

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOL·LECULAR

LIPOPOLIPLEJOS Y COMPLEJOS MONOMOLECULARES
DE ADN COMO VECTORES DE TERAPIA GÉNICA.

ISAÍAS SANMARTÍN SANTOS

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 29 de gener de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Guillermo Sáez Tormo
- Dr. Carles Ciudad Gómez
- Dr. Rafael Botella Estrada
- Dra. María de la Concepción Tros de Illarduya Apaolaza
- Dr. Benjamín Sarriá Chust

Va ser dirigida per:

Dr. Salvador F. Aliño Pellicer

©Copyright: Servei de Publicacions
Isaías Sanmartín Santos

Dipòsit legal: V-2097-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7860-1

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

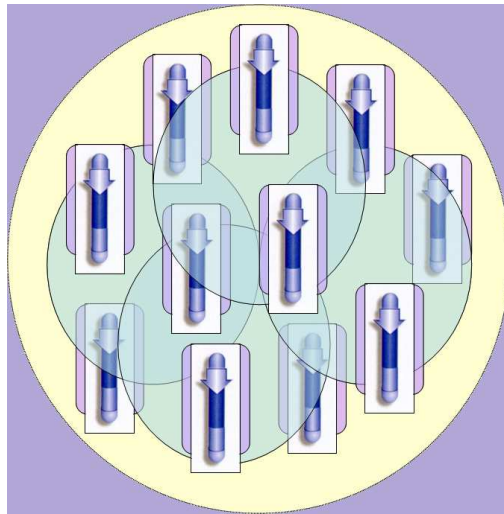
46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

Universidad de Valencia

Facultad de Ciencias Biológicas



**”Lipopoliplejos y complejos
monomoleculares de ADN como vectores
de terapia génica”**



Tesis Doctoral
Isaias Sanmartin Santos
Valencia 2009

Abreviaturas

APC	Célula Presentadora de Antígeno
CF	Carboxifluoreceína
CH	Colesterol
CMV	Citomegalovirus
DMEM	Dubelco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Dicetilfosfato
DRV	Dehydratation-rehydratation Vesicles
LB	medio de cultivo Luria Broth
LPP	Lipopoliploje
Hep	Heparina
HCC10/ADN	complejos HCC10/plásmido de ADN
MLV	Multilamellar Vesicles, liposomas
MLV-FT	MLV Freeze-Thawn, liposomas
NK	Natural killer, células
NPN	1-N-phenylnaphthylamine
PBS	Phosphate Buffered Saline
o/n	"overnight", durante la noche
P	Plásmido
PP	Poliploje ADN/PEI
pADN	Plásmido de ADN
PC	Fosfatidilcolina
PEI	Polietilenimina
PP	Poliploje
RCC10/ADN	complejos RCC10/plásmido deADN
SBF	Suero Bovino Fetal
SDS	Duodecil sulfato sódico
SM	Esfingomielina
SUV	Small Unilamellar Vesicles
SV40	Simian Virus 40
TX100	Triton X-100
TA	a temperatura ambiente
TMP	Tumor Membrane Protein

Agradecimientos

A Ana, de ella sólo decir que es la persona más importante en la realización de esta tesis, seguramente más que yo mismo. Y que estos años tan difíciles y de tanto sacrificio personal para realizarla han formado parte de lo que nos ha unido en nuestras vidas, junto con nuestra pasión por la Universidad. No por la institución, sino por la Universidad verdadera. Esa que vive en nuestras mentes y sueños y nos hace dedicar tanto trabajo, tiempo y esfuerzos a la docencia e investigación. Esa misma Universidad que residía en la mente de Cajal y otros grandes, la que transmitieron a las generaciones posteriores por la obra dejada y el ejemplo de su vida, y que otros recogemos y seguimos...

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1. Terapia génica. Generalidades... 3

2. La transferencia de ácidos nucleicos... 4

2.1. Los vectores...4

- 2.1.1. Métodos físico-químicos.
- 2.1.2. Vectores virales.
- 2.1.3. Vectores no virales.

2.2. Barreras a la transferencia de ácidos nucleicos...6

- 2.2.1. Barreras extracelulares...6
 - *Barreras extracelulares dinámicas.*
 - *Barreras extracelulares estáticas.*
- 2.2.2. Barreras intracelulares...9
 - *La membrana plasmática.*
 - *El endolisosoma.*
 - *La envoltura nuclear.*

3. Vectores no virales... 11

3.1. Clasificación vectores no virales...12

- 3.1.1. Clasificación según su especificidad...12
 - *Vectores no virales inespecíficos.*
 - *Vectores no virales específicos.*
- 3.1.2. Clasificación según su composición...13
 - *Vectores de base lipídica*
 - *Vectores de base polimérica*
 - *Vectores de composición mixta.*
 - *Otros tipos de moléculas*

- 3.2. Vectores de base lipídica:
*liposomas y lipoplejos...15***
 - 3.2.1. Liposomas...15**
 - 3.2.2. Lipoplejos...16**

 - 3.3. Vectores de base polimérica...18**
 - 3.3.1. Características del vector de transfección PEI y los poliplejos ADN/PEI...20**

 - 3.4. Vectores mixtos: lipopoliplejos...28**
-
- 4. Terapia génica y cáncer ... 30**
 - 4.1. *Las causas moleculares del cáncer...30***
 - 4.2. *La estrategia terapéutica de la modificación de la respuesta inmune antitumoral en el tratamiento del cáncer...33***
-
- 5. Vectores no virales para vacunas basadas en antígeno vs. Vectores para terapia génica ...39**
 - 5.1. *Desarrollo de un vector de transferencia génica basado en Liposomas y Polímeros catiónicos: el lipopoliplejo...41***
 - 5.2. *Desarrollo de un vector sintético semejante a virus para terapia génica no viral...43***

5.3. *Terapia génica viral y terapia génica no viral...50*

6. Objetivos... 52

2. Material y Métodos

2.1. *Principales productos y métodos utilizados... 59*

2.1.1. Cultivos celulares...59

2.1.2. Líneas celulares y animales de experimentación...60

2.1.3. Plásmidos...61
· *Obtención de plásmidos*
· *Extracción*
· *Cuantificación del ADN plasmídico y determinación de la pureza e integridad*

2.1.4. Aislamiento de suero de plasma murino...67

2.1.5. Extracción de antígeno GD3...67

2.1.6. Aislamiento de proteínas de membrana de células tumorales...68

2.2. *Preparación de liposomas...69*

2.2.1. MLV...69

2.2.2. SUV...70

2.2.3. DRV...70

2.2.4.	FT-MLV...71
2.2.5.	Cuantificación de lípidos...71
2.2.6.	Incorporación de sondas fluorescentes...72
2.3.	<i>Preparación del lipopolipolejo....73</i>
2.3.1.	Preparación de polipolejos ADN/PEI...73 · <i>Caracterización de la formación del PP por decaimiento de la fluorescencia</i>
2.3.2.	Preparación de lipopolipolejos...74
2.3.3.	Caracterización del LPP...76 A. Caracterización del LPP mediante ensayos de centrifugación · Experimentos iniciales · Caracterización con liposomas encapsulando CICs · Caracterización del LPP por combinación de las técnicas de fluorescencia y centrifugación B. <i>Caracterización del LPP mediante técnicas electroforéticas</i> · Caracterización del vector mediante ensayo de retardo en gel · Determinación de la relación óptima entre polipolejos y liposomas
2.3.4.	Terminología...81
2.4.	<i>Estudios de Microscopía...76</i>
2.4.1.	Microscopía electrónica de complejos RCC10/plásmido...83

