

## MATERIALES POLIMÉRICOS DE APLICACIÓN EN TERAPIA GÉNICA

**Edgar Barrera Bautista<sup>1</sup>, Víctor Hugo Bermúdez-Morales<sup>2</sup>, Efrén Hernández Baltazar\*<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Avenida Universidad 1001, Col. Chamilpa 62209, Cuernavaca, Morelos, México

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Salud Pública. Avenida Universidad No. 655 Colonia Santa María Ahuacatitlan, Cerrada Los Pinos y Caminera 62100, Cuernavaca, Morelos, México.

Correo electrónico: [efrenhbmex@yahoo.com.mx](mailto:efrenhbmex@yahoo.com.mx).

*Recibido: Junio de 2010; Aceptado: Diciembre 2010*

### RESUMEN

Para alcanzar el éxito con una terapia génica, el desarrollar un sistema de liberación adecuado puede ser uno de los factores más importantes a tomar en cuenta y en particular el material polimérico empleado para conseguir esto, durante la última década, se han desarrollado nuevos polímeros, los cuales no presentan restricción de empaquetamiento de DNA, presentan mayor biocompatibilidad y también son obtenidos a costos bajos de producción. Hasta el día de hoy se han empleado una gran cantidad de materiales poliméricos para liberar material genético *in vivo*, por lo que en este trabajo se hace un análisis de estos materiales poliméricos empleados en terapia génica.

**Palabras clave:** Terapia génica, sistemas de liberación, vectores no virales, polilisina.

### ABSTRACT

To reach a successful gene therapy, the development of appropriate gene delivery systems could be one of the most important factors to take in count and principally in the polymeric material to achieve this, during the last decade, new polymers have been developed, which have not limitation in DNA size, great biocompatibility and low production cost and reproducibility. A variety of polymer-based systems has been widely used to delivery therapeutic genes *in vivo*. Therefore, this review shows an analysis of the polymer-based systems employed in gene therapy.

**Key words:** Gene therapy, drug delivery, non-viral vectors, poli L-lysine.

### INTRODUCCIÓN

La terapia génica ha llamado la atención en los campos de la medicina, ciencias farmacéuticas y biotecnología debido a su potencial en el tratamiento de enfermedades crónicas y desordenes genéticos, también ha sido considerada como un sustituto aceptable para la terapia convencional basada en proteínas, aunque ésta todavía debe rebasar los problemas inherentes asociados con la administración de proteínas en términos de biodisponibilidad, toxicidad sistémica, velocidad de eliminación *in vivo* y costos de manufactura [1].

Existen dos componentes esenciales en la actual terapia génica: (i) un gen terapéuticamente efectivo que pueda ser expresado en un sitio en particular [2] y (ii) un sistema de liberación eficiente y seguro que libere los genes terapéuticos en un tejido específico u órgano [3]. Aunque se

han llevado a cabo más de 400 casos clínicos en los últimos 15 años [4], el tema sobre liberación de genes no está concluido. Los sistemas de liberación de genes deben ser diseñados para proteger el material genético de una degradación prematura en el torrente sanguíneo y además deben transferir eficientemente los genes terapéuticos a las células blanco u objetivo [5].

Aunque los vectores virales tienen algunas ventajas sobre los vectores no virales en términos de eficiencia en la transferencia, los vectores no virales tienen el mérito de su baja inmunogenicidad, la ausencia de recombinación de virus endógenos, bajo costo de producción y reproducibilidad [6]. Los vectores no virales no tienen limitantes respecto al tamaño del DNA para el empaquetamiento y la posibilidad de modificación con ligandos para ser específicos a un tejido o a una célula particular. La muerte de un paciente en un ensayo clínico de terapia génica usando vectores virales ha acelerado la investigación sobre vectores no virales [7].

Se han utilizado una amplia variedad de vectores poliméricos para liberar genes terapéuticos in vivo. Las modificaciones de vectores poliméricos también han mostrado exitosos avances para obtener una liberación específica en un tejido particular y en promover la eficiencia en la transferencia genética intracelular. Los acarreadores no virales basados en polímeros han sido usados debido a sus meritos en seguridad incluyendo su capacidad para evitar inmunogenicidad y toxicidad, la posibilidad de administraciones repetidas, y la facilidad de establecer prácticas adecuadas de manufactura (GMP).

Los sistemas de liberación empleando vectores no virales se dividen en tres categorías: (i) Liberación de DNA desnudo, (ii) sistemas lipídicos y (iii) sistemas poliméricos.

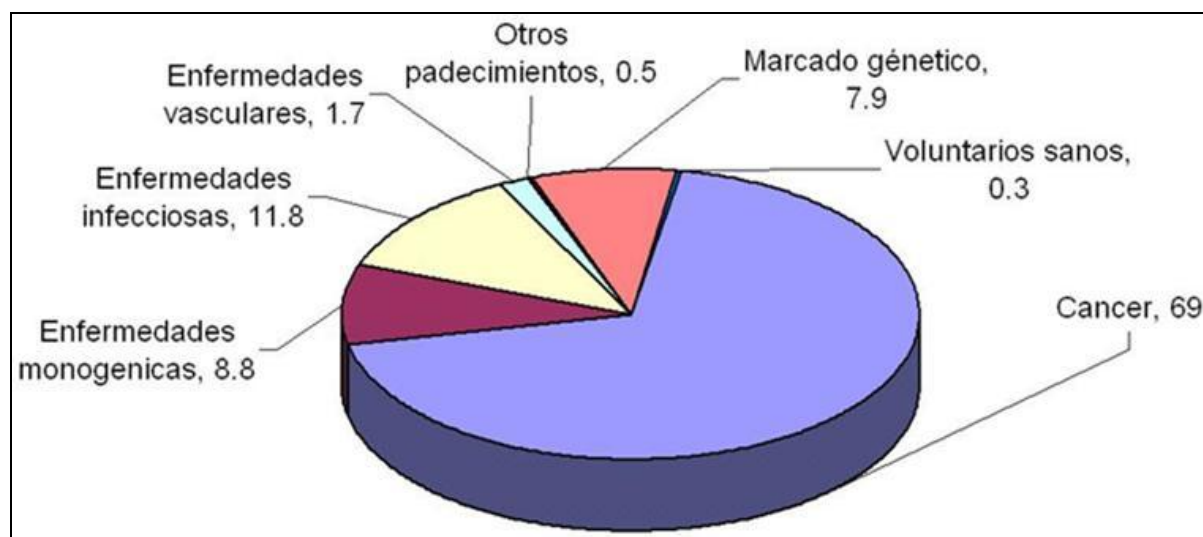


Figura 1. Porcentaje de pacientes por padecimiento en ensayos de terapia génica

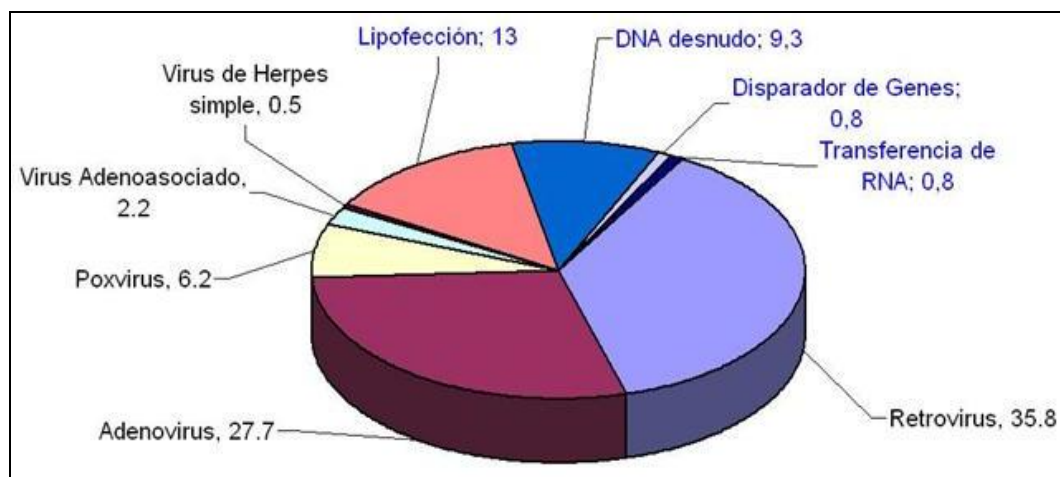


Figura 2. Estrategias de terapia génica por tipo de vector: Viral y No viral

Los principales polímeros empleados en terapia génica son derivados de polilisina (PLL), polietilenimina (PEI), policationes biodegradables, polisacáridos, polímeros neutros y no condensados, y soportes con estructuras poliméricas

