación 9

DOTAP/Colesterol + asialofetuína (0,5 µg/µg ADN)

Formulación 10

DOTAP/Colesterol + asialofetuína (0,5 µg/µg ADN) + protamina (0,4 µg/µg ADN)

Todas las formulaciones están realizadas con una concentración de ADN de 10 µg/ml.

Podemos destacar que al añadir protamina el tamaño de partícula disminuye ligeramente debido a la condensación del ADN. En cuanto al potencial zeta, vemos cómo al añadir transferrina el potencial disminuye, aunque

siempre se mantuvo en valores positivos, y al añadir asialofetuína permanece invariable. Las partículas resultaron ser nanométricas, homogéneas y con una polidispersión buena que fue siempre menor a 0,35 (Tabla 2).

Tabla 2. Tamaño y potencial zeta de los lipoplejos formulados.

Formulaciones	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)
Formulación 6	215 ± 14	35 ± 5
Formulación 7	234 ± 12	1 ± 0,5
Formulación 8	176 ± 19	5 ± 5
Formulación 9	207 ± 8	36 ± 7
Formulación 10	181 ± 9	33 ± 5

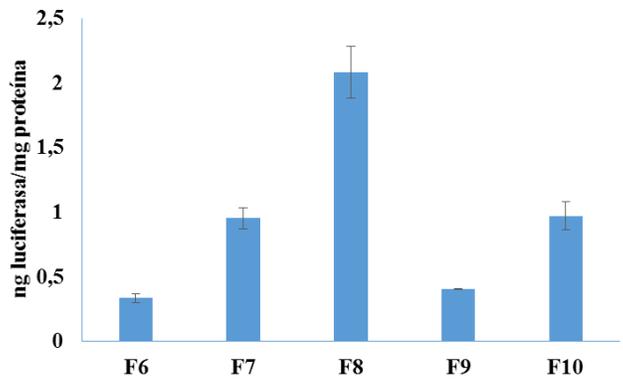
3.2.b. Evaluación de la transfección de los complejos *in vitro*

La evaluación de la transfección de los lipoplejos preparados con un gen reportero codificante de la luciferasa se realizó en las mismas líneas celulares que en el caso de los poliplexos.

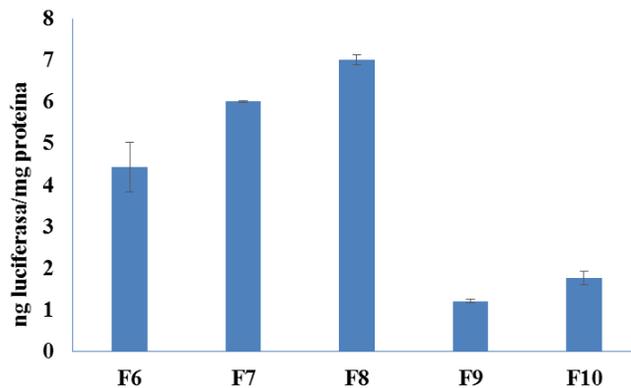
En este caso, la tendencia en cuanto a mayor o menor transfección es diferente en cada línea celular. Con las

células HepG2 vemos un aumento tanto con transferrina como con asialofetuína, un resultado lógico si tenemos en cuenta que existen receptores para los dos ligandos (Figura 4 a). En cuanto a las líneas HeLa y CT-26, donde existen receptores únicamente para transferrina, el aumento solo es patente con las formulaciones que contienen este ligando, pero no con las de asialofetuína (Figura 4 b y c).

a)



b)



