

NUEVAS FORMAS FARMACÉUTICAS LIPO-POLIMÉRICAS PARA LA LIBERACIÓN DE GENES TERAPÉUTICOS

Leire García, Sonsoles Díez, Conchita Tros de Iarduya

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. 31080 Pamplona.

Introducción y Objetivos

La terapia génica es una modalidad de tratamiento que puede definirse como la transferencia de ácidos nucleicos a las células de un individuo con fines terapéuticos, es decir, el tratamiento de la enfermedad mediante la transferencia de material genético a las células específicas del paciente, en vez de recurrir al uso de fármacos convencionales. Para ello, se necesita del desarrollo de sistemas de entrega de ácidos nucleicos a las células que permitan que estos lleguen a su destino en las mejores condiciones y puedan ejercer su función terapéutica. Por esta razón, uno de los desafíos básicos de la terapia génica consiste en el desarrollo de formas farmacéuticas que permitan la transferencia de material genético terapéutico a las células de interés de una manera que sea lo más eficiente, específica y segura posible.

La tecnología farmacéutica ha ganado experiencia en relación con los sistemas avanzados de administración de fármacos. En concreto, el desarrollo de sistemas sintéticos para la liberación controlada y la vectorización ofrecen un fundamento al desarrollo de la terapia génica con nuevas formas farmacéuticas. Estos sistemas incluyen: los lípidos catiónicos, los liposomas, agentes condensantes de diversa naturaleza y vectores poliméricos como nanopartículas y micropartículas de polímeros biodegradables, como es el caso de PLGA. Así, el objetivo fundamental de

este trabajo es la preparación, optimización, caracterización y evaluación de nuevas formas farmacéuticas lipo-poliméricas (lipopolíplejos, micro y nanopartículas de DNA y polímeros biodegradables) destinadas a la liberación de genes terapéuticos, y de aplicación en terapia antitumoral de cáncer de hígado.

Material y Métodos

El DNA plasmídico utilizado en los estudios, que contiene el gen de la luciferasa bajo el promotor del citomegalovirus (pCMVLuc), se obtuvo tras el crecimiento de bacterias *E. coli* (que contienen el plásmido de luciferasa), en placas de cultivo de agar-agar y kanamicina, y posterior lisado de bacterias y purificación del DNA plasmídico mediante *Qiagen® endotoxin-free plasmid purification* (Francia). Los lípidos catiónicos 1,2-dioleil-3-(trimetilamonio) propano (DOTAP) y colesterol (CHOL) fueron obtenidos de *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, AL, EE.UU.). Se utilizaron PEI ramificada de 800 kDa (Fluka, Steinheim, Alemania) y 25 kDa (Aldrich) y PEI lineal de 22 kDa, también llamada ExGen® 500 (Quimigranel, Madrid). En la elaboración de las partículas se utilizaron los copolímeros de ácido láctico y glicólico (PLGA) Resomer® RG 502H (12 000 Da) y RG 503 (34 000 Da) (Boehringer Ingelheim KG, Alemania). La línea celular utilizada en el estudio es HepG2 (células hepáticas tumorales),

obtenida de *American Type culture Collection*, la cual fue mantenida en el medio de cultivo "Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose" (DMEM) enriquecido con un 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (FBS), penicilina, estreptomycin y L-glutamina (Gibco BRL Life Technologies, Barcelona) a 37 °C en presencia de un 5% de CO₂.

La formulación de los sistemas se llevó a cabo mediante la asociación de los polímeros y DNA con cantidades crecientes de lípido (DOTAP y colesterol), obteniéndose de esta manera "lipopoliplexos" de relación molar 2,3, 5,3 y 17,5. Los lipopoliplexos se formularon mediante 5 protocolos diferentes de preparación y mediante el uso de la PEI de diferentes pesos moleculares (800, 25 y 22 kDa). Las micropartículas fueron preparadas por el método de evaporación del disolvente tras la formación de una emulsión múltiple A/O/A. El tamaño de partícula y el potencial de membrana de los diferentes complejos formulados se determinó por difracción láser utilizando un analizador de partículas denominado Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Reino Unido).

La protección del pDNA de los complejos, frente a las nucleasas, se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para los estudios *in vitro* se utilizaron células de hepatocarcinoma humano (HepG2). Cuando el grado de confluencia fue del 80% se procedió a la transfección con los vectores diseñados objeto de estudio, utilizando el gen reportero de la luciferasa. Para ello, se platearon 3×10^5 células suspendidas en DME-10 en placas (Iwaki Microplate de 48 pocillos, Japón), y tras 24 horas de incubación se procedió a la transfección. Los resultados se expresaron en ng luciferasa/mg proteína.

Resultados y Discusión

En los distintos experimentos se observa cómo el método de formulación y la relación molar utilizada no influye en el tamaño de

partícula, porque no se observaron diferencias significativas entre los valores. En cuanto al potencial de membrana, tampoco observamos diferencias relevantes al utilizar uno u otro método de formulación. Sin embargo, al aumentar la relación molar lípido:DNA (DOTAP/colesterol:pDNA) de los lipopoliplexos elaborados con cualquiera de los métodos de formulación, aumenta progresivamente el potencial Zeta de éstos. Asimismo, se observó que existía influencia en el tamaño de partícula obtenido de los lipopoliplexos, en función del peso molecular de la PEI utilizada. Así, los lipopoliplexos elaborados con PEI ramificada de alto peso molecular (800 kDa), son de tamaño superior a los formados con PEI ramificada de menor peso molecular (25 kDa). No se observan diferencias significativas en este parámetro cuando se comparan las formulaciones preparadas con PEI lineal de similar peso molecular. En lo que se refiere al potencial zeta tampoco se encontraron diferencias significativas entre los diferentes lipopoliplexos formados con los distintos tipos de PEI (lineal o ramificada y de alto o bajo peso molecular).

La actividad de transfección *in vitro* de los complejos formulados con PEI lineal de 22 kDa es notablemente superior a la de los complejos en presencia de PEIs ramificadas (800 y 25 kDa). También la actividad de transfección *in vitro* de lipopoliplexos formulados con la PEI ramificada de bajo peso molecular (25 kDa) es superior a la transfección obtenida con su análoga ramificada de alto peso molecular (800 kDa). Por otra parte, la eficacia de transfección de las formulaciones en presencia del polímero biodegradable PLGA se vió también incrementada.

Conclusiones

- El método de preparación de la formulación no influye en el tamaño ni en la carga superficial de los sistemas. Por otra parte, la cantidad de lípido presente no influye en el tamaño, pero sí en el potencial de membrana.

- El peso molecular del polímero determina el tamaño, en cuanto que al aumentar éste, el tamaño se ve también incrementado, no ejerciendo sin embargo efecto sobre el potencial. El tipo de polímero (lineal o ramificado) no tiene influencia ni en el tamaño ni en la carga superficial de los complejos.
- El plásmido formulado en lipopoliplexos o en micropartículas en presencia del polímero bioegradable PLGA, está totalmente protegido frente a la acción degradadora de las DNAsas presentes en suero, lo que hace pensar que estos vectores pueden tener actividad "in vivo".
- En cuanto a las eficacias de transfección génica tumoral, los nuevos vectores ternarios han conseguido superar la eficacia de los vectores más tradicionales compuestos sólo por lípidos (lipoplejos) o por polímeros (poliplexos).

En resumen, se han conseguido formulaciones lipopoliméricas, que han demostrado su eficacia "in vitro" en células de cáncer de hígado, lo cual puede suponer una prometedora alternativa a los vectores virales, en el desarrollo de la terapia antitumoral del cáncer de hígado.