

VECTORES LIPIDICOS

NUEVAS ESTRATEGIAS APLICADAS A LA TERAPIA GENICA

EDER L. ROMERO¹, MARIA JOSE MORILLA¹, LAURA S. BAKAS^{2,3}¹ Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes; ² Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas; ³ INIBIOLP, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Resumen A diferencia del resto de las moléculas biológicas, los fosfolípidos son capaces de autoensamblarse espontáneamente. Con ellos es relativamente simple generar estructuras selladas extremadamente estables, de tamaño, forma y empaquetamiento controlables, llamadas liposomas. En este artículo revisaremos el uso de liposomas para generar vectores que mejoren los procesos de transfección en células eucariotas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Empleando vectores lipídicos, es potencialmente posible enviar selectivamente un segmento de ADN a cualquier sitio del cuerpo, forzarlo a ingresar al interior celular y aun controlar el destino intracelular de la carga transportada. La clave del éxito de la transfección por medio de vectores lipídicos radica en que protegen mecánicamente al ADN de la degradación plasmática, ofreciendo a la vez la oportunidad de controlar su biodistribución, independientemente del tamaño del segmento de ADN que se quiera expresar. Asimismo, son no carcinogénicos y pobremente inmunogénicos. Los avances en la química de síntesis de lípidos permitirán construir vectores cada vez más eficientes, que compitan con los altos niveles de transfección de los vectores virales, sumado a las ventajas de extrema versatilidad, facilidad de preparación y bioseguridad propias de las moléculas autoensamblables.

Palabras clave: liposomas, lipoplex, lípidos catiónicos, encapsulación, terapia génica, transfección

Abstract *Lipid vectors. New strategies for gene therapy.* Phospholipids are capable of spontaneous self-assembling, a remarkable differential property if compared with the rest of biological molecules. By their means it is relatively easy to generate extremely stable sealed structures, with controlled shape, size and packing, known as liposomes. In this article, we review the use of liposomes to improve the transfection process in eucariotic cells, *in vitro* as well as *in vivo*. By employing lipid vectors, it is feasible to selectively transport a DNA segment to any target of the body, to force it to enter a cell and once inside it, to exert a control on its ultimate intracellular fate. The goal of lipid vectors to successfully transfect a cell *in vivo*, lies on the provision of a mechanical protection for DNA against plasma degradation, together with the possibility of controlling DNA biodistribution, independently of its size and sequence. Moreover, lipid vectors are not carcinogenic and are poorly immunogenic. Current challenge in lipid synthesis allows for a vector design which should be efficient enough to compete with high transfection levels of a viral vector, but with the extreme versatility, simplicity and biosafety characteristic of self assembling molecules.

Key words: liposomes, lipoplex, cationic lipids, encapsulation, gene therapy, transfection

Cómo y por qué buscar nuevas estrategias de liberación en terapia génica

El tratamiento de enfermedades a través de la estrategia conocida como terapia génica, consiste en introducir material genético exógeno en células o tejidos para la cura o mejora de síntomas asociados¹. El material genético puede introducirse en forma de largas cadenas de ADN o bien en forma ON de 15-20 bases de longi-

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico
 ARN: ácido ribonucleico
 CAT: cloramfenicol acetil transferasa
 DC-COL: (3β [N-(N'-dimetilaminoetil)-carbamoil] colesterol)
 DMPC: 1,2 dimiristoilfosfatidilcolina
 DMRIE: (±)-N-(2-hidroxi-etil)-N, N, dimetil-2,3-bis (tetradeciloxi)-1-propanamio bromide)
 DOPC: 1,2 dioleoilfosfatidilcolina
 DOPE: 1,2 dioleoilfosfatidiletanolamina
 DOSPA: 2,3-dioleoiloxi-N(2(espermincarboxiamido)etil)N-N-dimetil-1propanoamio trifluoroacetato
 DPPC: 1,2 dipalmitoilfosfatidilcolina
 DSPE: 1,2 diestearoilfosfatidilcolina
 EDTA: etilendiaminotetracetato
 ON: oligonucleótidos
 PEG: polietilenglicol
 SMNF: sistema mononuclear fagocitario
 SLN: señales de localización nuclear
 VML: vesículas multilamelares
 VU: vesículas unilamelares
 VUG: vesículas unilamelares grandes
 VUP: vesículas unilamelares pequeñas

Recibido: 15-III-2000

Aceptado: 5-IV-2000

Dirección postal: Dra. Eder Romero, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Saenz Peña 180, 1876 Bernal, Argentina
 Fax: (54-11) 4365-7100 e-mail: elromero@unq.edu.ar

tud. En el primer caso, se busca expresar genes ajenos al genoma original; en el segundo se desea reprimir la actividad de un único gen por una variedad de mecanismos.

En sus diferentes formas, la terapia génica puede usarse en el tratamiento de enfermedades adquiridas (cáncer), heredadas (fibrosis quística) o como medida preventiva (vacunas). El desarrollo de este campo se nutre de la biología molecular, que permite producir ácidos nucleicos en cantidades considerables. Ha probado ser efectiva *in vitro*, tanto en sistemas libres de células como en cultivos celulares. Sin embargo su fin último debiera ser la aplicación exitosa en seres vivos. Para lograr esto, los plásmidos y oligonucleótidos deben ingresar al cuerpo (por vía endovenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, instilación o aerosol) y atravesar una serie de barreras anatómicas hasta llegar a sus células blanco, penetrar la membrana plasmática, atravesar el citoplasma e ingresar al núcleo (excluyendo las estrategias antisentido), donde deben expresarse y eventualmente, replicarse correctamente.

Existen muchas maneras de hacer transfección *in vitro*; *in vivo* en cambio, la presencia de barreras anatómicas que en cultivos celulares no existen, genera formidables problemas. Es claro entonces que, aparte del diseño correcto del vector de expresión, el cuello de botella de la terapia génica es el logro de un vector que ayude a atravesar esas barreras y permita la liberación eficiente de genes en forma selectiva. Este vector debe ser estable *in vitro* e *in vivo*, proteger al material genético de la degradación frente a nucleasas, no-tóxico, no-inmunogénico y fácil de preparar en grandes cantidades.