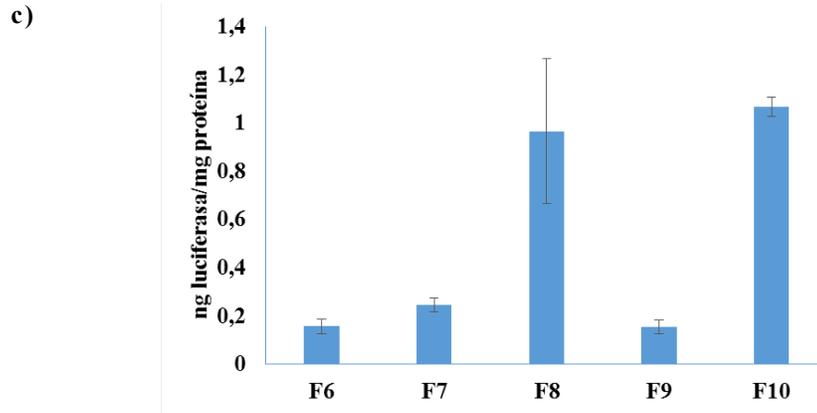
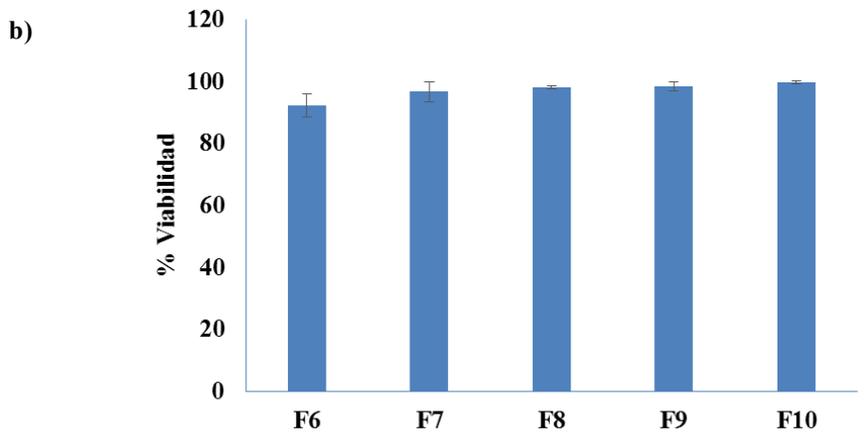
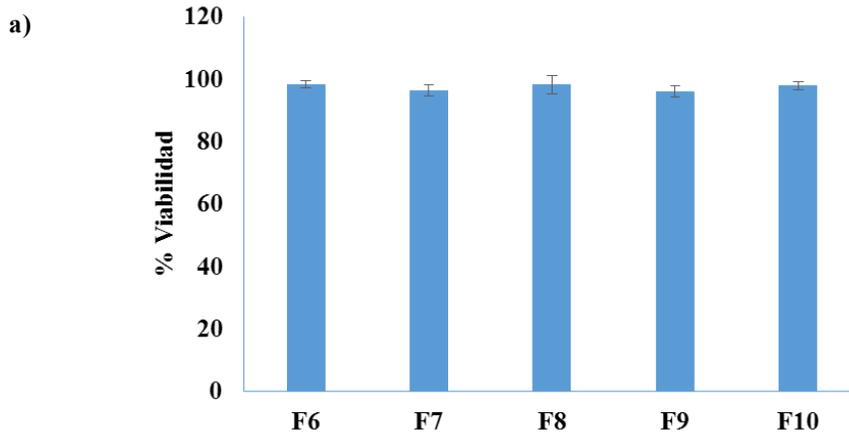


Figura 4. Transfección in vitro con lipoplejos en células HepG2 (a), HeLa (b) y CT-26 (c). Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos con tres pocillos.

3.2.c. Estudio de toxicidad

Se evaluó la viabilidad en los tres tipos de líneas celulares mediante el ensayo de “Alamar blue”. En este

caso la toxicidad fue menor que en poliplejos al obtenerse valores de viabilidad celular mayores o iguales al 95 % (Figura 5).