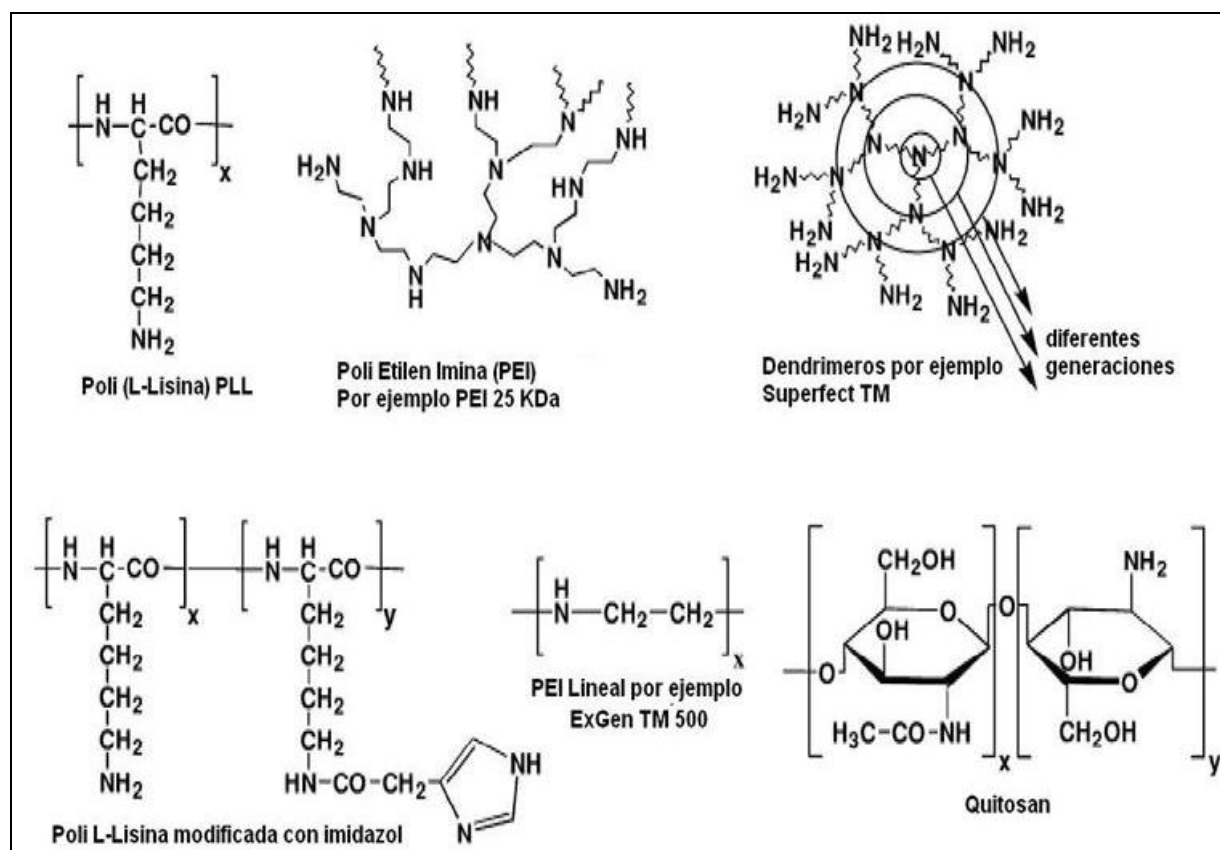


Figura 3. Ejemplos de polímeros catiónicos empleados para liberación de ácidos nucleicos. Modificada de Thomas Merdan et al., *Adv. Drug Del. Rev.*, 54, 2002

### 1. SISTEMAS BASADOS EN POLI (L-LISINA) (PLL).

Los PLL han sido ampliamente usados como acarreadores no virales desde que se conoce la

formación de un complejo entre PLL y DNA [8]. Los grupos primarios  $\epsilon$ -amina de la lisina PLL, los cuales están protonados en el medioambiente fisiológico, actúan electrostáticamente con los grupos fosfato cargados negativamente del DNA para formar nano partículas con un complejo de los poli-electrolitos. PLL que tienen un peso molecular de menos de 3000 podrían no formar complejos estables con DNA, sugiriendo que el número de aminas primarias en la cadena de PLL es importante para la formación del complejo [9]. Aunque los PLL con alto peso molecular tienen algunas propiedades para ser acarreadores de genes, los complejos PLL/DNA mostraron relativamente alta citotoxicidad [10] y una tendencia a agregarse y precipitar dependiendo de la fuerza iónica [11].

**1.1. PLL-PEG.** El contacto celular de los complejos PLL-DNA esta mediado por interacciones iónicas, las características catiónicas de la superficie del complejo pueden ser la causa de la citotoxicidad. Además la superficie cargada puede inducir la adsorción no específica de proteínas séricas resultando en una rápida eliminación del complejo del torrente sanguíneo. Por eso se ha conjugado con polietilenglicol PEG para prevenir la agregación interparticular de los complejos y para incrementar la estabilidad del complejo en presencia de proteínas séricas. Se han adicionado moléculas que actúan como anclas específicas para ciertos tejidos, entre ellas azúcares, anticuerpos, péptidos y folato.

**1.2. Polímeros tipo peine (PEG-g-PLL).** Éstos fueron sintetizados originalmente por *Choi et al.* [10]. Todos los polímeros pudieron formar eficientemente complejos con un plásmido de DNA y mostraron mucha mayor eficiencia en la transfección que los PLL. PEG-g-PLL también mostraron mucha menor citotoxicidad en células HepG2 comparado con PLL. En un estudio con diferentes proporciones de inserción de PEG (10, 15 y 20% mol), 10% mol PEG-g-PLL demostró la mayor eficiencia en protección del DNA de degradación enzimática y la mayor eficiencia de transfección, sugiriendo que el contenido de PEG insertado podría ser un factor importante para las propiedades del copolímero/complejo DNA [12].

**1.3. PLL-conjugados.** En contraste a los sistemas de liberación virales, los acarreadores no virales no presentan una selectividad inherente de unión a superficie celular e internalización, por lo que para resolver ésta limitación, han sido conjugados varios ligandos para células específicas o tejidos a los acarreadores no virales. Los ligandos más empleados en la conjugación son: PLL-azúcares, de los cuales los más empleados son lactosa y galactosa, PLL-AWBP (Arterial-wall binding peptide), donde el péptido que se enlaza a la pared arterial (AWBP) contiene el segmento que se une a pared arterial (1000–1016 amino ácidos) de la proteína apoB-100, un componente

proteínico principal de las LDL, PLL-AB (Antibody), PLL-folato y PLL-LDL (Terplex) Complejos de PLL con lipoproteínas de baja densidad [13].

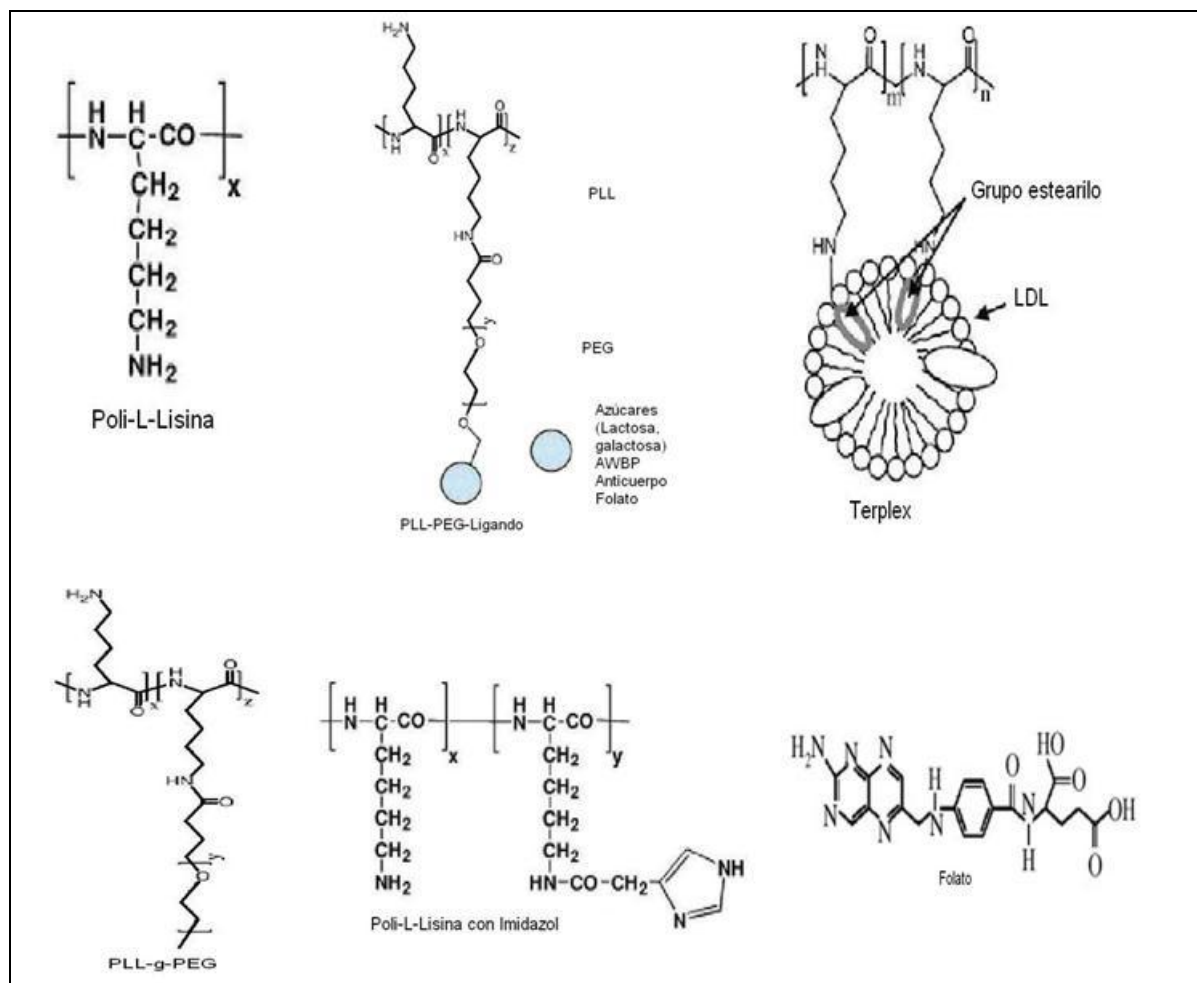


Figura 4. Estructuras químicas de acarreadores de genes basados en poli(L-Lisina) (PLL). PEG, polietilenglicol; AWBP, proteína que se une a pared arterial; LDL, lipoproteína de baja densidad. Modificada de Tae Gwan Park et.al. *Adv Drug Deliv Rev.*, **58** (2006).