Se han podido desarrollar diferentes formas de transportar genes al interior de las células. Por ejemplo, es posible introducirlos directamente al interior celular por inyección de plásmidos purificados o usar las técnicas de *gene gun*. Nosotros nos limitaremos a revisar las características de aquellas técnicas que empleen vectores de liberación de genes sitio-específicamente. Veremos que hoy por hoy, los vectores ideales no existen.

Los ingenios propuestos como vectores pueden agruparse en tres tipos: vectores físicos (electroporación, microinyección, bombardeo con partículas), vectores químicos (DEAE dextrán, polibreno-dimetil sulfóxido, precipitación por fosfato de calcio, liposomas, conjugados con polilisina) y vectores biológicos (virus). Por razones de eficiencia y bioseguridad, en la actualidad los vectores más usados son los virales (adenovirus, retrovirus y virus adeno-asociados, virus herpes simplex y lentivirus), los liposomas, polímeros y péptidos. Los vectores virales poseen una eficiencia de transfección muy elevada; asimismo sus problemas asociados son varios, entre los que podemos mencionar inmunogenicidad (que elimina a largo plazo la expresión transgénica), carcinogenicidad

y limitada capacidad de carga en término de tamaño de ácidos nucleicos. Traen aparejada además la necesidad de contar con la tecnología para desarrollar virus defectivos en sus mecanismos de replicación. Entre los vectores no virales, los más usados son los liposomas, que generan complejos catiónicos o como agentes encapsulantes. En ellos enfocaremos nuestra revisión.

Si comparamos los vectores liposomales con los virales, las ventajas de los primeros residen en su no inmunogenicidad, su toxicidad casi nula y la carencia de limitación en el tamaño del ácido nucleico a transportar. Su síntesis, además de simple, puede hacerse a la medida para dirigirlo a un tipo celular dado, además de prepararse en gran escala. Estos vectores son capaces de liberar ADN o ARN superenrollado o lineal, con o sin proteínas asociadas, aun a células que no se dividen y usualmente se preparan con lípidos biodegradables. Por otro lado, las principales desventajas de los vectores liposomales son su menor eficiencia de transfección y su expresión transitoria; sin embargo, esta expresión de corta duración puede aprovecharse para tratar enfermedades agudas o crónicas que no requieran reemplazo de genes defectivos.

Actualmente existen *kits* comerciales para transfección génica *in vitro*, a pesar de que *in vivo* aún existen graves problemas de formulación. Veremos a continuación por qué las formulaciones comerciales fallan al intentar transfecciones *in vivo*.

Encapsulación liposomal de ADN versus complejación en lipoplex

Desde 1970 se intentó usar liposomas para el encapsulamiento de AN, aunque los resultados siempre fueron desalentadores. Fue sin embargo a partir de la introducción de liposomas catiónicos—que no encapsulan sino que forman complejos coloidales solubles con el ADN— conocidos como lipoplex, que se logró liberar genes con una eficiencia aceptable. Más tarde surgieron técnicas que permitieron retornar a la encapsulación de ácidos nucleicos con mucha mayor eficiencia que al principio. Tanto la encapsulación como el complejamiento con liposomas catiónicos conforman lo que llamaremos vectores liposomales (Fig. 1). La principal diferencia entre las dos clases de vectores anteriormente citados radica en que sólo si se encapsulan los AN, es posible explotar las propiedades de los liposomas como sistema transportador de drogas, particularmente la liberación sitio-específica del compuesto encapsulado. Sin embargo, las formulaciones comúnmente empleadas en terapia contienen lípidos cargados negativamente y por lo tanto una limitada capacidad para ingresar al citosol. En cambio el lipoplex, a pesar que la encapsulación no tiene lugar, la complejación con sus lípidos catiónicos otor-

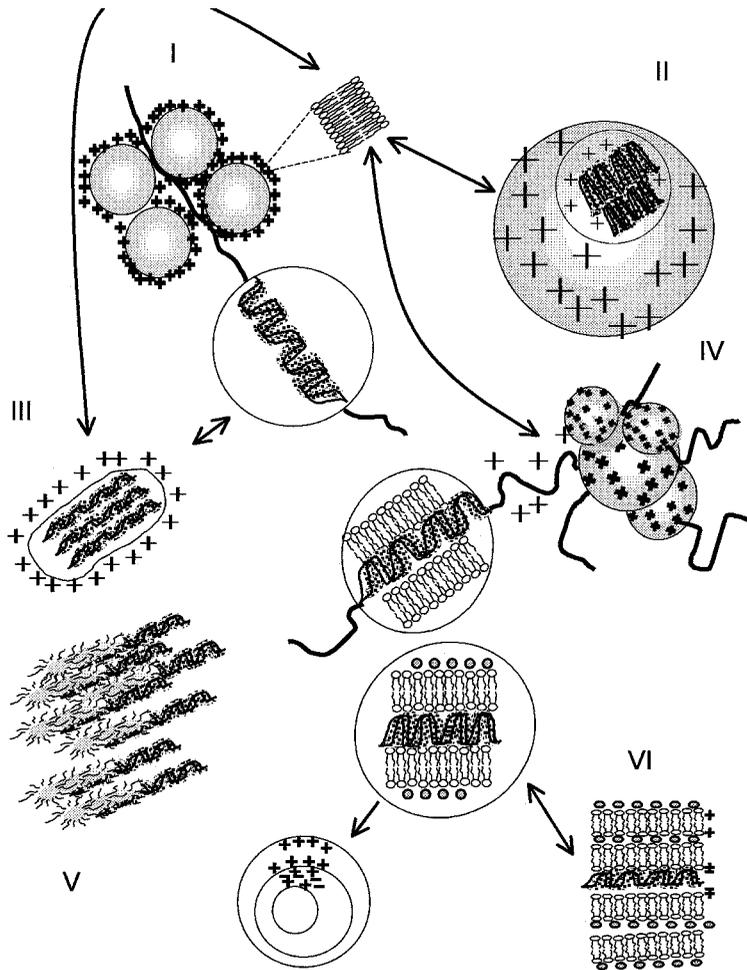


Fig. 1.- Representación esquemática de varios modelos de lipoplex. I Modelo estequiométrico. II ADN condensado recubierto por lípidos. III ADN condensado, encapsulado en liposoma de estructura elongada. IV. Agregados esféricos con halo fibrilar (espagueti y albóndigas). V. Estructuras de fase hexagonal inversa, con hélices de ADN formando canales acuosos en fase líquido cristalina. VI. Modelo de fase lamelar intercalada: ADN condensado bidimensionalmente en sandwich con bicapas catiónicas que forman fases lamelares intercaladas. Puede presentarse como estructuras planas o esféricas.