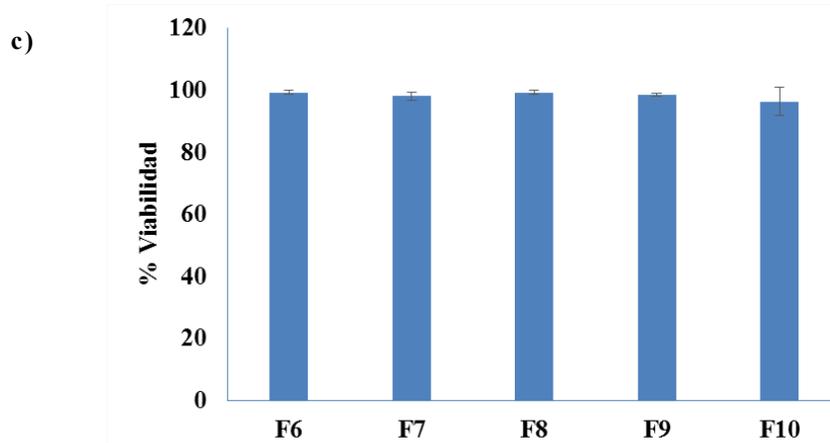


Figura 5. Viabilidad celular de las líneas HepG2 (a), HeLa (b) y CT-26 (c) tras ser transfectadas con lipoplejos. Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos con tres pocillos.

3.2.d. Estudios *in vivo*

La expresión génica se evaluó a las 24 horas tras la administración intravenosa de los lipoplejos y poliplexos, tal como está descrito en “Material y Métodos”. En los ratones a los que se administró ADNp libre no se detectaron transfecciones en ninguno de los órganos estudiados. Los poliplexos resultaron ser tóxicos tras su administración.

a) Caracterización físico-química de los lipoplejos

La adición de una mayor cantidad de ADN (60 µg) para formular los lipoplejos *in vivo*, conduce a un aumento del tamaño de partícula como se observa en la Tabla 3. Además la adición de protamina a los complejos nos

conduce a una disminución significativa del tamaño de partícula en comparación con los complejos que contienen únicamente los ligandos, como ocurría en los lipoplejos preparados para los estudios *in vitro*. También podemos ver cómo resultan partículas nanométricas, homogéneas y con una polidispersión buena que fue siempre inferior a 0,35. Según la formulación, el potencial zeta fue más cercano a la electroneutralidad cuando los lipoplejos contenían transferrina y sin variabilidad cuando contenían asialofetuína. Tanto el diámetro como la carga superficial obtenidas, se consideraron óptimos para realizar los ensayos *in vivo*, ya que indican que las formulaciones son estables y no contienen precipitados.

Tabla 3. Tamaño y potencial zeta de los lipoplejos preparados para administración *in vivo*.

Formulaciones	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)
Formulación 6	240 ± 0,2	35 ± 2
Formulación 7	292 ± 0,2	-11 ± 1
Formulación 8	275 ± 0,3	3 ± 1
Formulación 9	282 ± 1,0	29 ± 1
Formulación 10	208 ± 0,2	26 ± 2

b) Estudios de transfección *in vivo*

Se realizaron una serie de experimentos para evaluar la distribución y la capacidad de transfección de los complejos *in vivo* en los órganos corazón, hígado, pulmón y bazo. Se procedió a la administración de los lipoplejos con transferrina y se detectó expresión génica a las 24 horas principalmente en pulmón (Figura 6a). Podemos ver cómo el nivel de transfección en la formulación con transferrina y protamina era bastante superior a la obtenida en los ratones a los que se administró ADNp libre, donde

no se detectó transfección en ninguno de los órganos estudiados. Por otro lado, se inyectaron las formulaciones realizadas con asialofetuína con los mismos controles que en el caso anterior. A las 24 horas, se observó una mayor expresión génica en el hígado, y en concreto con la formulación que contenía asialofetuína y protamina, donde se obtuvieron resultados mucho mejores en comparación con los ratones a los que se administró ADNp libre (Figura 6b). En el caso de los lipoplejos la viabilidad de los animales fue del 100 %.