**2. ACARREADORES DE GENES BASADOS EN POLIETILENIMINA (PEI).** Los polímeros basados en etilenimina (PEI) han sido unos de los acarreadores catiónicos de genes más populares debido a su eficiencia superior en transfección en muchos diferentes tipos de células. PEI tienen aminas primarias (25%), secundarias (50%) y terciarias (25%), de las cuales dos tercios de las aminas están protonadas en el medio fisiológico [14]. Las aminas no protonadas con diferente valor de pK confieren un efecto amortiguador sobre un amplio rango de pH. Esta propiedad amortiguadora le da al PEI la oportunidad de escapar del endosoma (efecto de esponja de protones) [15]. Esto podría proteger al DNA de la degradación en el compartimento endosomal durante la maduración del endosoma a lisosoma, facilitando el tránsito intracelular del DNA. La alta densidad catiónica del PEI también contribuye a la formación de partículas altamente condensadas por

interacción con el DNA. Sin embargo, esta propiedad podría conferir citotoxicidad significativa. Un estudio con PEI lineal con diferentes densidades catiónicas, preparado por hidrólisis controlada de poli (2-etil-2-oxazolona), mostró que la citotoxicidad y eficiencia de transfección eran dependientes no sólo de la densidad catiónica, pero también del peso molecular del polímero [16]. Estudios con PEIs lineales mostraron incluso mayor eficiencia de transfección y menor citotoxicidad comparados con PEI ramificados [17-18].

Polímeros altamente ramificados como 25-kg/mol PEI (*Aldrich*) y 800-kDa PEI (*Fluka*) son los más frecuentemente usados, así como polímeros con menores grados de ramificación. Polímeros con pesos moleculares altos, por ejemplo de 25 ó 800-kg/mol PEI, exhiben altas eficiencias de transfección, sin embargo su toxicidad también es alta [19]. Polímeros con pesos moleculares bajos, por ejemplo 800 g/mol, muestran baja toxicidad, pero su eficiencia de transfección es muy baja. Otra aproximación que combine las ventajas de los altos y bajos peso moleculares ha sido realizada entrecruzando PEIs pequeños, con enlaces disulfuro biodegradables, observándose una alta eficiencia de transfección con moderado incremento en la toxicidad [20]. PEIs Lineales [17] también se han sintetizado e investigado [21] y se pudo demostrar que PEIs lineales de 22 kDa, e.g. ExGen 500 (*Euromedex, France*), mostró excelente eficiencia de transfección con baja toxicidad [17-18]. PEI's lineales han sido reportados que median el ciclo celular independientemente de la entrada del plásmido al núcleo [22]. Este hallazgo es de particular importancia en la terapia de tejidos de lenta división.

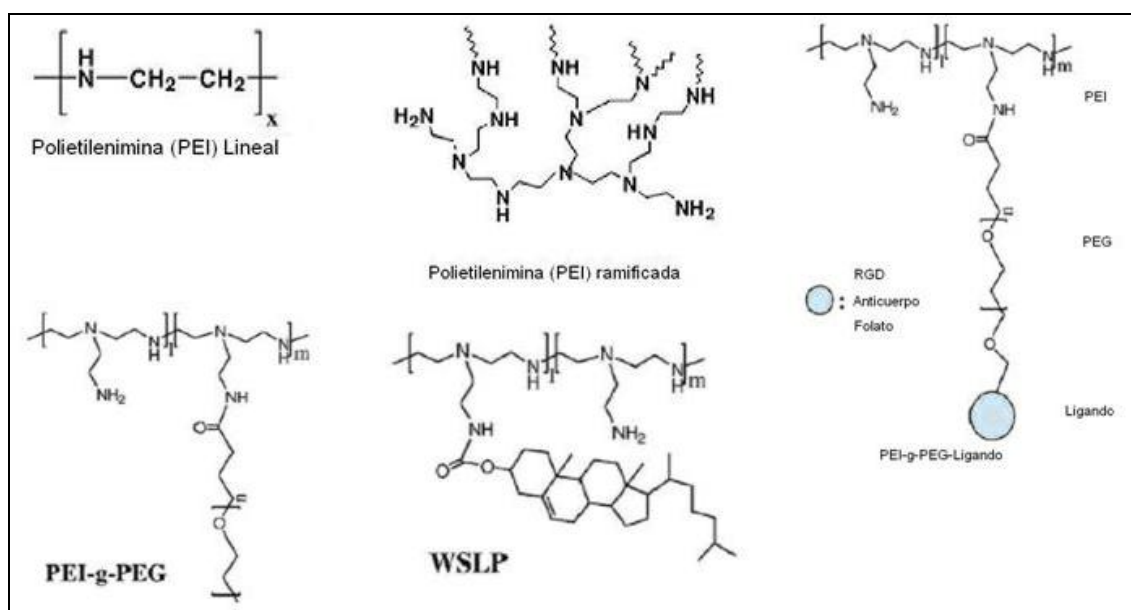


Figura 5. Estructura química de acarreadores basados en polietilenimina (PEI). WSLP, lipo-polímero soluble en agua; RGD, un péptido conteniendo la secuencia de aminoácidos Agr-Gly-Asp. Modificada de Tae Gwan Park et.al. *Adv Drug Deliv Rev.*, **58** (2006).

**2.1. PEI-PEG.** La citotoxicidad celular de los PEI-g-PEG fue reducida considerablemente, mientras que la eficiencia de la transfección de los PEI-g-PEG fue todavía comparable con los correspondientes PEI. La carga de la superficie de los complejos PEI-g-PEG/DNA fue reducida cuando el peso molecular de los PEG fue mayor a 5 kDa, debido a un efecto protector de la carga de los PEG. Sin embargo, un conjugado de PEI-g-PEG con PEG de bajo peso molecular (550 Da) no mostró el efecto de protección de carga [23].

## **2.2. PEI-conjugados.**

**2.2.1. PEI-g-PEG-RGD.** Un sistema de liberación de genes dirigido a células endoteliales angiogénicas (PEI-g-PEG-RGD) fue desarrollado para incorporar la integrina arh3/arh5 unida al péptido RGD [24-25]. Las células endoteliales angiogénicas en tumores sólidos presentan integrinas arh3/ arh5 en la membrana celular [26-27].

**2.2.2. PEI-AB.** Un anticuerpo monoclonal contra el receptor del factor de crecimiento epidermal humano-2 (HER-2) fue conjugado con un PEI lineal para transferencia de genes dirigido hacia células cancerosas [28].

**2.2.3. PEI-folato.** Se sintetizó un complejo de folato-PEG-folato-unido a -PEI (FPF-g-PEI) mediante la unión del grupo folato-PEG-folato al PEI [61]. El FPF-g-PEI pudo eficientemente condensar el plásmido de DNA para formar esferoides oblicuos con un diámetro promedio de 150 nm. En células de cáncer de colon CT-26, el FPF-g-PEI mostró menor citotoxicidad así como mayor eficiencia de transfección que el PEI no modificado [29].

**2.2.4. PEI-WSLP (water-soluble lipopolymer WSLP).** Los lipo-polímeros soluble en agua fueron sintetizados por conjugación de colesteril cloroformato a un PEI de bajo peso molecular (1,8 kDa) [30]. El balance entre el grupo colesterol hidrófobo y el PEI hidrófilo en los WSLP permitió al polímero formar una estructura micelar en medio acuoso (CMC = 500 Ag/mL). Los PEI de bajo peso molecular mostraron baja citotoxicidad; sin embargo, sus complejos con DNA tenían mayor tamaño que su variación en peso molecular y era propenso a formar agregados interparticulares [31]. Los PEI de bajo peso molecular mostraron mucha menor eficiencia de transfección comparados con los PEI de alto peso molecular [32]. En contraste, WSLP interactúa con el DNA para formar partículas coloidales estables (70 nm).