ga estabilidad y compactación extra al ADN. La elevada efectividad de la transfección observada con estos complejos catiónicos, puede deberse a la atracción electrostática sufrida hacia las membranas celulares cargadas negativamente. En este caso los problemas a superar están relacionados con la limitada estabilidad del complejo *in vivo* a causa de la interacción con componentes séricos y la toxicidad celular observada. Actualmente se está trabajando en el diseño de nuevos lípidos sintéticos que permitan mejorar la eficiencia de la transfección en cada caso particular. Como veremos a lo largo de este trabajo, la eficiencia del proceso de transfección depende de un fino balance en cada uno

de los pasos involucrados, desde la preparación del vector hasta su expresión en el núcleo. El equilibrio entre el enorme número de variables involucradas aún no se ha encontrado.

Optimización del empleo de liposomas *in vivo*

El tipo de liposoma más conveniente para cumplir la función de transportador de drogas suele ser el que posee mayor tiempo de residencia en circulación (excepto que las células blanco sean los macrófagos hepáticos y/o

esplénicos). Estos liposomas, llamados estéricamente estabilizados, se obtienen a partir de la inclusión de diferentes tipos de moléculas hidrofílicas (estabilizadoras) que impiden la opsonización de la partícula una vez en el torrente sanguíneo. El estabilizador más exitoso y ampliamente usado es el PEG²⁰⁰⁰. Estos transportadores de larga vida media tienen la potencialidad de acumularse en el sitio de enfermedad, en zonas donde exista una permeabilidad vascular anormal, por ejemplo procesos tumorales o infecciones².

Una estrategia distinta es emplear liposomas con ligandos superficiales que les permitan dirigirse específicamente hacia células blanco que contengan los receptores apropiados. Los complejos ligando-receptor deben ser internalizables por una ruta endocítica; de otra manera sólo se cumpliría con el paso inicial de unión a la membrana plasmática y no habría posibilidad de ingreso del contenido encapsulado al interior celular.

No debe olvidarse que los liposomas rara vez se fusionan espontáneamente con las membranas celulares. Si la formulación liposomal no posee ninguna de las características anteriormente mencionadas, la entrada al interior celular se dificulta enormemente a menos que las vesículas sean fagocitadas. Sin embargo, si bien la fusión de la membrana plasmática con el liposoma es un hecho poco frecuente, es posible inducirla si se simulan ciertos mecanismos de entrada virales, fundamentalmente de virus Sendai³. También se han usado componentes sensibles a la caída de pH que se registra a continuación de la endocitosis, de manera que el liposoma fusione su membrana con la membrana endosomal⁴. Ambas estrategias finalizan en la fusión intermembranas. Dado que la simple incorporación de material fusogénico puede desestabilizar las membranas, hay creciente interés en el uso de liposomas sensibles a pH con ligandos específicos unidos a su superficie conocidos como inmunoliposomas⁵.

En términos generales, al formular liposomas capaces de encapsular sustancias para ser transportadas hacia un tipo celular blanco, deben reunirse las siguientes condiciones: capacidad para circular por largo tiempo, unión específica a receptores celulares, con fusión subsecuente disparada por mecanismos similares a los de los virus.

Encapsulación de ácidos nucleicos en liposomas

El empleo de liposomas como agentes para encapsular y liberar sitio-específicamente AN, es una extensión natural de su aplicación como sistema de liberación controlada de drogas.

Debido a que el ADN existe en solución como una molécula lineal⁶, su eficiencia de encapsulación es mu-

cho menor que para otras macromoléculas. La eficiencia del proceso puede incrementarse cambiando las propiedades físicas del ADN en solución. Es sabido que la disminución del tamaño del ADN facilita su internalización. Sin embargo, esta compactación ha de ser reversible, ya que para la transfección y expresión genética el ácido nucleico debe estar descondensado.

Es importante destacar que el ADN unido a proteínas o compuestos orgánicos permanece competente para la transfección. El ADN puede condensarse por asociación con proteínas o pequeñas moléculas orgánicas para incrementar la eficiencia de transfección⁷. Sin embargo, no todos los polielectrolitos catiónicos son apropiados para condensar al ADN que se quiere encapsular; por ejemplo, los complejos con histonas, forman agregados cuyo encapsulamiento es imposible⁸. La asociación con lisozima, una proteína básica que se asocia con ADN a pH fisiológico, origina un incremento de 100 veces en la eficiencia de transfección. Resultados similares se obtuvieron condensando el ADN con proteínas de bacteriófagos.

La desventaja del encapsulamiento de ADN en liposomas es que prácticamente está limitado al uso de especies lipídicas cargadas negativamente, lo que limita su aplicación *in vivo*. El mayor inconveniente es su reducida interacción con las membranas celulares y por lo tanto su incapacidad de ingresar al citosol. Actualmente se intenta realizar modificaciones químicas de estas moléculas que permitan superar el problema, incrementar su vida en circulación y asegurar su ingreso al citosol.

La mayoría de las técnicas de encapsulación para aplicación *in vivo* emplean liposomas sensibles al pH, que liberan el contenido en respuesta a un pH bajo. Típicas composiciones son DOPE y un lípido ligeramente ácido, como ácido oleico o hemisuccinato de colesterol (CHEMS). El DOPE tiene una cabeza pequeña en relación con su porción hidrofóbica, que desestabiliza las membranas por formación de fases hexagonales H_{II} cada vez que se halla en medios ácidos. Se cree que la presencia de estos lípidos fusogénicos causa la disrupción del endosoma y liberación del ADN atrapado al citosol.