- 2.4.2. Microscopía de fluorescencia del LPP...84
 - *Estudio de la distribución de la fluorescencia del IP en bazo*
 - *Formación del LPP*
- 2.5. ***Ensayos in vivo del lipopolisacárido en modelo murino...87***
 - 2.5.1. Protocolo general de vacunación...87
 - *Estudio de la respuesta inmunológica inducida por el LPP portando el antígeno GD3 de ratón*
 - *Ensayo de vacunación antitumoral con el LPP y el antígeno GD3 en modelo de melanoma murino*
 - *Ensayo de vacunación antitumoral con el LPP y extractos de proteínas tumorales de membrana (TMP)*
 - 2.5.2. Volumen de tumor y supervivencia de los ratones...89
 - 2.5.3. Determinaciones inmunológicas...90
 - 2.5.4. Transfección tisular con el LPP...92
- 2.6. ***Preparación de complejos RCC10/plásmido...86***
 - 2.6.1. Productos...94
 - 2.6.2. Preparación de complejos con ADN plasmídico...95
 - 2.6.3. Determinación de la cmc...95
 - 2.6.4. Métodos de preparación en frío...96
 - 2.6.5. Electroforesis...96

2.6.7. Espectrometría de masas de los agentes
HCC10 y RCC10...97

3. Resultados

**3.1. Desarrollo de un vector de transferencia
génica basado en detergentes catiónicos
con grupos tioles dimerizables...101**

3.1.1. Diseño y caracterización del vector...101

- Estructura, preparación y propiedades del vector RCC10
- *Determinación de la cmc de los agentes RCC10 y RCC12*
- *Caracterización electroforética de la formación del complejo plásmido-RCC10*
- *Ensayos de protección del complejo frente a la degradación en suero de ratón*

3.1.2. Preparación de complejos en frío...112

3.1.3. Microscopía electrónica de transmisión del complejo preparado en frío y a T^a ambiente...117

3.1.4. Demostración de la formación del complejo con el vector HCC10 y preparación del complejo con plásmidos grandes...120

- *Seguimiento de la formación del complejo por fluorescencia con la sonda NPN*
- *Formación del complejo a altas concentraciones de ADN*

- 3.2. Desarrollo del Lipopoliplejo...134**
- 3.2.1. Caracterización de la formación del PP por decaimiento de la fluorescencia...134**
 - 3.2.2. Experimentos preliminares que condujeron al desarrollo del lipopoliplejo...136**
 - Caracterización del lipopoliplejo por centrifugación*
 - Estandarización del protocolo de preparación de los poliplejos*
 - 3.2.3. Método de preparación del lipopoliplejo...143**
 - 3.2.4. Visualización del LPP por microscopía confocal...146**
 - 3.2.5. Caracterización electroforética del LPP...150**
 - Demostración cuantitativa de la formación del LPP*
 - Análisis en detalle del método electroforético nuevo para caracterización de lipopoliplejos*
 - Determinación de la relación óptima entre liposomas y poliplejos*
 - Interacción de liposomas catiónicos de DOTAP con el gel de agarosa*
 - 3.2.6. Caracterización del LPP por centrifugación...164**
 - Caracterización de LPP por centrifugación con liposomas encapsulando CICs*

· Caracterización de LPP con CICs y carboxifluoresceína

3.2.7. El LPP como vector tricompartimental...172

- Entrega de antígenos hidrosolubles situados en el core liposomal: biodistribución en bazo**
- Entrega de antígenos liposolubles por el LPP**
- Entrega de genes: transfección tisular del gen de la citoquina GM-CSF con el LPP**

3.3. Ensayos de funcionalidad in vivo de los vectores...177

3.3.1. Inmunización con antígenos lipídicos situados en la membrana liposomal (gangliósido GD3)...178

A. Estudio de la respuesta inmunológica humoral inducida por el lipopoliplexo con el antígeno GD3

B. Experiencias de vacunación contra el melanoma con el gangliósido GD3 y el gen de la citoquina GM-CSF

· 1ª Vacunación: con 3 dosis de vacuna

· 2ª Vacunación: con 6 dosis de vacuna

3.3.2. Con antígenos hidrosolubles situados en el interior liposomal (proteínas tumorales de membrana TMP)...187

- Desarrollo de un protocolo de vacunación con antígenos hidrosolubles para el LPP*
- Estudios de supervivencia y volumen del tumor*
- Respuesta inmunológica humoral*

4. Discusión...209

5. Conclusiones...259

6. Bibliografía...263

7. Anexo...289

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. TERAPIA GÉNICA. GENERALIDADES.

La terapia génica puede definirse como la transferencia de ácidos nucleicos portadores de genes a las células de un individuo con fines terapéuticos. Aunque la terapia génica en origen se dirigía al tratamiento de enfermedades hereditarias, en las que se trataba de aportar un gen que corrigiera un defecto genético heredado a consecuencia de una mutación en el material genético del individuo (recibido de sus progenitores), con el tiempo su utilización como terapia experimental se ha extendido a otras enfermedades asociadas a alteraciones genéticas, como el cáncer, y también a muchas patologías adquiridas no asociadas directamente a alteraciones genéticas, como el SIDA y las enfermedades cardiovasculares.

Los diferentes tratamientos y abordajes experimentales de terapia génica, necesitan como paso previo la comprensión de la base genética de la enfermedad que quiere ser tratada. Es por ello que su desarrollo está estrechamente relacionado con los avances en genómica, proteómica y a los resultados de los proyectos de secuenciación del genoma humano. La aplicación de la terapia génica ha basado su desarrollo en la tecnología del ADN recombinante y la síntesis automatizada de ácidos nucleicos, que ha permitido que los investigadores puedan obtener secuencias génicas a voluntad, en condiciones de cantidad y de calidad de secuencia suficientes para ser utilizados en experiencias y/o ensayos clínicos con fines terapéuticos. Además, la terapia génica va de la mano del desarrollo de los *vectores*, agentes que permitan la entrega selectiva de estas secuencias génicas a las células diana y que permitan que estos lleguen a su destino en las mejores condiciones y puedan ejercer su función terapéutica.

Ya que la entrega efectiva de los ácidos nucleicos a las células es un proceso muy dificultoso, pues los vectores deben pasar por distintas barreras y salvar numerosos obstáculos biológicos en su viaje hacia el núcleo celular. Por esta razón, uno de los desafíos básicos de la terapia génica consiste en el desarrollo de vectores que permitan la transferencia del material genético terapéutico a las células diana de una manera que sea lo más eficiente, específica y segura posible.

2. LA TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

2.1. LOS VECTORES.

Los vectores son los sistemas que median en el proceso de transferencia de un ácido nucleico exógeno (gen u oligonucleótido) a la célula, posibilitando la entrada y biodisponibilidad intracelular del mismo, de modo que pueda acceder al núcleo y conseguir expresarse. En un sentido más estricto, el término vector se aplica para definir al vehículo de transferencia que lleva el ácido nucleico hasta el núcleo o citoplasma celular. De acuerdo con esta definición, se pueden dividir las estrategias de transferencia de ácidos nucleicos del siguiente modo:

Métodos físico-químicos. Los métodos físico-químicos comprenden aquellas técnicas de que transferencia no implican la utilización de vectores, como son la transfección con fosfato cálcico (Schenborn and Goiffon 2000), la inyección directa de ADN (Wolff, Malone et al. 1990), la microinyección nuclear (Rulicke and Hubscher 2000), la transferencia génica con microproyectiles (“gene-gun”) (Yang, Burkholder et al. 1990), la electroporación (Heller, Jaroszeski et al. 1996; Mir 2001) y el procedimiento de transfección hidrodinámico (Liu, Song et al. 1999; Zhang, Song et al. 2000).