## **3. POLICATIONES BIODEGRADABLES**

Generalmente, los policationes biodegradables muestran mucho menor citotoxicidad y mayor (o comparable) eficiencia de transfección comparados con policationes no modificados, como PLL o PEI. Y es una opción cuando los acarreadores no virales y no biodegradables presentan baja eliminación, y presentan la posibilidad de acumulación y en consecuencia toxicidad.

**3.1. PAGA (ácido  $\alpha$ -[4-aminobutil]- l-glicólico).** El poli PAGA, es un análogo degradable del PLL. El PAGA pudo condensar eficientemente un plásmido de DNA para formar nanopartículas con tamaño promedio de 326 nm. El complejo fue completamente dissociado en un día de incubación a 37°C debido a la degradación del PAGA [74]. PAGA pudo proteger al DNA del ataque de las DNAsas mediante la formación de complejos de polielectrólitos [33]. PAGA mostró una significativa mayor eficiencia de transfección que el PLL, mientras que no se detectó citotoxicidad medible en el rango experimental, sugiriendo que el oligómero PAGA y monómero podrían ser biocompatibles [34].

**3.2. PAE.** Los poli amino esterés PAE son sintetizados por la adición de aminas primarias o secundarias a ésteres diacrilatos [35,36]. Los PAE fueron hidrolizados para producir 1,4-butanodiol y amino ácidos en un ambiente ácido y alcalino. Los polímeros mostraron mucho menor citotoxicidad que los PEI. Los PAE podrían interactuar con plásmidos de DNA para formar complejos en condiciones fisiológicas, de tamaño entre 50–200 nm. Los complejos formaron agregados interparticulares, dependiendo de la estructura del polímero y de la composición del monómero.

**3.3. PPE-EA.** Los PPE-EA biodegradables consisten de una cadena de fosfoéster y cadenas laterales aminoetoxi [37]. La cadena central de fosfoéster del PPE-EA puede ser hidrolizada para generar propilenglicol, fosfatos y etanolamina en condiciones fisiológicas. El polímero tiene significativamente baja citotoxicidad a concentración arriba de 0.1 mg/ml comparada con los PEI y PLL. PPE-EA, puede condensar un plásmido DNA para formar un complejo, en el cual el plásmido permanece intacto en presencia de DNAsa I. El plásmido DNA fue liberado del complejo después de 6 horas de incubación en PBS.

**4. PEI DEGRADABLES.** Los PEI son conocidos como uno de los acarreadores no virales más eficientes. Si embargo, muestran alta citotoxicidad, la cual depende del peso molecular del polímero. Los PEIs biodegradables son sintetizados por entrecruzamiento de PEI de bajo peso molecular (0,8 kg/mol) con PEG-bis-succinimidil succinato [38] o disulfuro conteniendo entrecruzadores, como ditiobis (succinimidilpropionato) (DSP) y dimetil 3,3V-ditiobispropionimidato (DTBP) [39].

Estos PEIs entrecruzados tienen mucho menor citotoxicidad que los PEI de alto peso molecular. Los complejos formados de los PEI entrecruzados aumentaron la eficiencia de la transfección comparados con PEI de 0,8 kg/mol [40].



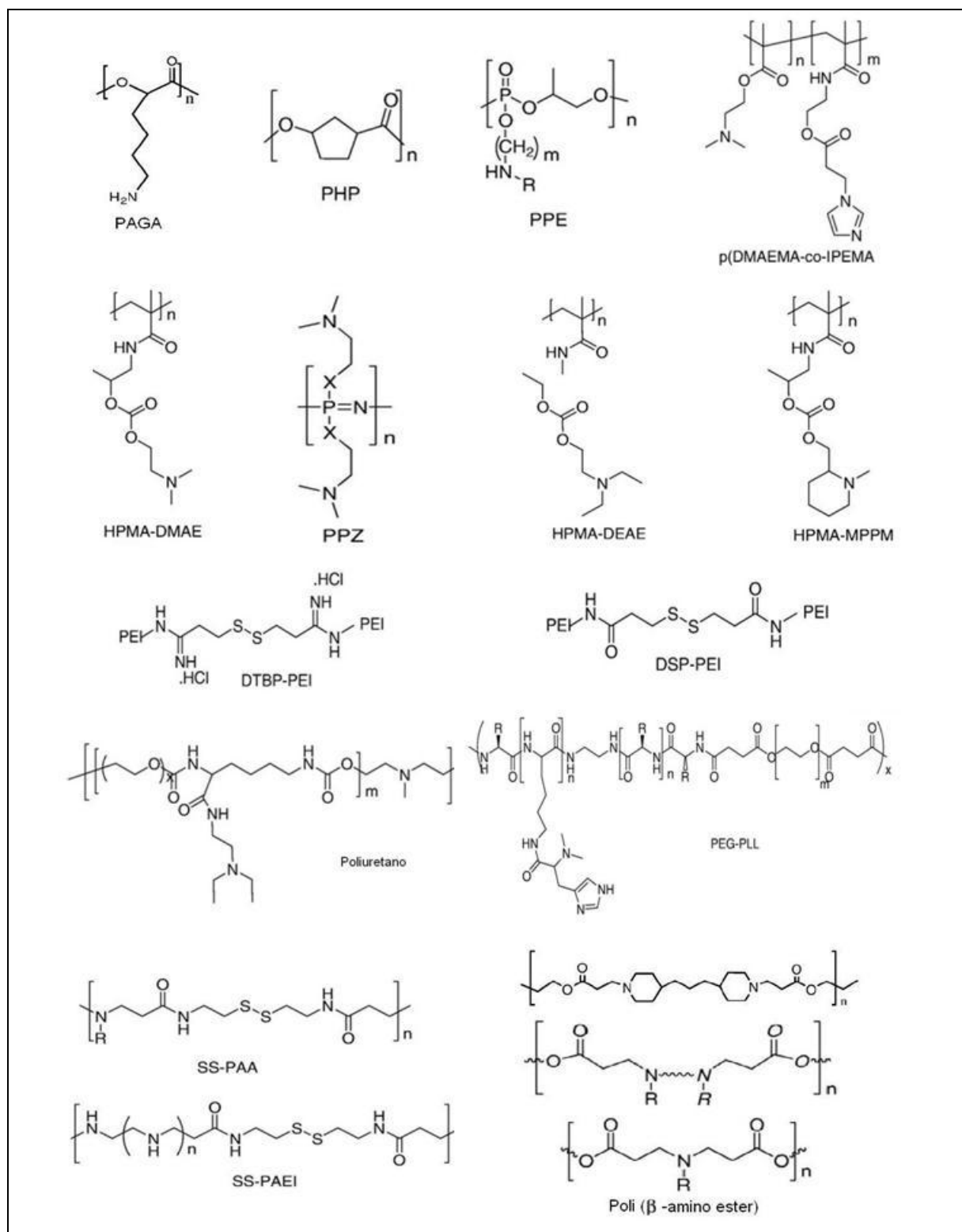


Figura 6. Estructuras químicas de polímeros catiónicos biodegradables. Modificada de Jordy Lutén et al., *J. Control Release*, **126** (2008).

La mitad de la cantidad de enlaces imina en el PEI fue degradada en una hora a pH 4,5. Sin embargo, el PEI lábil en medio ácido fue relativamente estable a pH fisiológico. Esto sugiere que el

PEI ácido lábil puede ser degradado en PEI de bajo peso molecular, el cual es menos tóxico que sus contrapartes de alto peso molecular, en el compartimento endosomal ácido. El PEI ácido lábil demostró eficiencia de transfección comparable hasta 25 kg/mol PEI, pero brindó mucho menor citotoxicidad que el PEI de 25 kg/mol.

## **5. SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE GENES BASADOS EN POLISACÁRIDOS**

**5.1. Ciclodextrinas CD.** Las ciclodextrinas son oligómeros cíclicos de glucosa (CDs). Dependiendo del número de unidades de glucosa, son clasificadas en  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CD para 6, 7 y 8 unidades de glucosa en un oligómero cíclico, respectivamente. CDs tienen una estructura anfifílica única, la cual consiste de una cavidad hidrófoba y un exterior hidrófilo. CDs son hidrosolubles, relativamente no tóxicas y no inmunogénicas. Polímeros lineales basados en fueron sintetizados por condensación del monómero diamino (monómero A) con otro co-monómero diimidato (monómero B) (Figura 4) [41]. La interacción entre el polímero de  $\beta$ -CD y el DNA permitió formar complejos compactos con tamaño de 100-150 nm y una relación de carga (+/-) sobre 5. La eficiencia de transfección del complejo  $\beta$ -CD fue comparable con los PEI y lipofectamina. Dosis intravenosas e intraperitoneales tan altas como 200 mg/kg no mostraron mortalidad en ratón. La presencia de la molécula de CD en las unidades del monómero A redujo la IC50 de los polímeros de  $\beta$ -CD hasta tres órdenes de magnitud comparado con poliamidinas sin CD [42]. Se sintetizaron polímeros lineales y ramificados con  $\beta$ -CD y se evaluó su potencial como acarreadores de genes [43]. La eficiencia de transfección fue reducida conforme aumentaba el porcentaje de CD. La sustitución de amina por CD pudo influenciar el pKA del PEI para prevenir la protonación y reducir el efecto amortiguador en el compartimento endosomal. Sin embargo, la citotoxicidad del polímero se redujo grandemente conforme se incrementaba el porcentaje de CD.