Complejación de ácidos nucleicos en lipoplex

A diferencia de la encapsulación de ácidos nucleicos en liposomas, la complejación de ácidos nucleicos para formar lipoplex se lleva a cabo muy velozmente, entre segundos a minutos. El lipoplex se forma por interacciones electrostáticas entre las cabezas de los lípidos y las cargas negativas de los ácidos nucleicos. Cuando la suspensión liposomal se pone en contacto con el ADN, la energía liberada en la interacción durante la mezcla rá-

pida es muy elevada; presumiblemente, esta energía se use en reordenamientos de las bicapas que conducen a la formación del complejo. Los lipoplex son heterogéneos en tamaño y forma dependiendo de la relación lípido catiónico/ADN, relación de cargas, concentración, estructura de lípidos y método de preparación. Debe ser tenido en cuenta que la interacción electrostática primaria depende de la fuerza iónica del medio. La baja fuerza iónica de las soluciones empleadas en la preparación del lipoplex maximizan esta interacción, mientras que en condiciones fisiológicas la elevada fuerza iónica contribuye a la desestabilización del complejo.

Se ha avanzado mucho en la química de síntesis de lípidos catiónicos, piedra fundamental en la obtención de complejos de elevada eficiencia de transfección. Básicamente todas las moléculas de lípidos usados tienen una porción hidrofóbica, un grupo cabeza polar y una zona de unión entre cadenas hidrofóbicas y cabezas polares.

Ejemplos de lípidos comúnmente empleados en terapia génica son: DOTMA, DOSPA, DOTAP, Tfx-50, DOSPER, DOGS y DDAB; TM y TPS; DMRIE y DLRIE. Otro grupo de lípidos empleados en la preparación de liposomas para terapia génica derivan del colesterol: DC-col, lípido 67, BGSC, BGTC.

Lipopoliplex: complejos liposomas-policaciones-ADN

Existen ciertas dificultades asociadas a la administración *in vivo* de los lipoplex: tienden a agregarse para formar partículas grandes y heterogéneas, lo que disminuye su eficiencia de transfección, y se unen inespecíficamente a componentes séricos negativos. Las proteínas séricas pueden disgregar al lipoplex, lo que causa la destrucción prematura del ADN; por último, los lipoplex son rápidamente destruidos por el sistema mononuclear fagocitario (SMNF).

Si se tiene en cuenta que la causa principal de agregación de los complejos es la pobre condensación del ADN con lípidos catiónicos, esto puede impedirse por el agregado de policaciones, que aumenten el grado de condensación del ADN. Así, al agregar un policación de elevada densidad de carga a una mezcla de ADN y lípidos catiónicos, se forma un vector autoensamblado más compacto que el lipoplex, denominado lipopoliplex⁹. A este efecto, puede usarse L-polilisina o protaminas provenientes de esperma¹⁰. Las protaminas parecen ser más efectivas que las polilisinas y menos tóxicas para uso humano; son moléculas pequeñas (5000 PM), con un 66% de residuos de arginina. Se cree que poseen señales de localización nuclear (SLN) que pueden facilitar la entrada de los genes al núcleo desde el citoplasma, lo que constituye una ventaja sobre la L-polilisina.

Vectores lipídicos y oligonucleótidos: una perspectiva diferente

La captación celular de los ON antisentido desnudos es muy pobre. En forma de lipoplex o encapsulados en liposomas, la captura celular se incrementa. Sin embargo, el diseño de vectores de targeting de ON está menos desarrollado que para las largas secuencias de ADN. La generación de lipoplex es dificultosa, dado que los ON son segmentos cortos que no forman estructuras ordenadas, ya que no pueden condensarse y no tienen rigidez. Por otro lado, su encapsulación en liposomas aún no ha podido llevarse a cabo con elevada eficiencia, dada su extrema hidrofiliidad y su carácter ácido. A pesar de las dificultades para lograr la complejación o encapsulación de ON en vectores lipídicos, estas pequeñas moléculas ofrecen la siguiente ventaja: unos pocos ON antisentido son suficientes para ejercer una actividad terapéutica, ya que la cantidad de moléculas de ARNm es pequeña comparada con el número de copias de proteínas que produce. Asimismo, la inactivación de la traducción también se dispara a través de la activación de ARNasa H; este mecanismo catalítico de amplificación de señales reduce la cantidad de ON necesarios para bloquear eficientemente la expresión de un gen.

La liberación *in vivo* de ON encapsulados en liposomas aún no ha sido adecuadamente estudiada. A diferencia de los liposomas, los complejos catiónicos parecen ser mejores para proveer una liberación intracelular de ON antisentido, al menos *in vitro*. Probablemente estos complejos sean captados por endocitosis y el camino endocítico se interrumpa, permitiendo la liberación intracitoplasmática del material encapsulado, que luego se transporta al interior del núcleo por un proceso independiente de energía.

Estabilidad de liposomas y lipoplex *in vivo*

Ciertos parámetros son útiles para caracterizar las formulaciones liposomales o complejos lipídicos; citaremos: a) porcentaje de carga, definida como la cantidad de carga de droga asociada a liposomas o complejos catiónicos en comparación con la cantidad de droga libre en solución u otro estado, b) eficiencia de carga o porcentaje de encapsulación, correspondiente al monto de agente capturado en la preparación y c) liberación o cantidad de agente liberado de las partículas transportadoras en diversas condiciones que induzcan pérdida o liberación controlada.

En general, para la administración endovenosa se requiere un alto porcentaje de carga seguido de una alta tasa de liberación en el sitio blanco. Los liposomas pueden cumplir con este requerimiento; si se diseñan apropiadamente, retienen el material genético encapsulado

in vivo eficientemente y puede regularse la tasa de liberación de material genético, a la vez que se lo protege mecánica y fisicoquímicamente¹¹. Los lipoplex, en cambio, son extremadamente inestables en plasma¹².

El proceso de transfección

El proceso de transfección es complejo. Los pasos probables están resumidos así: (Fig. 2).