Vectores virales. Los virus son sistemas naturales diseñados por la evolución con el fin de introducir su material genético en las células que infectan para que acceda al núcleo celular y ser expresado. Los vectores virales surgen del intento de aprovechar la capacidad natural de los virus para la entrega de genes de interés terapéutico, mediante la inserción de los genes terapéuticos en el material genético viral con el fin de que puedan acceder al núcleo. Para evitar el desarrollo del proceso infeccioso, el virus es también modificado en el sentido de eliminar los genes implicados en la multiplicación del virus en el interior celular. El objetivo es que los virus modificados o vectores virales no puedan replicarse en el paciente, pero conserven la capacidad de entregar eficientemente el material genético propia de los virus. De esta manera, el agente viral no resulta en este sentido peligroso para el paciente, pues es incapaz de producir una infección. Existe una gran variedad de investigación para el desarrollo de virus que han sido manipulados para utilizarlos como vectores. Según la familia del virus original utilizado para desarrollar el vector viral, se pueden dividir en: vectores retrovirales (Kim, Kim et al. 2000), vectores adenovirales (Parks 2000), y vectores adeno-asociados (AAV) (2000; Athanasopoulos, Fabb et al. 2000). Otros vectores virales importantes están basados en el virus del herpes simple (HSV) (Burton, Wechuck et al. 2001) o el virus Onyx (Khuri, Nemunaitis et al. 2000). Existen además vectores virales híbridos, los cuales que surgen de la combinación de los anteriores, como los vectores adeno-retrovirales (Caplen, Higginbotham et al. 1999), los híbridos AAV-adenovirus (Heister, Heid et al. 2002) o AAV-HSV tipo I (Shayakhmetov, Carlson et al. 2002), etc. Las principales limitaciones del uso de virus modificados genéticamente como vectores en terapia génica se refieren a la seguridad (Verma and Somia 1997), destacando el intercambio de material genético con otros virus competentes, que pueden suministrar al virus terapéutico los genes que habíamos eliminado para evitar la replicación, si coinciden ambos virus en la misma célula. El resultado de ello es que el virus terapéutico recupera la

capacidad de replicarse e infectar nuevas células, lo cual puede ser muy peligroso para el paciente (Forestell, Dando et al. 1996). El otro gran obstáculo asociado al uso de virus es la respuesta inmune generada tras las sucesivas aplicaciones, que puede eliminar el virus terapéutico antes de que tenga ocasión de realizar la entrega del ácido nucleico (Ginsberg 1996; (Elkon, Liu et al. 1997), o la inducción de una intensa respuesta inflamatoria que puede llegar a ser peligrosa para el paciente.

Vectores no virales. La mayor parte de las estrategias de transferencia génica sin virus se basan en la utilización y desarrollo de los vectores no virales, que son sustancias químicas capaces de unirse al ADN terapéutico e incorporarlo al interior celular, facilitando su expresión. Son diferentes tipos de complejos de ácido nucleico con liposomas, polímeros catiónicos, péptidos, etc.

2.2 BARRERAS A LA TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Para que la transferencia génica se produzca con éxito, el ácido nucleico exógeno debe superar una serie de obstáculos hasta acceder primero a la célula y posteriormente al núcleo o compartimento intracelular en el que ha de ejercer su función. Estos obstáculos pueden ser clasificados en dos grupos: las barreras extracelulares y las barreras intracelulares. El grado y el modo de interferencia de las barreras extracelulares e intracelulares con la transferencia del gen dependen, entre otros factores, del tipo de vector empleado, el tipo de administración y el tipo celular destino de la transferencia.

2.2.1 Barreras extracelulares.

Las barreras extracelulares a la transferencia del gen pueden clasificarse, dependiendo de su naturaleza, en dos grupos: barreras extracelulares dinámicas y barreras extracelulares estáticas.

a) Barreras extracelulares dinámicas. Con esta denominación se quiere hacer referencia a los obstáculos extracelulares que implican procesos fisiológicos y bioquímicos y no simples obstáculos físicos, que impiden que el ácido nucleico llegue a entrar en contacto con las células diana. Estos procesos implican fundamentalmente la eliminación del ácido nucleico, vehiculizado o no, y en algunos casos la generación de inmunidad frente al tratamiento. El aclaramiento sistémico, proceso en el cual el ácido nucleico administrado por vía intravenosa es eliminado de la circulación sanguínea, es una de las consecuencias de la actuación de las barreras celulares dinámicas.

En el aclaramiento pueden intervenir diversos sistemas de eliminación dinámicos:

Degradación por nucleasas séricas. Las enzimas nucleasas presentes en el suero son capaces de degradar el ADN desnudo (Hill, Garnett et al. 2001).

La respuesta inmune celular y/o humoral. Se da fundamentalmente cuando se utilizan vectores virales en la transferencia. Los vectores virales son portadores de componentes muy inmunogénicos por lo que pueden despertar respuestas de inmunidad celular y humoral características de un virus, generando procesos inflamatorios (Nasz and Adam 2001). Estas respuestas se activan también en caso de administraciones no sistémicas.

Interacción con los componentes del suero y eliminación de los complejos formados por las células del sistema retículo-endotelial. Se dan fundamentalmente cuando se utilizan vectores no virales en la transferencia (*Dash, Read et al. 1999*). Los vectores no virales son menos inmunogénicos que los virales y su eliminación depende principalmente de sus características fisicoquímicas. Quizás las dos características más importantes son el tamaño de partícula y carga superficial. Las partículas administradas por vía intravenosa mayores de 5-7 μm en diámetro son eliminadas del plasma sanguíneo principalmente por filtración capilar en

los pulmones (Nishikawa and Huang 2001), mientras que las partículas con un diámetro menor de 5 μm son eliminadas generalmente de la circulación por las células del sistema retículoendotelial (Plank, Mechtler et al. 1996). La carga superficial también afecta a la eliminación y la biodistribución de partículas en sangre. Por ejemplo, se conoce que mientras que las partículas neutras son capaces de persistir en circulación por períodos largos, las partículas cargadas, sea positiva o negativamente son eliminadas de la circulación sanguínea con mayor facilidad. Estas partículas cargadas tienen tendencia a acumularse en el hígado, donde son captadas por los macrófagos (células de Kupffer) por endocitosis mediada por receptor (Plank, Mechtler et al. 1996), o por los macrófagos del bazo (Nishikawa and Huang 2001). Parece que esta eliminación es dependiente de la interacción de los vectores con proteínas del suero (Li, Tseng et al. 1999). La unión con las proteínas del suero cargadas negativamente y/o la activación del sistema del complemento (Wu, Lizarzaburu et al. 2001) inducen la formación de partículas grandes que son reconocidas por los sistemas de eliminación macrofágicos (Plank, Mechtler et al. 1996).

a) Barreras extracelulares estáticas.

El endotelio vascular. Si la administración de los vectores (sobre todo en el caso de vectores no virales) es intravascular, la expresión del gen se suele dar mayoritariamente en las células endoteliales (Zhu, Liggitt et al. 1993; Song, Liu et al. 1997). En algunos casos, aunque las células diana se localicen fuera de los vasos, el producto transgénico secretado por las células endoteliales puede llegar a alcanzar las células diana y ejercer así su función terapéutica. Sin embargo, en muchas otras ocasiones, el efecto terapéutico requiere la extravasación de la partícula vectorial para alcanzar la célula diana en el tejido. Si la población celular diana no se encuentra en sangre, el vector debe salir del torrente sanguíneo, debiendo atravesar el endotelio vascular. En condiciones normales, los vectores solo podrían pasar a través de epitelio discontinuo, el cual

presenta espacios entre las células endoteliales que oscilan entre los 30 y los 500 nm y carecen total o parcialmente de membrana basal (Nishikawa and Huang 2001). En un individuo sano, el endotelio discontinuo existe solo en el hígado, bazo y medula ósea. De este modo sólo vectores relativamente pequeños podrían pasar a través de los vasos sanguíneos e interactuar directamente con las células parenquimales. En caso de que el órgano diana sea el hígado, las partículas vectoriales deben tener un tamaño menor de 100 nm para poder atravesar los poros del sinusoides hepático (Romero, Morilla et al. 1999), mientras que el acceso al tejido de un tumor vascularizado se limita a las partículas de diámetro menor de 70 nm (Kircheis, Schuller et al. 1999).