**5.2. Quitosano.** El quitosano se obtiene de la deacetilación de la quitina, es un polisacárido biodegradable compuesto de dos subunidades, d-glucosamina y N-acetil-d-glucosamina, los cuales están unidos por un enlace glucosídico (1-4). Los quitosanos son polímeros prácticamente no tóxicos, de los cuales el LD50 en ratas es de 16 g/kg, y es degradado por lisosimas en amino azúcares comunes [44]. El grupo amino primario de la subunidad deacetilada confiere una densidad catiónica mas alta a pH ácido y neutro (Figura 8) [45]. Si aumenta el peso molecular del quitosán (más de 100 kg/mol) se disuelve solo en ácidos diluidos, y pesos moleculares bajos (LMWC, 22 kg/mol) son mas solubles en soluciones fisiológicas amortiguadas [46]. LMWC puede formar complejos que interactúan con un plásmido DNA y eficientemente proteger el DNA de la degradación enzimática por DNAsa I. LMWC demostró mayor eficiencia de transfección que PLL, mientras la citotoxicidad de LMWC fue menor que la de PLL.

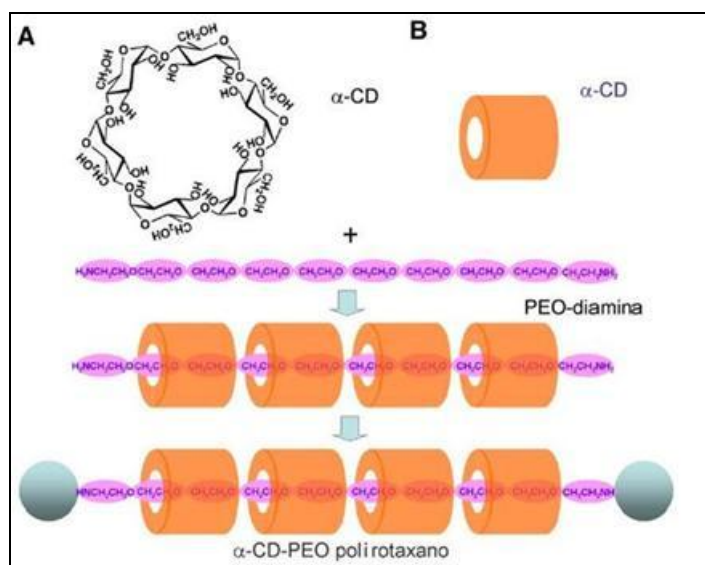


Figura 7. A) Estructura de una  $\alpha$ -CD; B) síntesis de polirotaxano de  $\alpha$ -CD y PEO diamina. Modificada de Jun Li et.al., *Adv Drug Deliv Rev.*, **60** (2008).

Quitosano modificado hidrofólicamente fue sintetizado por conjugación con ácido deoxicólico [47]. El quitosano modificado formo auto agregados esféricos de un diámetro promedio de 160 nm por la interacción con el DNA y exhibió una eficiencia de transfección para células COS-7. Quitosano lactosilado también fue preparado por amidación reductiva y evaluado como acarreador para liberación de genes en el receptor asialogly co-proteína [48]. Sin embargo, el quitosán lactosilado falló en aumentar la transfección en células HepG2, lo cual pudo ser debido a una reducción de la carga superficial de los complejos después de la lactosilación, resultando en una agregación interparticular. En contraste, quitosán- dextrano galactosilado sintetizado por el acoplamiento de ácido lactobiónico, soportando un grupo galactosa con el quitosán para especificada en hígado y acoplando dextrano al quitosán galactosilado para estabilidad en agua mostrando una eficiencia de transfección en células HepG2.

Los complejos formados por el plásmido DNA y quitosano ultra puro (N-deacetilación 83%, 162 kg/mol) mostraron una eficiente expresión de beta-galactosidasa en células epiteliales en las vías aéreas centrales después de administración intratraqueal [49]. El inicio de la expresión del gene con los complejos de quitosano/DNA fue retrasado si se comparan con los complejos PEI/DNA. Esto puede ser atribuido a un retraso en la salida del endosoma de los complejos quitosano/DNA. Sin embargo, pesos moleculares entre 30 y 170 kg/mol, proporcionan niveles de expresión que son comparables a los PEI.

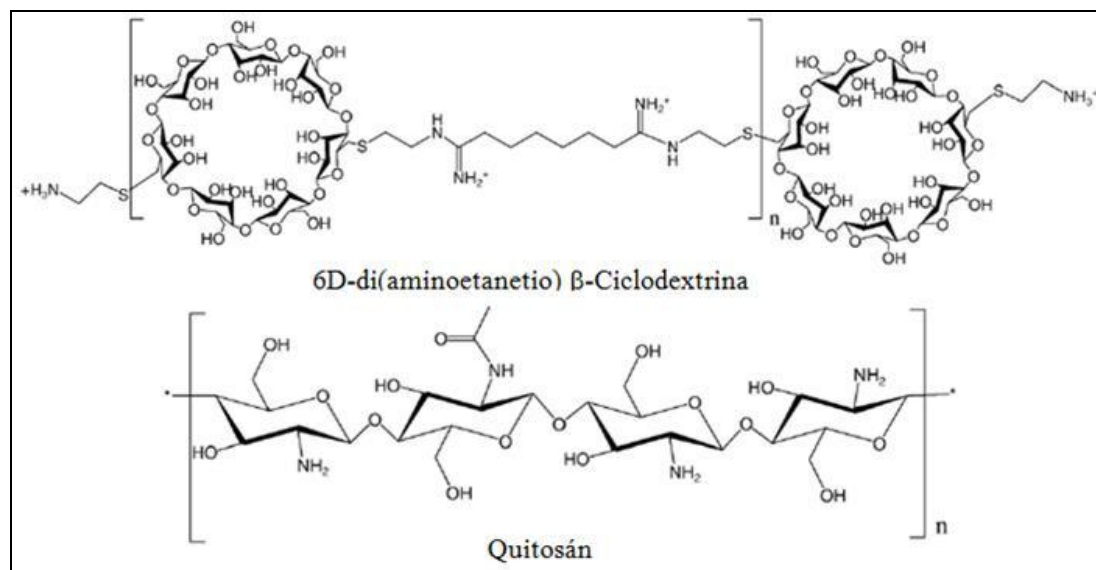


Figura 8. Acarreadores de genes basados en azúcares. Modificada de Tae Gwan Park et al., *Adv Drug Deliv Rev.*, **58** (2006).

## 6. OTROS SISTEMAS BASADOS EN POLICATIONES

**6.1. Poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato) pDMAEMA.** El pDMAEMA es polímero catiónico soluble en agua, el cual puede formar complejos compactos con tamaño de 200 nm por interacción electrostática con DNA [50]. A una relación de peso de 3–5 para transfección, 3–6% de las células (COS-7 y OVCAR-3) fueron transfectadas por el complejo pDMAEMA/pCMV-LacZ. La eficiencia de transfección se incremento con el aumento en el peso molecular del pDMAEMA. Un co-polímero de DMAEMA con 20% mol metacrilato de metilo (MMA) mostró eficiencia de transfección reducida y aumento en la citotoxicidad comparado con el homopolímero pDMAEMA. Sin embargo, un bajo contenido (20% mol) de un co-monómero hidrofílico (etoxitrieten glicol metacrilato (triEGMA) o N-vinyl-pyrrolidone (NVP)) demostraron similar extensión en la citotoxicidad y eficiencia de transfección respecto al homopolímero pDMAEMA [51]. Mientras que el co-polímero triEGMA (48% mol) mostró reducción en la eficiencia de transfección y en la citotoxicidad, el co-polímero NVP (54% mol) mostró aumento en la eficiencia de transfección y disminución en la citotoxicidad comparados con el pDMAEMA. Los estudios de interacción celular y transfección sugieren el empleo de poli(2-(trimetilamino) etil metacrilato) (pTMAEMA), un análogo de amonio cuaternario del p(DMAEMA), que no tiene la propiedad intrínseca de escape endosomal, en contraste al efecto amortiguador propuesto para el escape endosomal del pDMAEMA [52]. El pTMAEMA tiene mayor afinidad por el DNA comparado con pDMAEMA como se observó en los estudios de disociación del complejo usando poli(ácido aspártico) [53]. La

formación de complejos mas compactos entre pTMAEMA y DNA en conjunto con un pobre escape endosomal pueden ser la explicación a la baja eficiencia de transfección del pTMAEMA.