1. Unión de complejos o liposomas a moléculas en fluidos biológicos.
2. Transporte desde el sitio de inyección hasta la superficie celular blanco.
3. Unión a la superficie blanco.
4. Captura celular por endocitosis.
5. Liberación del complejo del endosoma.
6. Descubierta del ADN
7. Captura al interior nuclear.
8. Expresión del gen.

Es sabido que las moléculas pequeñas entran por difusión pasiva y/o transporte activo al interior celular. Las moléculas grandes en cambio, penetran por fusión de membranas, pinocitosis, endocitosis, fagocitosis y/o endocitosis mediada por receptores.

La relación estequiométrica lípidos catiónicos/ADN, la forma del complejo y el tipo de lípido del lipoplex o liposoma afecta la tasa de entrada del vector liposomal a través de la membrana celular¹³. En un primer paso el transportador lipídico se asocia con la membrana celular aparentemente a través de la interacción con proteoglicanos sulfatados, luego es internalizado, principalmente por endocitosis. Las transfecciones a líneas celulares deficientes en proteoglicanos han fallado debido a deficiencias a nivel de la unión superficial y la internalización posterior⁴. Sin embargo, aquellos lipoplex que tuvieron mejores uniones superficiales, no necesari-

amente produjeron los mayores niveles de expresión transgénica¹⁵.

Una vez que el vector lipídico es incorporado a las células, el plásmido y su vector son retenidos en los endosomas, que se mueven a lo largo de los filamentos del citoesqueleto alejándose de la membrana celular vía filamentos de actina, usando GTP como fuente de energía. Las miosinas de clase I también participan en los caminos endocíticos. La interacción de los lípidos con las membranas endosomales juega un rol muy importante en la transfección. El material dentro de los endosomas tiene tres destinos eventuales: I) fusionarse con lisosomas, donde las enzimas lisosomales digieren el material exógeno, II) translocarse fuera de las células o III) liberarse al citosol. Es sabido que la expresión transgénica se incrementa cuando el contenido plasmídico endosomal se libera al citosol III. DOPE, un lípido adyuvante, participa en la ruptura de la membrana en condiciones ácidas, por sufrir una transición a fase hexagonal II. Si se sustituye DOPE por DOPC, estabilizador de la estructura de bicapa, la expresión transgénica disminuye¹⁶. Ciertos lípidos o polímeros sintéticos tienen capacidad buffer, como la polietilénimida que inhibe la actividad de enzimas lisosomales ácidas por disminución de concentración de protones, promoviendo la liberación del plásmido¹⁷. También son capaces de aumentar la expresión transgénica los inhibidores de enzimas lisosomales catepsina D y cloroquina.

La fusión con proteínas virales como la hemaglutinina puede desestabilizar membranas endosomales por cambios de conformación a pH ácido. Así, se han usado péptidos fusogénicos que copian las funciones de las proteínas de fusión virales e incrementan la eficiencia de transfección transgénica. Estos péptidos tienen una estructura de α -hélice hidrofóbica a pH ácido que cambian a conformación al azar e hidrofílica a pH neutro.

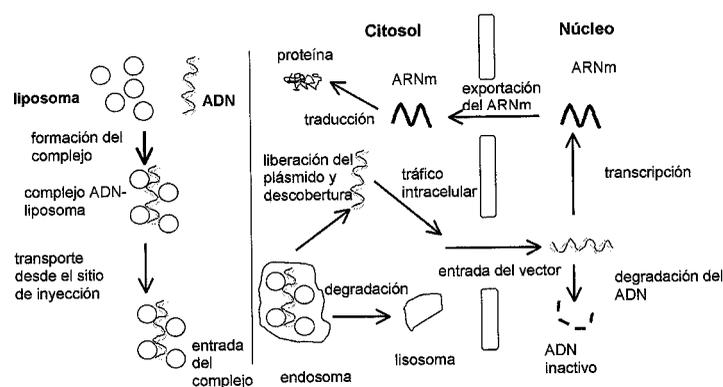


Fig. 2.— Eventos intracelulares: desde la formación de los complejos ADN-liposomas hasta la síntesis de proteínas.

Los modelos *in vitro* que usan liposomas cargados negativamente para simular el entorno endosomal, sugieren que los plásmidos son liberados de los endosomas como moléculas desnudas, por atracciones electrostáticas entre lípidos catiónicos y lípidos aniónicos, en la hoja citoplasmática de la membrana endosomal¹⁸. El plásmido liberado subsecuentemente entra al núcleo y ocurre la transfección. Sin embargo, la penetración nuclear es uno de los pasos más difíciles del evento de transfección intracelular. La transfección a células sincronizadas muestra que los eventos mitóticos pueden incrementar la eficiencia de transfección¹⁹. La expresión transgénica puede incrementarse por lo tanto, estimulando la proliferación celular, ya que durante la mitosis se produce la apertura nuclear que permitiría el ingreso del plásmido. Es posible dirigir la entrada al núcleo si se usan histonas unidas a plásmidos que proporcionan secuencias consenso de SNL¹⁸.

En definitiva, no se conocen bien los mecanismos de entrada de plásmidos al núcleo. Una hipótesis, nacida de observaciones por microscopía electrónica, sugiere que los lípidos de complejos ADN-liposomas pueden fusionarse con la envoltura nuclear para facilitar la entrada nuclear del plásmido. La entrada de ciertos plásmidos es independiente del proceso de proliferación celular; este sería un tipo de entrada especial, dependiente de la secuencia específica del plásmido.

Una vez dentro del núcleo, el proceso de transcripción está finamente regulado y requiere de la presencia de factores transcripcionales del hospedador para iniciar la reacción. La tasa de transcripción depende de la estructura genética del vector, como la fuerza del promotor y la presencia de un *enhancer*. La mayoría de los vectores actualmente usados incluyen fuertes promotores virales, como el promotor del citomegalovirus. Un problema es que ciertos promotores no virales son capaces de inducir una respuesta inmune, a través de la generación de altos niveles de citoquinas, como factor de necrosis tumoral α y γ -interferón, las cuales sinérgicamente inhiben la expresión transgénica²⁰. Comparado con los promotores virales, un promotor β -actina constitutivo produce 5 veces mayor expresión transgénica bajo las mismas concentraciones de citoquinas que en el caso anterior. Como la degradación nuclear del plásmido liberado causaría una expresión transgénica transitoria, el diseño de un vector episómico podría resultar en expresión transgénica aumentada y duradera. Hay un vector episómico, producto de una modificación del vector SV40 (107/402-T) que contiene un antígeno grande SV40 T mutado en posiciones 107 y 402, que ofrece replicación del vector en modelos tumorales y duración prolongada de la expresión transgénica. El uso de un vector episómico derivado del papovavirus humano también ha demostrado una duración prolongada en la expresión transgénica *in vivo* por hasta 3 meses²¹.