Otras barreras estáticas. Muchos órganos o células diana para la terapia génica están además protegidos por tejido conectivo o rodeados de matriz extracelular, los cuales son también un obstáculo para la transferencia génica. También se pueden considerar barreras estáticas las interacciones inespecíficas de los vectores con células no diana, frecuentemente los eritrocitos (si la administración es por vía sanguínea) o con tejidos no-diana (Ogris and Wagner 2002), ya que estas células no forman parte de un sistema dinámico de captación. Mención especial merecen las barreras especiales a la transferencia del ácido nucleico al sistema nervioso central, como la barrera hematoencefálica o la envoltura de mielina que rodea los nervios.

2.2.2 Barreras intracelulares.

El éxito de una transferencia génica implica que el ácido nucleico ha de ser capaz de ejercer su función de modificación de la expresión génica. En general, para que esto suceda, el ácido nucleico ha de ser capaz de alcanzar el núcleo celular. Existen tres grandes barreras a nivel celular que dificultan la llegada del ADN al núcleo. Estas son: la membrana plasmática, el sistema endosomal-lisosomal y la membrana nuclear.

La membrana plasmática. Las membranas celulares permiten el paso de moléculas liposolubles o bien de moléculas pequeñas polares como el agua, pero las moléculas polares grandes o con carga no pueden atravesarla (a no ser que haya un sistema transportador, como una proteína de membrana). La penetración espontánea de un ácido nucleico al interior de una célula, es un proceso muy desfavorable, ya que se trata de una macromolécula con gran cantidad de cargas negativas. Por ello, excepto en casos excepcionales en que es posible que exista una captación dinámica por parte de la célula del ácido nucleico desnudo, se requiere de algún vehículo o procedimiento que facilite o induzca el paso del ácido nucleico a través de la membrana plasmática. Este proceso de entrada inducida puede suceder a través de mecanismos distintos, como la fusión (del vehículo) con la membrana, la endocitosis y la permeabilización o desestabilización de la membrana. El mecanismo depende del vehículo o procedimiento empleado.

El endolisosoma. Una vez el ácido nucleico ha entrado en la célula superando la membrana plasmática por endocitosis, se enfrenta a la vía de entrada o sistema endosomal-lisosomal. Cuando la internalización del ácido nucleico se produce a través de endocitosis, los ácidos nucleicos son compartimentalizados en las vesículas endosomales, las cuales, por regla general, acaban fusionándose con los lisosomas, de pH ácido y contenido rico en enzimas entre las que se encuentran nucleasas, que degradan el contenido de la vesícula, y por tanto el ADN exógeno. De esta manera un ADN exógeno sin protección atrapado en la ruta lisosomal puede ser totalmente degradado antes de llegar al núcleo. Las dos opciones que se plantean para superar el obstáculo del endolisosoma son 1) evitar la ruta de internalización endolisosomal, mediante vectores que usen con preferencia otra vía de entrada, como la fusión directa de vesículas liposomales con la membrana; o 2) que entre en el lisosoma protegido por un vector de terapia génica que le permita

resistir la degradación y escapar de él, para poder llegar al núcleo.

La envoltura nuclear. El transporte a través de la membrana es otro de los procesos que presentan serias dificultades. Los poros nucleares tienen un tamaño de **alrededor de 80 nm** y además presentan restricciones a la entrada de ciertas sustancias. Es por ello que algunos sistemas de transfección sólo funcionan o son más eficaces en la transfección de células en proliferación, en las cuales se disuelve la envoltura nuclear durante la fase M de la mitosis, permitiendo la distribución homogénea por el interior celular del vector, quedando internalizado el vector en el compartimento celular al reconstituirse el núcleo.

3. VECTORES NO VIRALES.

Los vectores no virales sintéticos se han desarrollado como una alternativa para superar muchos de los problemas de seguridad asociados a los vectores virales. En último extremo, el desarrollo completo de un vector no viral implicaría, entre otros aspectos, la igualación de los niveles en cuanto a eficacia de los vectores virales, limitando al máximo sus inconvenientes. La mayor parte de los vectores no virales sintéticos están basados bien en la encapsulación en liposomas, bien en la condensación del ácido nucleico en partículas (en el segundo caso por interacción electrostática con los agentes condensantes, en general positivamente cargados) con el objeto de proteger al ADN de la degradación y facilitar su entrada a la célula. La forma en que se facilita la entrada del ácido nucleico a la célula dependerá fundamentalmente de las características del vector, pero también de la célula implicada. Para conseguir la transferencia del ácido nucleico a la célula mediada por un vector no viral, es necesaria la consecución de una serie de etapas que incluyen la preparación del vector, interacción con la membrana plasmática e internalización celular, paso por el endosoma (en algunos casos), migración a través del citoplasma, entrada al núcleo y liberación del ácido nucleico

de forma adecuada. En la entrega de los ácidos nucleicos in vivo, existen obstáculos adicionales que deben ser superados, entre los que se incluyen barreras anatómicas, interacciones inespecíficas con los fluidos biológicos, matriz extracelular y células no diana. Finalmente, es muy conveniente que se produzca el reconocimiento y la internalización lo más específica posible en las células diana, y al mismo tiempo se debe evitar la entrega inespecífica del gen y los efectos secundarios adversos. Todos estos factores han de ser tenidos en cuenta a la hora de diseñar un vector no viral. Por ejemplo, la circulación en sangre del vector, su extravasación y difusión a través de los tejidos requiere que la partícula no exceda de cierto tamaño y que esté protegida frente a interacciones no deseadas, mientras que la entrega específica y eficiente de los ácidos nucleicos terapéuticos en las células diana requiere un diseño que incorpore tanto el sistema de entrega selectiva, como elementos que protejan al ácido nucleico en su tránsito intracelular, facilitando su llegada al núcleo en las mejores condiciones. Todos estos aspectos se discuten a continuación, tratándose con mayor profundidad los aspectos más relacionados con el objeto del trabajo experimental.

3.1 CLASIFICACIÓN VECTORES NO VIRALES.

Los vectores no virales pueden clasificarse bien según su especificidad, bien según la naturaleza de su composición.

3.1.1 Clasificación según su especificidad.

Según su especificidad pueden dividirse en vectores inespecíficos o en vectores dirigidos.

a) Vectores no virales inespecíficos. Se denominan vectores virales inespecíficos a aquellos que no poseen elementos cuya función esté orientada a entregar selectivamente a las células el ácido nucleico que transportan. La forma de interacción de estos vectores con la membrana celular es, por tanto, inespecífica. En principio, cualquier tipo de célula es susceptible de ser transfectada por un vector inespecífico, aunque existen diferencias en la eficacia de transfección que

dependen de factores como la naturaleza del tipo celular o su accesibilidad.

b) Vectores no virales específicos. Para aumentar la eficacia de transfección y añadir especificidad en la entrega de ácidos nucleicos, los esfuerzos se han orientado en combinar e incluso intercambiar la interacción no específica entre la superficie celular y los vectores por un mecanismo específico de internalización celular mediado por receptor, mediante la incorporación de ligandos unidos a los vectores. El concepto de transferencia génica mediada por receptor está basado en los mecanismos de entrada utilizados extensamente por los virus y las toxinas, pero también empleados en la internalización de macromoléculas, incluyendo nutrientes (por ejemplo, LDL, transferrina) y factores de crecimiento y hormonas (insulina, VEGF, EGF, FGF). En principio cualquier molécula con capacidad de reconocimiento específico puede ser utilizada en el direccionamiento. Los ligandos o “elementos direccionadores”, pueden ser proteínas, péptidos, carbohidratos, vitaminas, e incluso anticuerpos que reconocen específicamente un elemento de la superficie de la célula. Para la selección del elemento direccionador es necesario evaluar previamente la abundancia del receptor en las células diana, la especificidad, la afinidad de la unión del elemento direccionador al de superficie y si la interacción del ligando con el elemento de membrana es capaz de activar un proceso de internalización celular.