**6.2. Micelas.** Los oligonucleótidos antisentido (ODNs antisentido) y RNAs de baja interferencia (isRNAs) se han considerado como herramienta de gran alcance para la modulación de la expresión de gene, debido a su alta especificidad [54, 55]. Sin embargo, hay serios problemas que se deben superar para el uso terapéutico de ODN antisentido y de siRNA: la susceptibilidad de hidrólisis enzimática y pobre absorción celular [56,57]. Las micelas del complejo polielectrolito (PEC), que se podrían formar de la interacción entre el PEG-ácido oligonucleico conjugado (por ejemplo, oligonucleótido PEGilado) y un polication (por ejemplo, PEI), pueden ser considerados como acarreador no-viral con tamaño coloidal para solucionar los problemas inherentes (Figura 9). Una conjugación de PEG-ODN antisentido (ODN-PEG) que contenía un enlace ácido lábil fue sintetizada [58]. El conjugado podría auto ensamblarse para formar las micelas de PEC formulándolo con varios policationes funcionales, incluyendo el péptido fusogénico de KALA, PEI, y protamina. El segmento cargado negativamente de ODN interactúa con los policationes para formar un núcleo interno hidrófobo de carga neutralizada de micelas de PEC, mientras que el segmento de PEG se localiza fuera del núcleo para formar una corona hidrófila. El PEG circundante mejoraría la solubilidad de la nanopartícula en la solución acuosa y reduciría al mínimo la unión no específica a las proteínas de suero, adecuado para liberación sistémica. Las micelas de PEC demostraron una morfología esférica y un tamaño pequeño (70 nm) con una distribución estrecha [59]. Las micelas de PEC formadas de ODN-PEG y PEI lineal protegieron eficientemente el ODN contra la degradación mediada por nucleasas y demostró la adsorción mínima de las proteínas de suero debido a la cubierta de PEG que rodeaba el núcleo de PEC [60]. Las micelas de PEC que contenían un segmento antisentido de ODN demostraron la absorción celular realizada de ODN y la inhibición significativa del crecimiento del tumor en los ratones que llevaban el tumor sólido derivado de células cancerosas ováricas humanas (A2780) después de la administración intratumoral [61]. Las micelas de PCE administradas vía intravenosa también exhibieron una acumulación significativa de ODN en la región sólida del tumor comparada a ODN desnudo. Esto fue atribuido al efecto de alcance pasivo de partículas manométricas cerca de la vasculatura de un tumor sólido, que se llama efecto de impregnación y retención (EPR) [62]. De acuerdo con la misma idea, un sistema de liberación de siRNA usando micelas de PEC fue propuesto recientemente por conjugación de PEG lactosilado al ODN vía un enlace ácido-lábil del b-tiopropionato [63]. Las micelas de PEC formadas de la interacción con PLL forman una partícula esférica con un tamaño medio de  $117 \pm 26$  nm, según lo observado por microscopia electrónica de

transmisión (TEM). Las micelas de PCE demostraron una actividad significativa de interferencia del ARN (RNAi) en las células humanas de hepatoma (HuH-7), que era comparable a la del acarreador basado en liposomas catiónicos disponible comercialmente, oligofectAMINEk.

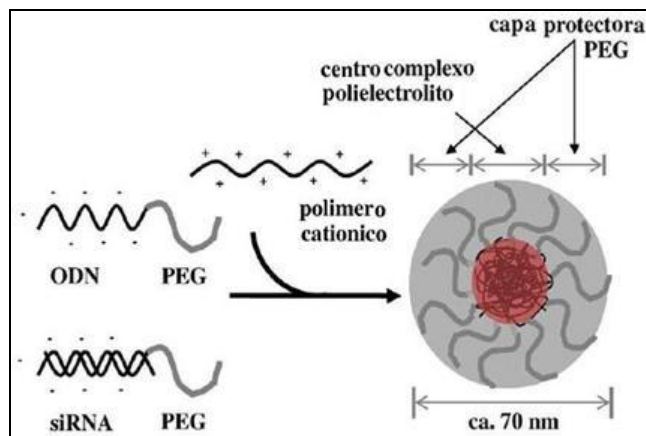


Figura 9. Diagrama esquemático de la formación de micelas con complejos de polielectrolitos. ODN, oligodeoxiribonucleotido; siRNA (small interfering RNA). Modificada de Tae Gwan Park et.al. *Adv Drug Deliv Rev.*, **58** (2006).

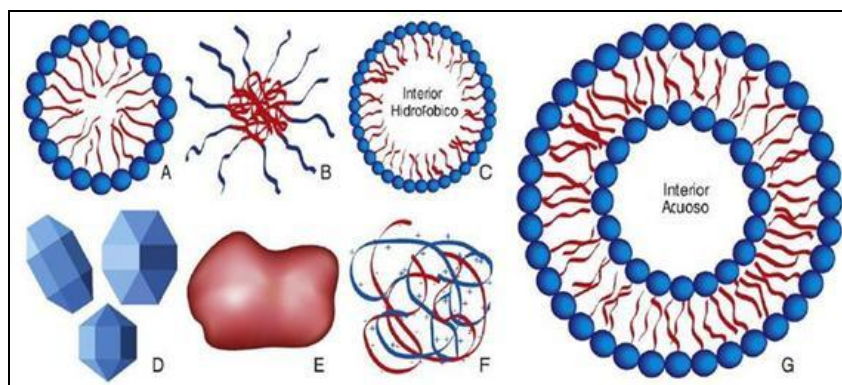


Figura 10. Ilustración esquemática (no a escala) de varias nanopartículas que podrían ser usadas en liberación de genes y fármacos impulsados por ultrasonido A: Micela (no polimérica) compuesta de tensioactivos anfifílicos, B: Micela polimérica compuesta de copolímeros anfifílicos, C: Nanoemulsión conteniendo un centro líquido estabilizado por un tensioactivo, D: Nanopartículas cristalinas, E: Nanopartícula polimérica amorfa, F: Oligómero iónico condensado, como DNA condensada con PEI o lípidos catiónicos, G: Liposoma de pared sencilla formado por una bicapa lipídica rodeando un núcleo acuoso. Modificada de Ghaleb A. Hussein y William G. Pitt, *Adv Drug Deliv Rev.*, **60** (2008).

## 7. SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE GENES BASADOS EN POLÍMEROS NEUTROS Y NO CONDENSADOS.

Aunque los polímeros catiónicos, que actúan electrostáticamente con el DNA para neutralizar su carga negativa y para condensar el DNA en partículas manométricas, se consideran generalmente como acarreadores de genes, los polímeros neutros tales como alcohol polivinílico (PVA) y

polivinilpirrolidona (PVP) se pueden también utilizar para la transferencia de genes. Pueden proteger el DNA contra la degradación enzimática y facilitar la absorción celular del DNA [64]. Estos polímeros pueden interactuar con el DNA vía puentes de hidrógeno y/o interacciones de *van der Waals*. Las interacciones de *van der Waals* de las cadenas hidrófobas del vinilo pueden rodear al DNA para hacer su superficie más hidrófoba. La formulación del plásmido DNA administrada intramuscularmente dio lugar a un aumento significativo en el número y distribución de células que expresaba el gen reportero en *ratas tibialis*, comparada con el plásmido desnudo [65-66].

Algunos polímeros neutros demostraron la capacidad de realzar la eficacia de la transfección de policationes. La eficacia de la transfección de los complejos entre el DNA y el poli(N-etil4-vinilpiridinio) fueron realzados significativamente por la presencia de 0,1% de Pluronic P85 (poloxámero, polioxietilen- polioxipropilen - polioxietilen, en el medio de transfección [67]. Un copolímero tribloque de PLGA-PEG-PLGA también exhibió un realce significativo en la expresión del gene para varios complejos de policación/DNA [68]. En presencia de 0,25% PLGA-PEG-PLGA, se observó un aumento de diez veces en la expresión del transgén con los complejos protamine/DNA. Un incremento similar también fue observado con las transfecciones de PEI- y PLL. La eficacia realzada de la transfección fue atribuida a la absorción celular creciente de los complejos de policación/DNA en presencia del co-polímero tribloque PLGA-PEG-PLGA.

## **8. LIBERACIÓN DE GENE A PARTIR DE ESTRUCTURAS POLIMÉRICAS PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS**

La regeneración de tejidos u órganos funcionales requiere de cultivos de tejidos tridimensionales y estos necesitan soportes para que las células se adhieran y crezcan. Estructuras poliméricas se han empleado generalmente como plataformas tridimensionales para el crecimiento celular proporcionando a las células una matriz de soporte donde adherirse, así como la oportunidad para que haya entrecruzamiento tridimensional de las mismas. Existen varios métodos de fabricación, incluyendo separación de fases inducida térmicamente [69-70], moldeo con solventes/lixiviación, formación de espuma/lixiviación [71] y la expansión en líquido supercrítico [72], se han propuesto para generar una estructura altamente porosa para el cultivo celular tridimensional. La estructura porosa requiere facilitar la infiltración de células sobre la estructura, del transporte del oxígeno y de nutrientes, y del retiro de basuras metabólicas celulares. Además, los suplementos exógenos, tales como factores de crecimiento, también serían necesarios para proporcionar señales para dirigir las células a la proliferación y a la diferenciación apropiada, y para inducir angiogénesis. Aunque la liberación controlada de las señales simuladoras podría ser mejor para las células, el uso de las proteínas terapéuticas, tales como factores de crecimiento, ha sido

obstaculizado por una liberación inicial importante debido a la naturaleza porosa de las estructuras [73] y a la pérdida de las proteínas terapéuticas durante la fabricación de los andamios [74]. La liberación de genes de las estructuras poliméricas se ha considerado como acercamiento atractivo para superar las desventajas de la liberación de proteínas. La liberación localizada y continua del DNA de las estructuras puede proporcionar una expresión de largo plazo de proteínas biológicamente activas para dirigir las células para formar un tejido deseado (Figura 11).