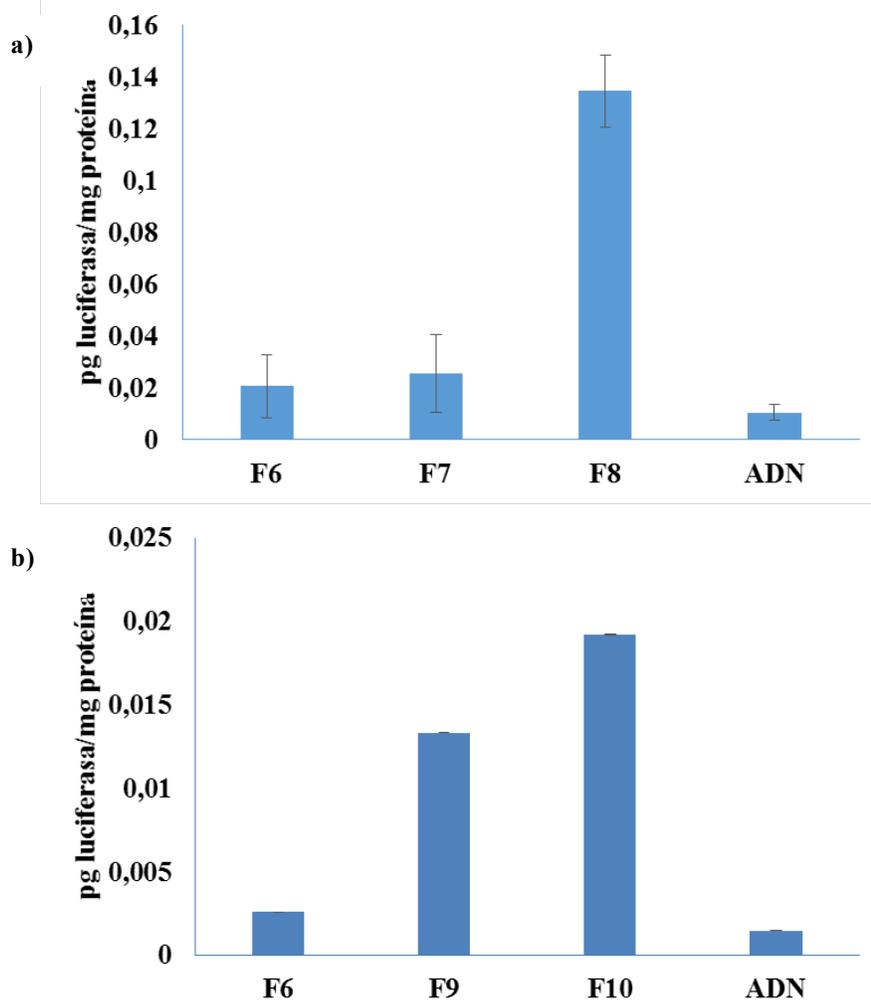


Figura 6. Eficacia de la transfección in vivo de los lipoplejos formulados con 60 μ g ADN/ratón, a relación de cargas (+/-) 5/1 en pulmón (a) y en hígado (b). Los resultados representan la media y la desviación estándar (n=8).

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha evaluado la capacidad de los lipoplejos frente a poliplexos, en cuanto su eficacia de transfección. Un punto importante a la hora de formular los vectores no virales es el tamaño de partícula y la carga superficial. Se ha demostrado que estas dos variables condicionan la eficacia de transfección (14). Los resultados que hemos obtenido con el polímero PEI 25 han mostrado que las partículas son nanométricas y constantes en cuanto al tamaño de partícula (15). En cuanto al potencial zeta podemos afirmar que, según lo esperado, disminuía cuando las formulaciones contenían transferrina, y permanecía invariable cuando había asialofetuína. Aunque los dos ligandos tienen carga negativa, la cantidad de asialofetuína quizá no sea lo suficientemente grande como para provocar un descenso en el potencial zeta (Tabla 1). Por otro lado, cuando realizamos la caracterización físico-química de los lipoplejos comprobamos que eran homogéneos, en un rango nanométrico y constantes en el tiempo en cuanto a tamaño de partícula y potencial zeta según la formulación (Tabla 2). Se observa cómo las formulaciones con transferrina y