3.1.2 Clasificación según su composición.

Según la composición, la mayoría de los vectores no virales pueden dividirse en vectores de base lipídica o de base polimérica o de tipo mixto, además de algunas otras moléculas que se han utilizado también para constituirlos, como los tensioactivos dimerizables y otros tipos moleculares.

Vectores de base lipídica. Los vectores de base lipídica (liposomas y lipoplejos), basan sus características fundamentales como vector en las propiedades de los lípidos que incluyen en su formulación.

Vectores de base polimérica. Análogamente, los vectores de base polimérica (poliplejos) basan sus características fundamentales como vector en las propiedades de los polímeros que incluyen en su formulación.

Vectores de composición mixta. Existen además (desde el punto de vista de su composición) vectores “híbridos”, es decir, vectores en cuya formulación se incluyen tanto lípidos como polímeros, a los cuales se denomina lipopoliplejos, del término original en inglés “lipopolyplex” (Felgner, Barenholz et al. 1997) aunque, dependiendo del diseño pueden ser clasificados (dentro de la clasificación anterior) como poliplejos que incorporan lípidos o como vectores de base lipídica que incorporan polímeros en su composición, según la importancia mayor o menor que desempeñen uno u otro en las propiedades del vector. Dentro de lo que se pueden considerar lipopoliplejos, existen diferentes diseños estructurales del vector, en función de cómo se encuentren ensamblados o dispuestos los tres componentes (lipídico, ácido nucleico y polímero) en la estructura final. Fundamentalmente existen dos tipos de diseño principales, que son:

- El lípido se encuentra formando una vesícula liposómica individual en cuyo interior encontramos un ácido nucleico compactado con un polímero catiónico (García, L., M. Bunuales, et al. 2007; Feero, Li et al. 1997).
- El ácido nucleico compactado por el polímero catiónico se encuentra agregado con múltiples liposomas en un gran complejo. El lipopoliplejo que nos ocupa en el presente trabajo corresponde a este tipo estructural.

Otros tipos de moléculas. Además de polímeros y lípidos existe una variedad de tipos minoritarios especiales de moléculas que han sido usadas para constituir vectores no

virales, como los tensioactivos dimerizables mediante grupos tioles oxidables (Lleres, Dauty et al. 2001).

3.2 VECTORES DE BASE LIPÍDICA: LIPOSOMAS Y LIPOPLEJOS.

3.2.1 Liposomas.

Algunos de los primeros intentos de incrementar la entrega del ácido nucleico a la célula se realizaron utilizando liposomas que encapsulaban el ácido nucleico, los cuales se habían empleado ya desde hacía tiempo como transportadores de fármacos de todo tipo. Los liposomas utilizados se caracterizan por tener una composición basada en lípidos aniónicos o neutros (Wong, Nicolau et al. 1980; Nicolau, Le Pape et al. 1983; Alino, Bobadilla et al. 1993; Alino 1997), encontrándose el ácido nucleico encapsulado en los compartimentos acuosos internos del liposoma esférico, ya sea este mono o multilamelar. En este caso, la entrada a la células del ácido nucleico se produciría por la fusión del liposoma con la membrana celular (liposomas neutros) o por endocitosis del liposoma (liposomas aniónicos) (Lee and Huang 1997; Templeton, Lasic et al. 1997).

Los problemas para conseguir rendimientos de encapsulación del ácido nucleico aceptables, junto con la necesidad de separar los liposomas con el ADN encapsulado de las vesículas vacías, ha conducido al desarrollo de vectores basados en lípidos catiónicos, los cuales no presentan estos inconvenientes, por lo que gran parte de la experimentación en terapia génica con vectores lipídicos esté basada en formulaciones con lípidos catiónicos (ver apartado siguiente). A pesar de ello, los liposomas han seguido utilizándose sobre todo para formulaciones de administración sistémica *in vivo* dirigidas, ya que los lipoplejos presentan diversos inconvenientes cuando son administrados por vía sistémica.

3.2.2 Lipoplejos

Se utiliza el nombre de lipoplejos (traducción del término original en inglés “lipoplex”) (Felgner, Barenholz et al. 1997) y no el de liposomas catiónicos para denominar a los complejos formados por un ácido nucleico y una composición lipídica en la que se encuentra una proporción de lípido cargado positivamente, porque en general la estructura que adoptan espontáneamente estos complejos no es de tipo liposomal. La interacción electrostática del ácido nucleico con las cabezas polares catiónicas tiene como resultado la formación de partículas de formas y tamaños muy variables. En general, estas estructuras pueden ser de tipo lamelar (Pitard, Oudrhiri et al. 1999) o hexagonal (Koltover, Salditt et al. 1998) dependiendo del tipo de lípido utilizado y de las condiciones de preparación. Se espera que la carga positiva del lípido, además de promover la formación espontánea de los complejos, facilite también la interacción del complejo con la membrana plasmática, también cargada negativamente (Xu and Szoka 1996; da Cruz, Simoes et al. 2001) probablemente a través de la interacción con los proteoglicanos (Wiethoff, Smith et al. 2001). Los primeros trabajos con lípidos catiónicos sintéticos se remontan a 1987, año en que se describe la utilización in vitro del lípido catiónico sintético, DOTMA (cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio), cuya actividad de transfección era de 5 a 100 veces mayor que la de los agentes no virales utilizados en aquel momento, como el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano (Felgner, Gadek et al. 1987). Desde entonces, gran variedad de lípidos catiónicos se han desarrollado para la transferencia de ácidos nucleicos. Quizás los más conocidos y mejor estudiados, por ser los primeros en desarrollarse y extenderse para su uso rutinario como agentes de transfección en los laboratorios son el propio DOTMA y el DOTAP (sulfato de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio) (Lu, Benjamin et al. 1994). Generalmente un lípido catiónico consta de:

- Una cabeza polar, en la que las cargas positivas las proporcionan uno o varios grupos amina (primarios, secundarios, terciarios o cuaternarios).
- Una cola hidrofóbica, que suele estar compuesto por:
 - Dos cadenas hidrocarbonadas, que pueden ser saturadas (DOGC, DDAB, TM-TPS, DMRIE) o insaturadas (DOTMA, DOSPA, DOTAP, TFX-50, DOSPER)
 - Colesterol (CHOTB, ChoSC, DCCHOL, lip67, BGTC, BGSC).

Algunas formulaciones incorporan, además del lípido catiónico, lípidos neutros, como el DOPE (dioleilfosfatidil-dioleilfosfatidil-etanolamina), del cual se ha dicho que mejora la eficacia de transfección *in vitro* porque facilita la salida del endosoma (Farhood, Serbina et al. 1995), o colesterol (Semple, Chonn et al. 1996), el cual es capaz de mantener la eficacia de transfección en presencia de suero (Crook, Stevenson et al. 1998). Esta última propiedad es importante, porque la presencia de suero reduce notablemente la eficacia de la transfección *in vitro* de muchas formulaciones basadas en lípidos catiónicos (Felgner, Gadek et al. 1987). La eficacia de transfección *in vitro* de los lipoplejos supera con mucho a la de los sistemas basados en liposomas clásicos (encapsulando el ácido nucleico en su interior), por lo que su uso se ha generalizado en los laboratorios como método de transfección no viral en muchas líneas celulares con buenos resultados (Rodríguez, Noe et al. 1999; Audouy and Hoekstra 2001).