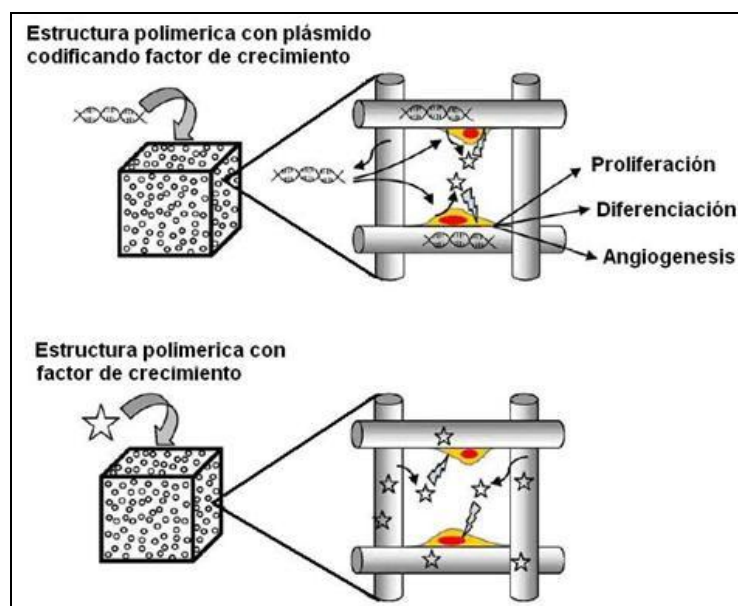


Figura 11. Diagrama esquemático de estructuras poliméricas cargadas con DNA-y factor de crecimiento (proteína). Las estructuras cargadas con DNA pueden liberar plásmido DNA codificando un gen del factor de crecimiento para que sea tomado por las células y unido a la estructura. Las células transfectadas pueden producir un factor de crecimiento, el cual entonces estimula a las células a proliferar p diferenciarse, o para inducir angiogénesis. Modificada de Tae Gwan Park et.al., *Adv Drug Deliv Rev.*, **58** (2006).

Una estructura porosa para la liberación continua del DNA fue preparado usando una técnica de separación de fases inducida térmicamente (TIPS) [75]. El DNA del plásmido fue incorporada directo en la matriz polimérica durante el proceso de la fabricación. La estructura se preparo agotando una solución que contiene un plásmido y PLGA (10%, w/w) disueltos en dioxano/agua (87:13) a 20°C por 24 horas, liberando el DNA de manera continua por 21 días. Los estudios de la electroforesis y de transfección evidenciaron que la fracción liberada de DNA estaba estructural y biológicamente intacta. Una estructura de PLGA que encerraba un plásmido DNA que codificaba el factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF) podría liberar DNA de una manera controlada. La implantación subcutánea de la estructura demostró la formación acelerada de los vasos sanguíneos y de los tejidos [76]. La matriz de colágeno, que encerró físicamente el plásmido DNA



que codificaba la hormona paratiroidea humana (hPTH1-34), fue fabricada y utilizada para realzar la regeneración del hueso después de una lesión en un perro [77]. La matriz formó una esponja porosa tridimensional llamada una matriz gene-activada (GAM). La implantación de GAM en defectos de la tibia o del fémur mostro la expresión continua de hPTH1-34 mRNA hasta 6 semanas con curación substancial en el sitio dañado.

## **9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

Los acarreadores poliméricos de genes han sido desarrollados para sustituir a los vectores no virales para evitar su inmunogenicidad y oncogenicidad. Aunque hemos sido testigos de considerables mejoras en las técnicas de transferencia génica usando vectores no virales en la década pasada, los requisitos estándar para uso clínico no han sido cumplidos en términos de eficiencia y especificidad. Estudios para superar las barreras subcelulares, incluyendo el escape endosomal y la translocación nuclear, deben ser considerados cuando se diseñe un vector polimérico. La formulación de polímeros catiónicos con péptidos fusogénicos, los cuales puedan facilitar el escape endosomal del complejo poliacación/DNA por unión a la membrana endosomal y ruptura, aumentando la eficiencia de transfección [78-79]. La localización nuclear del plasmido DNA podría ser la principal barrera limitante en la transfección de células de mamíferos. Se ha reportado que los plasmidos o sus complejos pueden ser localizados dentro del núcleo durante la división mitótica de las células. Entonces, es difícil de transfectar células no divisibles con vectores poliméricos. El problema con la importación nuclear puede ser parcialmente resuelto introduciendo señales de localización nuclear (NLS) al plásmido DNA o al polímero catiónico [80-81].

La liberación de genes es un proceso multi-etapas, en el cual las propiedades adecuadas de los acarreadores serían necesarias para avanzar en cada paso. Por ello es necesario que los vectores poliméricos multifuncionales sean diseñados racionalmente, los cuales puedan superar una serie de barreras extra e intra-celular, y empleando diseño a nivel molecular. En conjunto con el desarrollo del vector, el diseño de plásmidos debe también ser cuidadosamente considerado, desde la respuesta inmunotóxica podría ser causada por la presencia de CpG motifs no metilados en el plásmido [82]. La exclusión de CpG motifs del plásmido puede ser realizada por varios grupos [83-84]. La introducción de promotores a tejidos específicos o promotores reguladores a los plásmidos debe ser considerada en el proceso de diseño del plásmido. El método de fabricación de las matrices de liberación polímero/DNA debe ser mejorado, porque el proceso generalmente involucra disolventes orgánicos no polares para disolver los polímeros, en los cuales el DNA podría ser dañado por la interface agua/solvente orgánico. Por lo tanto, polímeros termorreversibles, como PEG-PLGA-PEG

y PLGA-PEG-PLGA (ReGelR) copolímeros tribloque, pueden también ser considerados como medio de liberación del DNA [85-86]. En estudios previos, ReGelR mostro excelentes perfiles de liberación de proteínas terapéuticas in vivo [87] péptidos [88].

Ya que los copolímeros tribloque pueden realizar la transición sol-gel en función de la temperatura, un plásmido DNA puede ser formulado con el polímero a baja temperatura y ser inyectado al organismo, resultando en una gelación inmediata del polímero, de donde el DNA será liberado de un modo sostenido para obtener una transfección prolongada en la vecindad del sitio de inyección. Para desarrollar sistemas no virales de liberación de genes aplicables clínicamente para regeneración de tejidos, podría ser importante combinar la tecnología de estructuras poliméricas con la tecnología no viral de transfección de genes.

## BIBLIOGRAFÍA

- 
- [1] F.D. Ledley. *Pharm. Res.* 13 (1996)
  - [2] J. Vacik, B.S. Dean, W.E. Zimmer, D.A. Dean. *Gene Ther.* 6 (1999)
  - [3] D. V. Schaffer, D.A. Lauffenburger. *J. Biol. Chem.* 273 (1998)
  - [4] B. Breyer, W. Jiang, H. Cheng, L. Zhou, R. Paul, T. Feng, T.C. He. *Curr. Gene Ther.* 1 (2001)
  - [5] S. Han, R.I. Mahato, Y.K. Sung, S.W. *Molec. Ther.* 2 (2000)
  - [6] M. Lee, S.W. Kim. *Delivery, Pharm. Res.* 22 (2005)
  - [7] D.J. Glover, H.J. Lipps, D.A. Jans. *Nat Rev Genet.* 6 (2005)
  - [8] U.K. Laemmli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72 (1975)
  - [9] D.Y. Kwoh, C.C. Coffin, C.P. Lollo, J. Jovenal, M.G. Banaszczyk, P. Mullen, A. Phillips, A. Amini, J. Fabrycki, R.M. Bartholomew, S.W. Brostoff, D.J. Carlo. *Biochim. Biophys.* 1444 (1999)
  - [10] Y.H. Choi, F. Liu, J.S. Kim, Y.K. Choi, J.S. Park, S.W. Kim. *J. Control Release.* 54 (1998)
  - [11] G. Liu, M. Molas, G.A. Grossmann, M. Pasumarthy, J.C. Perales, M.J. Cooper, R.W. *J. Biol. Chem.* 276 (2001)
  - [12] M. Lee, S.O. Han, K.S. Ko, J.J. Koh, J.S. Park, J.W. Yoon, S.W. Kim. *Molec. Ther.* 4 (2001)
  - [13] Tae Gwan Park, Ji Hoon Jeong, Sung Wan Kim. *Adv Drug Deliv Rev.* 58 (2006)
  - [14] M.C. Garnett. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 16 (1999)
  - [15] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J.P. Behr. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (1995)
  - [16] J.H. Jeong, S.H. Song, D.W. Lim, H. Lee, T.G. Park. *J. Control Release.* 73 (2001)
  - [17] S. Ferrari, E. Moro, A. Pettenazzo, J.P. Behr, F. Zacchello, M. Scarpa. *Gene Ther.* 4 (1997)
  - [18] Wightman L, Kircheis R, Rossler V, Carotta S, Ruzicka R, Kurska M, Wagner E, *J. Gene Med.*, 3 (2001)
  - [19] D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H.P. Elsasser, T. Kissel, *Pharm. Res.* 16 (1999)
  - [20] M.A. Gosselin, W. Guo, R.J. Lee. *Bioconjug. Chem.* 12 (2001).
  - [21] J.L. Coll, P. Chollet, E. Brambilla, D. Desplanques, J.P. Behr, *Gene Ther.* 10 (1999).
  - [22] S. Brunner, E. Furtbauer, T. Sauer, M. Kurska, E. Wagner. *Mol. Ther.* 5 (2002).
  - [23] H. Lee, J.H. Jeong, T.G. Park. *J. Control Release.* 76 (2001).
  - [24] W. Suh, S.O. Han, L. Yu, S.W. Kim. *Molec. Ther.* 6 (2002)
  - [25] W.J. Kim, J.W. Yockman, M. Lee, J.H. Jeong, Y.H. Kim, S.W. Kim. *J. Control Release*, 106 (2005)
  - [26] Sipkins DA, Cheresch DA, Kazemi MR, Nevin LM, Bednarski MD, Li KC, *Nat. Med.* 4 (1998)
  - [27] A. Erdreich-Epstein, H. Shimada, S. Groshen, M. Liu, L.S. Metelitsa, K.S. Kim, M.F. Stins, R.C. Seeger, D.L. Durde. *Cancer Res.* 60 (2000)
  - [28] S.J. Chiu, N.T. Ueno, R.J. Lee. *J. Control Release.* 97 (2004)
  - [29] J.M. Bennis, A. Maheshwari, D.Y. Furgeson, R.I. Mahato, S.W. Kim. *J. Drug Target.* 9 (2001)
  - [30] S. Han, R.I. Mahato, S.W. Kim. *Bioconjug. Chem.* 12 (2001)
  - [31] K. Kunath, A. von Harpe, D. Fischer, H. Petersen, U. Bickel, K. Voigt, T. Kissel. *J. Control Release.* 89 (2003)