asialofetuína no presentan diferencias significativas en cuanto al tamaño de partícula con respecto a la formulación “no dirigida” (Formulación 6). La ligera variación en el tamaño es debido a que la adición de un ligando puede afectar aumentando el tamaño final de la formulación. Paralelamente, en los lipoplejos formulados con protamina (Formulaciones 8 y 10), el tamaño disminuye ligeramente, mostrando el efecto condensador que tiene este péptido sobre el ADNp. Podemos comprobar cómo al añadir transferrina, el potencial zeta se acerca a la electroneutralidad, ya que es un ligando negativo, y como ocurría con los poliplexos, al añadir asialofetuína, el potencial permanece invariable y positivo, aunque éste también sea negativo. Estos resultados están en consonancia con lo obtenido por otros autores en trabajos con este tipo de vectores y ligandos (5, 6, 16).

La existencia de receptores para transferrina y asialofetuína sobreexpresados en órganos con tumores facilitan la especificidad de la terapia génica con vectores dirigidos a todo tipo de tumores en el caso de la transferrina, y a tumores hepáticos en el caso de la asialofetuína. Otros autores han seguido estrategias

similares, como por ejemplo, la preparación de lipoplejos con transferrina para la expresión del gen IL-12 en el tratamiento del cáncer de colon (17). Es bien sabido que el tamaño de partícula y el potencial zeta influyen en la eficacia de la transfección tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo favorable un tamaño nanométrico (16). En cuanto a los estudios de evaluación de la eficacia de transfección *in vitro* con el gen reportero de la luciferasa se demuestra que existe eficacia de transfección tanto en el caso de los poliplejos con PEI 25 como de los lipoplejos. Como se muestra en la Figura 2, entre las distintas formulaciones de PEI 25 resultaban mejores las formulaciones realizadas con transferrina y protamina en las tres líneas celulares, y con las de asialofetuína y protamina en HepG2 y CT-26. Al comparar estos resultados con los obtenidos con los lipoplejos, recogidos en la Figura 4, podemos decir que la trayectoria a seguir en cuanto a eficacia de transfección es la misma para las células HepG2 y HeLa, siendo diferentes los resultados obtenidos con CT-26 donde sólo se obtuvo transfección con transferrina y protamina. Otros trabajos, han remarcado la importancia en la transfección de la protamina, al estudiar cómo afectan distintas cantidades de protamina a la transfección *in vitro* de lipoplejos de asialofetuína (6). Las formulaciones con protamina transfectan mejor debido a la condensación que ejerce este péptido sobre el ADN, y permitiendo a las partículas acceder de una forma más específica a su objetivo (16). En el caso de los lipoplejos se cumplen las hipótesis de que en las líneas celulares estudiadas donde existen receptores de transferrina (HepG2, HeLa y CT-26, Figura 4) se produce una transfección efectiva, al igual que en las que tienen receptores de asialofetuína (HepG2, Figura 4a). Sin embargo, no podemos decir que tal efecto se produzca con los poliplejos, ya que en las células CT-26 que no tienen receptores de asialofetuína, se observa transfección con las formulaciones de asialofetuína (Figura 2c).

También se evaluó la toxicidad celular de las formulaciones mediante el ensayo de "Alamar blue". Aunque la eficacia de transfección *in vitro* era similar entre las formulaciones con PEI 25 y con liposomas, donde se vio una diferencia significativa fue en el ensayo de viabilidad. En todos los casos, la toxicidad fue mayor con los poliplejos que con los lipoplejos.