Problemas inherentes a la administración *in vivo* de lipoplex

Cuando se piensa en extrapolar resultados experimentales de sistemas *in vitro* a condiciones *in vivo*, es importante saber que no se ha hallado correlación en la eficiencia de transfección entre ambas condiciones. Por ejemplo, la relación óptima ADN/lípidos catiónicos es diferente en ambas condiciones. La estabilidad de los complejos en plasma es uno de los factores más importantes que hacen a la diferencia entre resultados *in vivo* e *in vitro*. *In vivo* se requiere un exceso de cargas positivas del complejo para neutralizar las proteínas séricas de carga negativa²². Asimismo, el comportamiento de las células en cultivo suele diferenciarse mucho del de las células *in vivo*, por ejemplo con respecto a la capacidad fagocítica. En cultivos celulares se requiere poco ADN para la transfección y no importa si está precipitado. La aplicación de complejos o liposomas precipitados a un cultivo celular no reduce la eficiencia de transfección; las mismas condiciones aplicadas *in vivo*, generan una eficiencia de transfección sumamente baja. Las razones de este fracaso residen en el gran tamaño y la desigual morfología de los complejos generados a partir de kits comerciales. Asimismo, la transfección es dosis dependiente y usando kits comerciales la dosis de ADN transferida es muy baja para ser empleada *in vivo*, dada la degradación que sufre en circulación. Debe tenerse en cuenta que *in vivo*, fundamentalmente en la administración endovenosa, están en juego la farmacocinética, biodistribución y estabilidad del lipoplex. En el otro extremo, si los lipoplex van a ser administrados localmente, pueden usarse las mismas formulaciones que para transfectar *in vitro*, como es el caso de la administración intratumoral (que proporciona una mínima interacción con el entorno fisiológico, disminuyendo los problemas de degradación), la instilación intratraqueal, aerosolización o ruta intraperitoneal. La administración intramuscular y subcutánea son casos intermedios entre los extremos *in vitro* y la administración intravenosa. Es claro entonces, que para cada ruta de penetración los lipoplex deben tener una estructura y carga neta diferentes; por ejemplo, para la vía endovenosa deben ser muy pequeños y muy compactos, lo que no es fundamental para trabajar *in vitro*. Independientemente de la destrucción que pueden sufrir por parte de las proteínas plasmáticas, una vez en sangre los lipoplex circulan libremente hasta que son capturados, fundamentalmente por las células de Kupffer en el hígado. No están capacitados para extravasar ni siquiera a través de las fenestraciones endoteliales hepáticas²³. La biodistribución de estos complejos, dependerá de la tasa relativa de fagocitosis de los macrófagos hepáticos y esplénicos, y a la posibilidad de atrapamiento mecánico en sitios donde los capilares tienen una luz demasiado angosta como los pulmonares.

La biodistribución en ratas, luego de la administración endovenosa, muestra que el pulmón es el órgano más transfectado (en células endoteliales), obedeciendo a un comportamiento del tipo dosis-respuesta^{24, 25}. En hígado y bazo en cambio los lipoplex son capturados fundamentalmente por los macrófagos.

En terapia génica se cuenta con la ventaja de poder expresar selectivamente proteínas en sitios particulares, ubicando promotores tejido-específicos en el transgen. Si bien los lipoplex son inestables en plasma, parte de su inestabilidad consiste en la formación de agregados, durante los cinco primeros minutos de circulación; a continuación se descomponen por interacción con proteínas plasmáticas. Frecuentemente, se registra leucopenia y trombocitopenia asociada a su administración. Estos agregados son importantes a la hora de transfectar pulmones, ya que las partículas quedan atrapadas en la luz del angosto endotelio capilar. Regulando las relaciones lípidos catiónico: adyuvante y ADN: lípido cargado, puede controlarse la agregación. La naturaleza del lípido adyuvante afecta la tasa de agregación; por ejemplo, sustituyendo DOPE –un adyuvante común *in vitro*– por colesterol, se obtiene expresión transgénica más intensa y por más tiempo *in vivo*; de esto se desprende que los complejos con DOPE son más lábiles *in vivo* que *in vitro*.

Administración en animales modelo

La eficiencia de la transfección en animales modelo se mide a través de la expresión de una proteína reportera, la CAT. El blanco tisular más estudiado en animales experimentales es el pulmón. Un hecho a remarcar es que de acuerdo a la ruta de administración, no sólo las formulaciones han de ser distintas, sino que las eficiencias de transfección son en extremo variables. En términos generales, la administración de lipopoliplex por vía sistémica produce transfecciones muy poco eficientes. Empleando instilación traqueal, los órdenes de expresión son de 15-125 ng proteína CAT/mg de proteína en pulmón. En contraste, los niveles de expresión obtenidos por administración sistémica a blancos pulmonares son mucho menores: unos 1-2 ng CAT/mg de proteína en pulmón. Cambiando el tipo de lípido, recientemente se ha logrado incrementar muchísimo los niveles de expresión luego de la administración sistémica de complejos de DOTAP: 0.5 µg CAT/mg de proteína en pulmón de ratón. También se halló expresión en otros 12 tejidos, aunque de 100 a 1000 veces menores. Transportadores que unan un ligando adecuado (por ejemplo, asialofetina) incrementan la expresión en el hígado hasta 7 veces. En resumen, para cada tipo de célula blanco deben prepararse transportadores *ad-hoc*.