También se han desarrollado diversos modelos de transfección *in vivo* basados en lipoplejos (Audouy and Hoekstra 2001), unos basados en la administración por vía sistémica (Alino 1997; Song, Liu et al. 1997), otros a través de administración no sistémica (Porteous, Dorin et al. 1997). Sin embargo, los resultados de la utilización *in vivo* de los lipoplejos no son muy alentadores hasta el momento, especialmente los administrados por vía sistémica: su efectividad *in vivo* es muy baja, sobre todo cuando se la

compara con la de los vectores virales. Parece que la escasa eficacia de los lipoplejos in vivo es debida a la interacción de los lipoplejos con las proteínas del suero (Li, Tseng et al. 1999) la cual induce la agregación de los lipoplejos (Wu, Lizarzaburu et al. 2001) y la activación del sistema del complemento (Plank, Mechtler et al. 1996) que conduce a la eliminación de los lipoplejos antes de que puedan alcanzar las células diana. Respecto a la administración in vivo, los estudios se han centrado en desarrollar lipoplejos de pequeño tamaño capaces de difundir y de evitar la interacción con las proteínas del suero. La interacción con las proteínas del suero puede evitarse con el recubrimiento de las partículas lipopléjicas con moléculas “inertes” como el polietilenglicol (Dauty, Behr et al. 2002), o mediante la incorporación del colesterol en la formulación de los lipoplejos (Kawakami, Fumoto et al. 2000). Sin embargo, la eliminación de la carga positiva superficial, responsable de la interacción con las membranas celulares in vitro, obliga a la búsqueda de nuevas formas de interacción con las membranas celulares. Es por ello que se ha trabajado en el direccionamiento de los lipoplejos a tipos celulares específicos como estrategias de mejora de la eficacia de transfección.

3.3 VECTORES DE BASE POLIMÉRICA.

El nombre de poliplejo (traducción del término original en inglés “polyplex” (Felgner, Barenholz et al. 1997)) designa a los complejos que se forman entre un ácido nucleico (generalmente plásmidos u oligonucleótidos) y un polímero de carga neta positiva. La formación del complejo se produciría por la interacción iónica entre de las cargas negativas de los átomos de oxígeno de cada uno de los grupos fosfato del ADN con las cargas positivas del polímero, generalmente procedentes de grupos amina (Kabanov and Kabanov 1995). El número relativo de grupos amino y el pKa difiere de unos polímeros a otros. Algunos son polímeros lineales y otros son ramificados. Algunos presentan las cargas positivas en el esqueleto (polietilenimina lineal) mientras que

otros están en cadenas laterales (polilisina). Prácticamente la totalidad de trabajos con poliplejos en el primer lustro de la década de los 90 con éxito se basan en la utilización de vectores basados en polilisina (Garnett 1999). La explosión en el campo de los poliplejos se produce a partir de 1995-1996, cuando aparecen la mayoría de los polímeros catiónicos utilizados actualmente, la polietilenimina, los dendrímeros fracturados, los polimetacrilatos, los péptidos de cadena corta, y un año después el chitosan y los péptidos anfifílicos (1997). En la actualidad existe una gran variedad de polímeros catiónicos que han mostrado tener capacidad de transfección in vitro.

Los principales se pueden dividir en:

- **Proteínas**, fundamentalmente las histonas (Fritz, Herweijer et al. 1996) y las proteínas HMG(proteínas de alta movilidad electroforética) (Mistry, Falciola et al. 1997)

- **Polipéptidos**, sean estos homopéptidos, fundamentalmente la polilisina (Wagner, Cotten et al. 1991) y en menor medida polihistidina (Demeneix, Behr et al. 1998) o heteropéptidos, como los péptidos sintéticos de cadena corta (Gottschalk, Sparrow et al. 1996) y péptidos anfifílicos helicoidales (Legendre, Trzeciak et al. 1997).

- **Poliglucoaminas/poliglucoamidas**, fundamentalmente la glucoamina DEAE-dextrano (Milman and Herzberg 1981) y la glucoamida chitosan (Goldman, Soroceanu et al. 1997).

- **Polímeros sintéticos:**

• **Los dendrímeros PAMAM** (poliamidoaminas), inicialmente sintetizados y utilizados como dendrímeros íntegros (Haensler and Szoka 1993), de los cuales derivaron posteriormente los dendrímeros fracturados o “Starburst dendrimers” (Kukowska-Latallo, Bielinska et al. 1996; Tang, Redemann et al. 1996), con mejor actividad de transfección.

• **Los polimetacrilatos**, como el politrimetilaminoetilmetacrilato (pTMAEM) (Wolfert, Schacht et al. 1996), y el

poli(2-(dimetilamin-metacrilato (pDMAEMA) (Cherng, van de Wetering et al. 1996; van de Wetering, Cherng et al. 1998).

- **El PVP** (poli (4-vinilpiridinio))(Kabanov, Astafieva et al. 1993)

- **Las poliaminas lineales**, como la polialilamina (Boussif, Delair et al. 1999) y la (3-10)_n –poliamina (Demeneix, Behr et al. 1998).

- **La polietilenimina (PEI)**. La polietilenimina es un polímero sintético de base nitrógeno-carbonada (32,5% de nitrógeno). La etanolamina (-(CH₂-CH₂-NH)-), unidad monomérica del PEI, le confiere una alta solubilidad en agua y en la mayoría de los materiales polares incluyendo los alcoholes, los glicoles y ciertos solventes orgánicos, en los cuales se comporta como una base débil de Lewis. La característica más prominente del PEI es su elevada densidad de carga positiva. El PEI tiene la densidad de carga catiónica más alta que cualquier polímero orgánico conocido (20-25 miliequivalentes por gramo). Esta carga positiva la adquiere por la protonación de los grupos amina, los cuales toma del medio circundante. Esto implica que existe una correlación entre el pH y la densidad de carga positiva del PEI.

Características particulares del vector de transfección PEI y los poliplejos ADN/PEI

El agente de transfección utilizado en la constitución del vector lipopoliplejo (LPP) es la polietileneimina ramificada de 25kDa, por lo que dedicaremos este apartado especial a comentar algunos aspectos de esta molécula en su uso como vehiculo de transfección, de entre la abundante bibliografía disponible sobre las características y mecanismos de acción de los poliplejos ADN/PEI. Existen dos tipos de polietilenimina:

· **Polietilenimina ramificada** (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995). La forma ramificada se produce por la polimerización de los monómeros de aziridina (o etilenimina) por catálisis ácida, dando lugar a polímeros ramificados al azar (Godbey, Wu et al. 1999), con una relación de aminas primarias, secundarias y terciarias de 1:2:1 respectivamente. El PEI ramificado adquiere su densidad de carga positiva por la protonación de los grupos de la amina primarios y secundarios. Según su perfil de protonación, solamente cada cinco o seis grupos amino están protonados a pH fisiológico (Suh, Paik et al. 1994). Los grupos amina primarios, además de ser los más básicos son también los más reactivos, susceptibles de modificación química. La unión del ácido nucleico al PEI cambia levemente el perfil de protonación de PEI, estando de la mitad a un tercio de los grupos amina protonado a pH fisiológico. Por lo tanto, en contraste, con otros polímeros como la polilisina, el PEI tiene una alta capacidad tamponadora en un rango muy amplio del pH (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995; Tang and Szoka 1997). Aunque existe PEI ramificado de diferentes pesos moleculares, de 0,7 Da, 2, 25, 50, 70, y 800, los más utilizados como agentes de transfección son el de 25 y 800 kDa.

· **Polietilenimina lineal** (Ferrari, Moro et al. 1997).

Las formas lineares de PEI se pueden obtener por un proceso similar al de la polietilenimina ramificada, pero realizado en una temperatura más baja, o utilizando como monómero de partida un derivado de la 2-oxazolina. La más eficaz y utilizada en transfección es la de peso molecular de 22 kDa, y en segundo lugar la forma lineal de 25 kDa.

A pesar de que cada polímero catiónico posee características propias, existen propiedades fisicoquímicas que son comunes para la mayoría de poliplejos. Gran parte de la actividad de transfección de los poliplejos depende de sus características físico-químicas. Por esto se han realizado importantes esfuerzos en la caracterización físico-química de los poliplejos, con el objetivo de que estos parámetros pudieran

ser de utilidad a la hora de predecir y establecer las condiciones de preparación en que la transfección sea óptima. Las características fisicoquímicas de los poliplejos (estructura, tamaño, carga, capacidad de interacción con biomoléculas) dependen en gran parte de factores inherentes a la propia naturaleza del polímero (estructura, peso molecular, densidad de carga, etc.), pero también de propiedades comunes para todos los polímeros, como las relaciones de carga o masa entre el polímero y el ADN, y también de las características del solvente usado para la reacción electrostática, como la fuerza iónica (De Smedt, Demeester et al. 2000).