Al realizar el estudio de transfección *in vivo*, 24 horas tras la administración de los lipoplejos se estudiaron las formulaciones realizadas con transferrina, y transferrina con protamina (Formulaciones 7 y 8). Los mejores resultados fueron observados en pulmón con la formulación 8 formulada con transferrina y protamina (Figura 6a). Esto puede ser debido a que la protamina por un lado, tiene la habilidad de condensar el ADN y de actuar de forma sinérgica con las interacciones catiónicas de los lípidos aumentando la transfección génica (7), y por otro lado, por la alta vascularización que tiene el pulmón, como ocurre en el caso de los poliplejos PAMAM (G5) (9). Además, es probable que ejerza un efecto protector en el ADN de la degradación por nucleasas (11). Por otro lado, el ligando transferrina asociado en este complejo

parece facilitar la internalización del mismo a través de la habilidad de este ligando para estimular la endocitosis. El exceso de receptores de transferrina en los órganos con tumores, hace que el reconocimiento de los complejos con transferrina en la superficie de las células tumorales, sea mejor facilitando la endocitosis mediada por receptor, y por lo tanto la transfección (16).

Por otro lado, se evaluaron las formulaciones formadas con asialofetuína (Formulaciones 9 y 10). La mayor eficacia de transfección fue en el hígado con la formulación compuesta por asialofetuína y protamina (Figura 6b). La unión de la asialofetuína y la protamina asegura la transfección del plásmido al núcleo celular y la reducción del tamaño de partícula, siendo dos motivos por los cuales aumenta la eficacia de transfección (6). La presencia de receptores de asialoglicoproteínas en los hepatocitos hace que las formulaciones con asialofetuína vayan dirigidas fundamentalmente a la terapia génica del hígado. Fenómenos similares se han descrito para el mismo tipo de ligandos formulados con lipoplejos (11, 16).

5. CONCLUSIONES

a) Tanto los lipoplejos como los poliplejos formulados en este estudio han resultado ser de tamaño nanométrico, homogéneo, y con carga superficial positiva.

b) Las formulaciones preparadas con lipoplejos en presencia de los ligandos transferrina y asialofetuína, y el péptido protamina, aumentan la transfección en todos los tipos celulares estudiados; las de asialofetuína con protamina en HepG2, y las de transferrina con protamina en HepG2, HeLa y CT-26.

c) Los lipoplejos presentan una toxicidad mucho menor con resultados de viabilidad celular superiores a los obtenidos con los poliplejos.

d) Las formulaciones preparadas mostraron ser eficaces también *in vivo*. Los lipoplejos lograron una mayor transfección en presencia de los ligandos. Los resultados fueron aún mejores en presencia de las formulaciones que contenían los ligandos con protamina, siendo específicas del pulmón en el caso de la formulación con transferrina y protamina, y del hígado con la de asialofetuína y protamina, con la total supervivencia de los animales.

Interés general, aplicaciones prácticas y aportación del trabajo en el campo de nuevas perspectivas curativas del cáncer.

Según los expertos, el desarrollo y la mejora de vectores para la transferencia de genes aparece como un área de investigación, cuya importancia es crítica para el futuro de la terapia génica del cáncer. La tecnología farmacéutica y en concreto la nanotecnología ha ganado experiencia en relación con las formulaciones de administración de agentes terapéuticos. En concreto, el desarrollo de nanosistemas para la liberación controlada y la vectorización de fármacos ofrecen un importante fundamento al desarrollo de la terapia génica.

Lo más importante e innovador de las formulaciones propuestas en este estudio es no sólo el aumento de su eficacia, sino la disminución en la toxicidad de los

vectores existentes hasta el presente. Por otra parte, el conocimiento del mecanismo de acción de estos vectores representa una notable contribución para el futuro diseño y desarrollo de otros nuevos sistemas de la misma clase. Otra ventaja importante de estas formulaciones es su sencillez, en cuanto a la metodología de preparación, eficacia y bajo coste. Además, las mejoras obtenidas en el tratamiento de esta enfermedad se espera sean acogidas con rapidez por parte de la industria, procediéndose, si es el caso, a patentar todos aquellos métodos tecnológicos de preparación, que han llevado a nuevas formulaciones con potencial terapéutico.