Administración en humanos

Actualmente la terapia génica con vectores lipídicos se halla en etapa de pruebas clínicas en humanos, sólo para vectores del tipo lipopoliplex, no aún para liposomas. Es sabido, por ejemplo, que la expresión por parte de células tumorales de la proteína HLA-B7 (perteneciente al sistema inmune y componente del antígeno mayor de histocompatibilidad), induce la generación de linfocitos T citotóxicos responsables de reconocer tales células como extrañas y eliminarlas selectivamente. En protocolos clínicos se inyectaron lipopoliplex con el ADNc de HLA-B7 intratumoralmente, a unos 90 pacientes que fallaron en responder a terapias estándar de tratamiento de cáncer. El 60% de los pacientes sufría de melanoma maligno. En un 33% de los casos, el tumor en el sitio de la inyección regresó completamente. En un 5%, el tratamiento con lipopoliplex fue capaz de reducir los tumores que no habían sido inyectados.

También se usaron lipopoliplex para expresar genes de la proteína del sistema inmune interleucina 2 (IL-2) para tratar tumores renales. Es sabido que la administración endovenosa de IL-2 desnuda, trae aparejados serios efectos colaterales; sin embargo al complejarla con lipopoliplex e inyectada intratumoralmente, se observó un gran incremento local de la concentración de IL-2, sin efectos tóxicos locales o sistémicos.

En fibrosis cística, los lipopoliplex de DC-col se han utilizado en forma de aerosol, para liberar localmente genes de CFTR (proteína reguladora de conductancia transmembrana) defectiva en esa enfermedad, a células del epitelio nasal^{26, 27}. En 6 de los 7 pacientes se detectó ARNm de CFTR, sin toxicidad asociada. El defecto en el canal de conducción de cloruros mediados por AMPc, típico de la fibrosis cística, se rectificó parcialmente en algunos pacientes. Similares resultados se obtuvieron recientemente con formulaciones de DOTAP combinado con DC-col^{28, 29}.

En la leucodistrofia de Canavan, una enfermedad autosómica recesiva, luego de la inyección intracraneal directa de lipopoliplex de L-polilisina, DC-col y un gen de la aspartoacilasa (ASPA), desaparecieron los signos de acumulación de N-acetil aspartato, un metabolito neurotóxico, en o cerca del sitio de inyección. Tampoco se observaron efectos tóxicos³⁰.

Conclusiones

Los virus son efectivos en transferir genes a células, porque han evolucionado mecanismos especializados que les permiten unirse a tipos celulares específicos y liberar eficientemente su carga al interior celular. Sin embargo, los problemas asociados a su uso como ve-

hículo de liberación asistida de genes son: a) algunos virus pueden disrumpir el ADN de las células que infectan; b) los virus atenuados pueden cambiar una vez en el interior del hospedador y volver a tener actividad patogénica y c) el paciente puede generar una respuesta inmune contra el virus. Esto último podría destruir al virus y a las células infectadas antes de que el gen enviado actúe, inutilizando la estrategia terapéutica. Por estas razones, se trata de buscar vectores que no sean agentes infecciosos para descargar genes u ON exógenos en células enfermas. Asimismo, debe considerarse la posibilidad de que se requieran tratamientos repetidos, en vez de una única dosis de terapia que produzca una cura permanente. Los vectores lipídicos pueden ser muy útiles en los tratamientos repetidos, ya que no generan respuestas inmunes. Tampoco existe el peligro de daño por reactivación ni de disrupción de genoma; esto pone a los vectores lipídicos muy por encima de los virus en términos de bioseguridad. Por otro lado, los datos reunidos al presente indican que las eficiencias de transfección *in vivo* de los lipoplex, comparadas con las eficiencias de los vectores virales son bastante inferiores. En términos generales, puede hacerse la siguiente estimación: algunos virus son casi 100% efectivos en la liberación de su genoma a las células invadidas; esto implica que 10^3 virus infectarán a 10^3 células que son sus blancos naturales, es decir, invadirán eficientemente y selectivamente 10^3 células del tipo correcto. En cambio para transfectar 10^3 células con lipoplex, se requerirán aproximadamente 10^6 copias de genes terapéuticos en 10^6 lipoplex: esto significa que su eficiencia es 1 000 veces menor. Si bien los lipoplex se obtienen simple y velozmente, no pueden almacenarse; deben ser preparados y administrados en el momento. Al presente, la forma y el tamaño de los lipoplex son casi incontrolables y es sabido que la forma y tamaño son factores de peso a la hora de definir una determinada biodistribución, cuando se administran sistémicamente. Por ello y por su absoluta inestabilidad en plasma, su uso está limitado a la administración local. Los liposomas son vectores mucho más estables *in vivo* que los lipoplex; en esto y en el hecho de que pueden sintetizarse con ligandos y estructuras adecuadas que permitan dirigirlos hacia un blanco celular particular radica su enorme potencialidad. Sin embargo, la optimización de la encapsulación de una droga en particular es trabajosa y difícil de escalar industrialmente. El tiempo de almacenamiento de las formulaciones es bajo, en general de unos pocos meses y aún no se conocen datos relativos a los AN; sin embargo, su almacenamiento es posible, lo que abre buenas perspectivas en el campo farmacológico. Actualmente existen en el mercado sólo cinco formu-

laciones liposomales de drogas antiparasitarias y antineoplásicas. Si bien el desarrollo de una formulación liposomal es lento y los problemas de escalaje industrial son grandes, dado que es posible incrementar el índice terapéutico de una droga encapsulada hasta 10^3 veces, la estrategia de encapsulación liposomal de AN ofrece un campo inexplorado que mereciera investigarse todavía más.

Las soluciones salinas de oligonucleótidos fosforotioatos, (los más estudiados), inyectadas endovenosamente se distribuyen ampliamente por todos los tejidos, con excepción del cerebro. Esto tiene una ventaja potencial en caso que la enfermedad presente una variedad de tejidos blanco, ya que los oligonucleótidos llegan masivamente a casi todos los tejidos. En tanto el antisentido no afecte los tejidos sanos, no sea tóxico y su actividad bloqueante sea suficiente por sí misma como para revertir la enfermedad, esta estrategia no presenta inconvenientes. Este es el único caso en que los ON antisentido funcionan con moderada eficiencia *in vivo* en animales modelo y en ciertos estudios clínicos.