El tamaño de los poliplejos. Es un aspecto de gran importancia, puesto que como veremos más adelante, influye notablemente en su eficacia de transfección. El tamaño de los poliplejos puede oscilar entre unos pocos nanómetros hasta varias micras (Tang and Szoka 1997). Respecto a la estructura que estos adoptan se han descrito fundamentalmente poliplejos de forma esférica y toroidal (Tang and Szoka 1997), constituyendo partículas discretas o agregados de partículas (generalmente los complejos de mayor tamaño son agregados de partículas de tamaño menor). La carga de los poliplejos suele estar determinada por el balance catión-aniónico, aunque también está muy influenciado por la presencia de iones en la disolución.

Influencia de la relación de cargas. La mayoría de trabajos que utilizan polímeros catiónicos muestran que el tamaño, la estructura y la carga del poliplejo dependen en primer término de la relación de cargas positiva/negativa de polímero catiónico-ácido nucleico. Si se analiza la evolución del tamaño respecto a la relación de cargas, en condiciones de no agregación (preparados en H₂O), se observa que a relaciones bajas el tamaño es pequeño y este se va incrementando hasta la neutralización de las cargas, disminuyendo de nuevo a relaciones de carga mayores (Kabanov and Kabanov 1995; Pouton, Lucas et al. 1998). La relación de carga determina también la carga superficial de

las partículas polipléjicas, la cual se mide a través del potencial zeta. Para la mayoría de poliplejos el paso de un potencial zeta negativo a uno positivo se produce a una relación de cargas +/- cercana a 1. Los polímeros catiónicos permiten alcanzar potenciales en el rango de 20-40 mV (medidos en un medio de baja fuerza iónica), lo cual se cree que favorece la solubilidad de las partículas polipléjicas (Tang and Szoka 1997; Pouton, Lucas et al. 1998) .

En el caso de los PEI-poliplejos, la condensación completa se produce a partir de relaciones N/P de 2 o 3, (donde N es el número de átomos de nitrógeno del polímero y P el número de átomos de fósforo del ADN), con la formación de partículas de carga neutra ((Erbacher, Bettinger et al. 1999). A estas relaciones existe una tendencia a la agregación de las partículas. Las partículas compactas de tamaño menor se obtienen generalmente a relaciones N/P mayores, dando por resultado poliplejos de carga neta positiva (Erbacher, Bettinger et al. 1999). A las relaciones N/P utilizadas generalmente para conseguir una condensación completa (N/P>4), los complejos PEI/ADN tienen un potencial zeta en torno a +30-35 mV (Kircheis, Schuller et al. 1999; Ogris, Brunner et al. 1999). Respecto a la forma, cuando los complejos son de pequeño tamaño se han encontrado estructuras toroidales que oscilan entre los 40 y 80 nm (Tang and Szoka 1997; Ogris, Steinlein et al. 1998) y estructuras globulares de hasta 20-40 nm (Dunlap, Maggi et al. 1997).

Influencia de las condiciones de preparación de la muestra. Las condiciones de preparación de los poliplejos influyen enormemente también en el tamaño y la estructura del complejo, fundamentalmente en su nivel de agregación. Entre las más importantes están la concentración de sales o iones, el orden de mezcla (el ADN sobre el polímero o el polímero sobre el ADN) y la dilución de las muestras antes y después de la preparación. En general los poliplejos formados en solución salina son de un tamaño mayor que los formados en agua (baja fuerza iónica) (Tang and Szoka 1997; Ogris,

Steinlein et al. 1998; Kwoh, Coffin et al. 1999) y este puede modificarse con el tiempo.

Además, aunque los poliplejos hayan sido formados en condiciones de baja fuerza iónica, y a pesar de la presencia de la fuerte carga positiva de poliplejo, muchos poliplejos, como los de polilisina, agregan cuando son llevados a soluciones salinas de concentración fisiológica (Pouton, Lucas et al. 1998). Esta agregación está probablemente relacionada con un descenso en el potencial zeta real debido a la presencia de los electrolitos salinos (Tang and Szoka 1997).

Otros autores han demostrado la importancia del orden de adición de los reactivos, al observar que la eficacia de transfección *in vitro* era diez veces más alta cuando el polímero se añadía al plásmido (gota a gota) que a la inversa, agregando el ADN al polímero (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995; Boussif, Zanta et al. 1996). Posteriormente se comprobó que estas diferencias estaban en realidad asociadas a diferencias en el tamaño de los complejos preparados de uno u otro modo, lo que depende de la concentración del ADN y del polímero, de los volúmenes de las soluciones mezcladas, y finalmente de la velocidad de mezcla (Ogris, Steinlein et al. 1998). Esta tendencia a la agregación por encima de ciertas concentraciones es bastante frecuente en casi todos los polímeros. Cuando se usan volúmenes iguales de polímero y de ADN prediluidos no se observan diferencias importantes en la eficacia de transfección asociadas a la diferencia en la secuencia de la adición de los reactivos (Kircheis, Wightman et al. 2001).

Influencia del peso molecular y tipo de PEI. No parece haber diferencias importantes en el potencial zeta entre los poliplejos formados con los distintos tipos de PEI (PEI lineal y ramificado o PEI de alto o bajo peso molecular (Kircheis, Wightman et al. 2001)). En lo que se refiere al tamaño, en condiciones de baja fuerza iónica, los tamaños de poliplejos preparados con diversos tipos de PEIs (lineales y ramificados de distintos pesos moleculares) son bastante constantes. Sin embargo, cuando los complejos se forman en un medio de fuerza iónica más alta, aparecen notables diferencias.

Mientras que a fuerza iónica fisiológica los complejos formados con PEIs ramificados (de 25 o 800 kDa) son pequeños (50-80 nm) o medianos (de 100 nm a algunos cientos de nm), dependiendo de la concentración del ADN y el PEI utilizados, los complejos con PEI lineal de 22kDa forman agregados grandes, cuyo tamaño aumenta a medida que lo hace el tiempo de incubación (Kircheis, Wightman et al. 2001). Lo mismo ocurre cuando los poliplejos de PEI 22 kDa se preparan en medio sin sales (“libre de iones”) y son llevados posteriormente a medio salino (Goula, Remy et al. 1998; Kircheis, Wightman et al. 2001; Wightman, Kircheis et al. 2001). Estas diferencias de tamaño entre complejos lineales y ramificados tienen, como era de esperar, una marcada influencia sobre actividad de transfección. Los complejos grandes son más eficaces en transfección *in vitro*, pero los pequeños preparados en medio libre de iones tienen una superior difusibilidad y son capaces de superar la barrera capilar cuando se administran *in vivo*.