- [32] W.T. Godbey, K.K. Wu, A.G. Mikos. *J. Biomed. Mater. Res.* 45 (1999)
- [33] Y.B. Lim, C.H. Kim, K. Kim, S.W. Kim, J.S. Park, *Am. Chem. Soc.* 122 (2000)
- [34] Y.B. Lim, S.O. Han, H.U. Kong, Y. Lee, J.S. Park, B. Jeong, S.W. Kim. *Pharm. Res.* 17 (2000)
- [35] D.M. Lynn, R. Langer. *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000)
- [36] D.M. Lynn, D.G. Anderson, D. Putnam, R. Langer. *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001)
- [37] J. Wang, H.Q. Mao, K.W. Leong. *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001)
- [38] C.H. Ahn, S.Y. Chae, Y.H. Bae, S.W. Kim. *J. Control Release.* 80 (2002)
- [39] M.A. Gosselin, W. Guo, R.J. Lee. *Bioconjug. Chem.* 12 (2001)
- [40] Y.H. Kim, J.H. Park, M. Lee, T.G. Park, S.W. Kim. *J. Control Release.* 103 (2005)
- [41] H. Gonzalez, S.J. Hwang, M.E. Davis. *Bioconjug. Chem.* 10 (1999)
- [42] S.J. Hwang, N.C. Bellocq, M.E. Davis. *Bioconjug. Chem.* 12 (2001)
- [43] S.H. Pun, N.C. Bellocq, A. Liu, G. Jensen, T. Machemer, E. Quijano, T. Schluep, S. Wen, H. Engler, J. Heidel, M.E. Davis. *Bioconjug. Chem.* 15 (2004)
- [44] T. Chandy, C.P. Sharma. *Cells Artif. Organs* 18 (1990)
- [45] N.G. Schipper, K.M. Varum, P. Artursson. *Pharm. Res.* 13 (1996)
- [46] M. Lee, J.W. Nah, Y. Kwon, J.J. Koh, K.S. Ko, S.W. Kim. *Pharm. Res.* 18 (2001)
- [47] K.Y. Lee, I.C. Kwon, Y.H. Kim, W.H. Jo, S.Y. Jeong. *J. Control Release.* 51 (1998)
- [48] P. Erbacher, S. Zou, T. Bettinger, A.M. Steffan, J.S. Remy. *Pharm. Res.* 15 (1998)
- [49] Koping-Hoggard M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Varum KM, *Gene Ther.*, **8** (2001)
- [50] van de Wetering P, Cherng JY, Talsma H, Crommelin DJ, Hennink WE, *J. Control Release*, **53** (1998)
- [51] P. Van de Wetering, N.M. Schuurmans-Nieuwenbroek, M.J. van Steenberg, D.J. Crommelin, W.E. Hennink. *J. Control Release.* 64 (2000).
- [52] Zuidam NJ, Posthuma G, de Vries ET, Crommelin DJ, Hennink WE, Storm G, *J. Drug Target*, **8** (2000)
- [53] C. Arigita, N.J. Zuidam, D.J. Crommelin, W.E. Hennink. *Pharm. Res.* 16 (1999).
- [58] J.H. Jeong, S.W. Kim, T.G. Park. *Bioconjug. Chem.* 14 (2003).
- [59] J.H. Jeong, S.H. Kim, S.W. Kim, T.G. Park. *Bioconjug. Chem.* 16 (2005).
- [60] M. Oishi, S. Sasaki, Y. Nagasaki, K. Kataoka. *Biomacromolecules.* 4 (2003).
- [61] J.H. Jeong, S.W. Kim, T.G. Park. *J. Control Release.* 93 (2003).
- [62] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori. *J. Control Release.* 65 (2000).
- [63] M. Oishi, Y. Nagasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005).
- [64] A.P. Rolland, R.J. Mumper. *Deliv. Rev.* 30 (1998).
- [65] R.J. Mumper, J.G. Duguid, K. Anwer, M.K. Barron, H. Nitta, A.P. Rolland. *Pharm. Res.* 13 (1996).
- [66] R.J. Mumper, J. Wang, S.L. Klakamp, H. Nitta, K. Anwer, F. *J. Control Release.* 52 (1998).
- [67] I. Astafieva, I. Maksimova, E. Lukanidin, V. Alakhov, A. Kabanov. *FEBS Lett.* 389 (1996).
- [68] J.H. Jeong, S.W. Kim, T.G. Park. *Pharm. Res.* 21 (2004).
- [69] Y.S. Nam, T.G. Park. *Biomaterials.* 20 (1999).
- [70] Y.S. Nam, T.G. Park. *J. Biomed. Mater. Res.* 47 (1999).
- [71] J.J. Yoon, J.H. Kim, T.G. Park, *Biomaterials.* 24 (2003).
- [72] D.J. Mooney, D.F. Baldwin, N.P. Suh, J.P. Vacanti, R. Langer. *Biomaterials.* 17 (1996).
- [73] D.D. Hile, M.L. Amirpour, A. Akgerman, M.V. Pishko. *J. Control Release.* 66 (2000).
- [74] Fu, A.M. Klibanov, R. Langer. *Nat. Biotechnol.* 18 (2000).
- [75] K.W. Chun, K.C. Cho, S.H. Kim, J.H. Jeong, T.G. Park. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 15 (2004).
- [76] L.D. Shea, E. Smiley, J. Bonadio, D.J. Mooney. *Nat. Biotechnol.* 17 (1999).
- [77] J. Bonadio, E. Smiley, P. Patil, S. Goldstein. *Nat. Med.* 5 (1999).
- [78] H. Lee, J.H. Jeong, T.G. Park. *J. Control Release.* 79 (2002).
- [79] Y.W. Cho, J.D. Kim, K. Park. *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (2003).
- [80] R. Tachibana, H. Harashima, Y. Shinohara, H. Kiwada. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52 (2001).
- [81] R. Cartier, R. Reszka. *Gene Ther.* 9 (2002).
- [82] G. McLachlan, B.J. Stevenson, D.J. Davidson, D.J. Porteous. *Gene Ther.* 7 (2000).
- [83] Yew NS, Zhao H, Wu IH, Song A, Tousignant JD, Przybylska M, Cheng SH, *Molec. Ther.*, **1** (2000)
- [84] Bigger BW, Tolmachov O, Collombet JM, Fragkos M, Palaszewski I, Coutelle C, *J. Biol. Chem.* **276** (2001)
- [85] Jeong B, Bae YH, Lee DS, Kim SW, *Nature*, **388** (1997)
- [86] Zentner GM, Rathi R, Shih C, McRea JC, Seo MH, Oh H, Rhee BG, Mestecky J, Moldoveanu Z, Morgan M, Weitman S, *J. Control Release*, **72** (2001)
- [87] Choi S, Kim SW, *Pharm. Res.*, **20** (2003)
- [88] Choi S, Baudys M, Kim SW, *Pharm. Res.*, **21** (2004)