Uno de los principales problemas asociados a la administración *in vivo* de los ON fosforotioato, es la necesidad de contar con un sistema que desvíe la distribución sistémica únicamente hacia los tejidos blancos, dada su elevada toxicidad renal, independientemente de su secuencia. Utilizar un sistema transportador, ya sea liposomal o lipoplex, para modular su biodistribución y para reducir su toxicidad, otorgaría la ventaja de incrementar la exposición a tejidos enfermos para una misma dosis, o aun dosis menores, lo que reduciría el elevado costo de estos derivados.

Una alternativa a la administración sistémica de los oligonucleótidos, ya sea encapsulados, complejados o libres, es la inyección intra-cerebroventricular o vía catéter asociado con angioplastia; también la inyección directa en tumores y administración en la vía porta para targeting en el hígado. La administración local de complejos catiónicos antisentido puede ser una estrategia efectiva, ya que por este medio se puede lograr liberación intracelular muy eficiente; con liposomas sería muy costoso y no justificable. Sin embargo, aún falta mucho trabajo para demostrar que esto puede llegar a funcionar efectivamente en enfermedades humanas. Por último, el targeting a tumores sólidos, ya sean lipoplex o liposomas, y la liberación intracelular verdaderamente eficiente, es todavía una realidad no cumplida. Quedan por desarrollarse sistemas transportadores de drogas altamente estables en circulación (los lipoplex son lábiles) que puedan penetrar efectivamente la masa tumoral y su extravasación quede reducida a las inmediaciones de la vasculatura (no es posible reducir el diámetro de un liposoma por debajo de los 50 nm), sin acceder a las zonas más profundas.

Bibliografía

1. Tseng W, Huang L. Liposome-based gene therapy. *Pharmaceutical Science and Technology Today (PSTT)* 1988; 1: 23-7.
2. Tari AM, Andreeff M, Kleine HD, Lopez-Berestein G. Cellular uptake and localization of liposomal-methylphosphonate oligodeoxynucleotides. *J Mol Medicine* 1996; 74: 623-8.
3. Ellison KE, et al. Fusogenic liposome-mediated DNA transfer into cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 1385-99.
4. Legendre JY, Szoka FC. Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharm Res* 1992; 9: 1235-42.
5. Ma DD, Wei AQ. Enhanced delivery of synthetic oligonucleotides to human leukaemic cells by liposomes and immunoliposomes. *Leuk Res* 1996; 20: 925-30.
6. Saenger W. Principles of nucleic acid structure. New York: Springer-Verlag 1984; p 556.
7. Manino R, Allebach E, Strohl W. Encapsulation of high molecular weight DNA in large unilamellar phosphatidylcholine vesicle. *FEBS Lett* 1979; 101: 229-32.
8. Jay D, Gilbert W. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1979-80.
9. Gao X, Huang L. Potentiation of cationic liposomes-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry* 1996; 35: 1027-36.
10. Sorgi FL, Bhattacharya S, Huang L. Protamine sulfate enhances lipid mediated gene transfer. *Gene Therapy* 1997; 4: 961-8.
11. Huges JA, Bennet CF, Cook PD, Guinosso CJ, Mirabelli CK, Juliano RL. Lipid membrane permeability of 2'-modified derivatives of phosphorothioate oligonucleotides. *J Pharm Sci* 1994; 83: 597-600.
12. Zelphati O, Szoka J. Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11493-8.
13. Zhou X, Huang L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1189: 195-203.
14. Matsui HJ, Svensson B. Improved activity and modulation action pattern obtained by random mutagenesis at the fourth beta-alpha loop involved in substrate binding to the catalytic (beta/alpha) 8-barrel domain of barley alpha amylase 1. *Biol Chem* 1997; 272: 25641-7.
15. Reimer DL, Kong S, Bally MB. Analysis of cationic liposome-mediated interactions of plasmid DNA with murine and human melanoma cells *in vitro*. *J Biol Chem* 1997; 272: 19480-2.
16. Farhood H, Serbina N, Huang L. The role of dioleoyl-phosphatidylcholine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1235: 289-95.
17. Boussif O, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7297-301.
18. Zelphati O, Wagner E, Leserman L. Synthesis and anti-HIV activity of tiocholesteryl-coupled phosphodiester antisense oligonucleotides incorporated into immunoliposomes. *Antiviral Res* 1994; 25: 13-25.
19. Fritz JD, Herwiejer H, Zhang G, Wolff JA. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 1395-404.
20. Qin L, Ding Y, Pahud D, Robson N, Shaked A, Bromberg J. Adenovirus-mediated gene transfer of viral interleukin-10 inhibits the immune response to both alloantigen and adenoviral antigen. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1365-74.
21. Cooper MJ, et al. Safety modified episomal vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6450-5.
22. Thierry AR, Rahman A, Dritschilo A. Liposomal delivery as a new approach to transport antisense oligonucleotides. Izant JG (ed) New York: Raven Press, 1992.
23. Yang JP, Huang L. Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. *Gene Ther* 1997; 4: 950-60.
24. McLean JW, et al. Organ-specific endothelial cell uptake of actionic-liposome-DAN complex in mice. *J Phys* 1997; 273: H387-404.
25. Thierry AE, Lunardi I, Bryant J, Rabinovich P, Gallo R, Mahan L. Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a gene transgene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9472-6.
26. Alton EFWF, Middleton PG, Caplen NJ, et al. Non-invasive liposome mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice. *Nature Genetics* 1993; 5: 135-42.
27. Hyde SC, Bell DR, Higgins CF, et al. Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy. *Nature* 1993; 362: 250-5.
28. Porteous DJ, Dorin JR, Mclachlan G, et al. Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Therapy* 1997; 4: 210-8.
29. Gill DR, Southern KW, Mofford KA, et al. A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 1997; 4: 199-209.
30. Zhou JH, Pai BS, Reed MW, et al. Discovery of short, 3'-cholesterol-modified DNA duplexes with unique antitumor cell activity. *Cancer Res* 1994; 54: 5783-7.

Tous les vices à la mode passent pour vertus.

Todos los vicios de moda pasan por virtudes

Molière (1622-1673)

Don Juan, 1665