Por todo esto, consideramos que la aplicación con éxito en un futuro de las formulaciones propuestas, supondría un gran avance en el ámbito de la terapéutica tumoral y por lo tanto un importante logro dentro de las metas actuales de la terapia génica del cáncer.

6. CONFLICTO DE INTERESES

No hay ningún conflicto de interés relacionado.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación de la Fundación Universidad de Navarra (FUN).

7. REFERENCIAS

1. Talavera Díaz A. Terapia génica. Ed. Ephemera. Madrid, 2004: 79-103.
2. Rehman Z, Zuhorn IS, Hoekstra D. How cationic lipids transfer nucleic acids into cells and across cellular membranes: Recent advances. *Journal of Controlled Release* 2013; 166:46–56.
3. Huang L, Hung MC, Wagner E. Nonviral vectors for gene therapy. *Advances in genetics*. Ed. Elsevier; San Diego, 2005: 7.
4. Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, Holler E, Ljubimova JY, Helguera G, Penichet M. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1820: 291-317.
5. Tros de Ilarduya C, Düzgünes N. Efficient gene transfer by transferrin lipoplexes in the presence of serum. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1463: 333-342.
6. Arango MA, Düzgünes N, Tros de Ilarduya C. Increased receptor-mediated gene delivery to the liver by protamine-enhanced-asialofetuin-lipoplexes. *Gene Therapy* 2003; 10: 5-14.
7. Delgado D, Rodríguez Gascón A, del Pozo-Rodríguez A, Echevarría E, Pérez Ruiz de Garibay A, Rodríguez JM, Solinís MA. Dextran-Protamine-Solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: In vitro characterization mice. *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 425: 35-43.
8. Von Gersdorff K, Sanders N, Vandenbroucke R, De Smedt S, Wagner E, Ogris M. The internalization route resulting in successful gene expression depends on both cell line and polyethylenimine polyplex type. *Molecular therapy* 2006; 14(5): 745-753.
9. Navarro G, Maiwald G, Haase R, Rogach AL, Wagner E, Tros de Ilarduya C, Ogris M. Low generation PAMAM dendrimer and CpG free plasmids allow targeted and extended transgene expression in tumors after systemic delivery. *Journal of Controlled Release* 2010; 146: 99-105.
10. Ogris M, Brunner S, Schüller S, Kircheis R, Wagner E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Therapy* 1999; 6: 595-605.
11. Hara T, Ishihara H, Aramaki Y, Tsuchiya S. Characteristics of the binding of asialofetuin-labeled liposomes to isolated rat hepatocytes. *International Journal of Pharmaceutics* 1991; 67: 123-129.
12. Kircheis R, Wightman L, Schreiber A, Robitza B, Rössler V, Kursa M, Wagner E. Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Therapy* 2001; 8: 28-40.
13. Ogris M, Wagner E. Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. *Drug Discov Today* 2002; 7: 479-85.
14. Taira K, Kataoka K, Niidome T. Non-viral gene therapy: gene design and delivery. Ed. Springer-Verlag. Tokio. 2005; pp 11.
15. Ogris M, Steinlein P, Kursa M, Mechtler K, Kircheis R, Wagner E. The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Therapy* 1998; 5: 1425-33.
16. Tros de Ilarduya C, Arango MA, Moreno-Aliaga MJ, Düzgünes N. Enhanced gene delivery in vitro and in vivo by improved transferrin-lipoplexes. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1561: 209-221.
17. Tros de Ilarduya C, Buñuales M, Cheng Q, Düzgünes N. Antitumoral activity of transferrin-lipoplexes carrying the IL-12 gene in the treatment of colon cancer. *Journal of Drug Targeting* 2006; 14(8): 527-535.