El paso por el endosoma: hipótesis de la esponja de protones. Cuando los poliplejos, dirigidos o no, son internalizados en endosomas u otras vesículas internas celulares, independientemente del mecanismo de internalización implicado, el material todavía está separado del citoplasma por una membrana lipídica. Se cree que, después de la internalización, la ruta celular habitual dirige generalmente las partículas internalizadas hacia la ruta lisosomal para proceder a la degradación de su contenido (Klemm, Young et al. 1998; Lecocq, Wattiaux-De Coninck et al. 2000). Para la mayoría de policationes, como la polilisina, la acumulación y degradación en el compartimiento endosomal es un obstáculo importante en el proceso de transfección (Mislick, Baldeschwieler et al. 1995), por lo que se obtienen niveles de transfección relativamente bajos. Sin embargo, algunas policationes, como el PEI, muestran una transfección *in vitro* substancial (Haensler and Szoka 1993; Kukowska-Latallo, Bielinska et al. 1996; Tang, Redemann et al. 1996; Tang and Szoka 1997). Este comportamiento ha intentado ser explicado a través de *la hipótesis de la esponja*

de protones, que asume que el PEI y los dendrímeros fracturados son capaces de tamponar el pH endolisosomal y de provocar en el endosoma un hinchamiento osmótico (Berh 1996). La clave del efecto esponja de protones estaría en el grado de protonación de los grupos amina de unos policationes y otros. Mientras que a pH fisiológico los grupos amina de la polilisina están totalmente protonados (pKa entre 9 y 10), los grupos amina del PEI y de los dendrímeros fracturados están sólo parcialmente protonados. Como consecuencia de ello, después de la endocitosis de los poliplejos de PEI o PAMAM, los grupos amina son capaces de captar protones del endosoma, lo cual se cree que debe producir un efecto tamponador del pH del endosoma acompañado por una acumulación de protones en el endosoma, el cual estaría acoplado a un flujo simultáneo de aniones cloruro al interior (Nelson 1991). Este incremento neto de la concentración de iones, provocaría la entrada masiva de agua al interior del endosoma, el hinchamiento y finalmente la ruptura del endosoma (Berh 1996). Esta es hoy por hoy la hipótesis más aceptada.

Transporte citoplasmático y acceso al núcleo. El gran obstáculo que supone el transporte citoplasma-núcleo lo evidencia el hecho de que cuando se inyectan por microinyección alternativamente PEI- poliplejos en el citoplasma y en el núcleo celular, son necesarias al menos 100 veces más copias de plásmido en el citoplasma que en el núcleo para obtener los mismos niveles de transfección. Así, se estima que, en el mejor de los casos, solo un 1% de poliplejo que es capaz de alcanzar el citoplasma llega finalmente al núcleo (Pollard, Remy et al. 1998). Aunque puede parecer un porcentaje escaso, los mismos estudios realizados con plásmido libre alcanzaron un rendimiento de llegada del 0.1% (Zabner, Fasbender et al. 1995; Labat-Moleur, Steffan et al. 1996; Pollard, Remy et al. 1998). Sin embargo, cuando el plásmido se compleja con DOTAP (lípidio catiónico) no se observa expresión, ni tras inyección citoplasmática ni nuclear. Por otra parte, cuando se comparó la cinética de expresión del transgen (vehiculizado con PEI-

poliplejos) por inyección citoplasmática con la de una transfección normal se observó que era semejante. Todos estos resultados sugieren que debe ser el transporte citoplasma-núcleo el principal obstáculo para la expresión del transgén.

Disociación de los poliplejos en el núcleo: disponibilidad nuclear.

Para que el ácido nucleico transportado pueda ejercer su efecto modificador de la expresión génica (expresión en el caso de un gen, hibridación con su ADN o ARN diana en caso de oligonucleótidos), se asume que el componente no nucleico en general, o el polímero catiónico en el caso de los poliplejos, ha de disociarse en algún momento del ácido nucleico. Para el caso de los lipoplejos, se ha demostrado, utilizando tanto ADN como lípidos marcados fluorescentemente, que mientras que el ADN marcado aparece en el núcleo, los lípidos catiónicos no presentan una localización nuclear, lo que sugiere que el desensamblaje de los lipoplejos se produce antes de que el ADN entre al núcleo (Marcusson, Bhat et al. 1998). Sin embargo, en el caso de los poliplejos existen ciertas evidencias de que el polímero (fundamentalmente el PEI) acompaña al ácido nucleico al núcleo, y no solo esto, sino que además lo dirige al núcleo (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995; Pollard, Remy et al. 1998; Godbey, Wu et al. 1999; Wightman, Kircheis et al. 2001). Diversos experimentos de internalización de PEI marcado fluorescentemente, solo o formando parte de poliplejos, realizados en algunos modelos celulares muestran una localización de la marca fluorescente preferentemente en el núcleo (Godbey, Wu et al. 1999). Respecto al desensamblaje, el destino parece depender del tamaño del ácido nucleico vehiculizado. En el caso de que se trate de un oligonucleótido existen evidencias de que este se separa del polímero (PEI) en el núcleo (Dheur, Dias et al. 1999), mientras en el caso de los plásmidos parece que estos permanecen, mayoritariamente, asociados al polímero. Cuando se marcan simultáneamente el PEI y el ácido nucleico (con sondas fluorescentes que emiten a longitudes de onda discriminables,

verde y roja respectivamente) y posteriormente se forma el poliplejo, la fluorescencia que se observa es de color amarillo, lo que indica que las sondas están suficientemente cerca como para que sus fluorescencias se solapen. Cuando se sigue la ruta intracelular de estos complejos marcados se observa que las marcas en el núcleo son mayoritariamente de color amarillo, aunque aparecen trazas, extranuclearmente, de color verde y rojo (que corresponderían a complejos disociados), lo cual indicaría que los poliplejos permanecen mayoritariamente sin disociar (Godbey, Wu et al. 1999).

3.4 VECTORES MIXTOS: LIPOPOLIPLEJOS

Los vectores basados en la asociación de liposomas y poliplejos son un desarrollo reciente y no existe por el momento una bibliografía tan abundante como en el resto de vectores; asimismo existe una carencia básica en técnicas de análisis de lipopoliplejos específicas para su caracterización. Baste decir que existen dos grandes grupos de entre los vectores descritos que usan conjuntamente liposomas y poliplejos, de los que citaremos algunos trabajos de cada tipo a modo de ejemplo:

1) aquellos en los que el componente poliplejo está encapsulado o internalizado en el interior del core de una vesícula lipídica (Arango, M. A., N. Duzgunes, et al. 2003). Mustapa, M. F., S. M. Grosse, et al. (2009). Kurosaki, T., R. Kishikawa, et al. (2009). Brito, L., S. Little, et al. (2008). Garcia, L., M. Bunuales, et al. (2007). Pelisek, J., L. Gaedtke, et al. (2006).

2) vectores basados en la asociación de múltiples unidades de ácido nucleico, liposoma y poliplejo, El polication puede asociarse previamente al ADN para compactarlo formando un poliplejo, o bien el método de preparación implica que los tres componentes interactúan todos ellos entre sí para formar un complejo (Pelisek, J., L. Gaedtke, et al. (2006); Matsuura, M., Y. Yamazaki, et al. 2003;).

Los poliplejos y liposomas han sido utilizados conjuntamente para desarrollar complejos ternarios capaces de mejorar las propiedades de transfección y/o distribución respecto al lípido o poliplejo por separado. La adición de un polímero catiónico, tal como la polilisina, se ha utilizado para condensar el ADN reduciendo la tendencia a agregar formando complejos grandes, así como para proteger el ácido nucleico frente a la degradación por nucleasas. La adición subsiguiente de liposomas de adecuada composición y bajo agitación puede producir un complejo final consistente en un ácido nucleico compactado por el polication y rodeado de una bicapa lipídica. Por ejemplo, el complejo resultante de la mezcla de poliplejos ADN/polilisina y liposomas DOPE/colesterol se ha llamado LPD (Lee, R. J. and L. Huang 1996). Estos vectores de transfección, que son de los que aparece un mayor número de trabajos en la bibliografía, son a menudo referidos por sus autores como “lipopoliplejos” en base a su composición. Por su estructura corresponden a los del primer tipo, y son por tanto un tipo de vector completamente diferente al vector LPP que hemos desarrollado en la presente tesis doctoral, que correspondería al segundo tipo. En otros artículos de la literatura científica del campo, los vectores que se describen son obtenidos también mediante mezcla de los tres tipos de componentes, plásmido, liposomas y polication, pero el rango de tamaños de la población de partículas usualmente delata que deben corresponder estructuralmente al segundo tipo, aunque es un aspecto que se obvia en los trabajos debido seguramente a la carencia de una técnica adecuada de caracterización. (Murray, K. D., C. J. Etheridge, et al. 2001; Pelisek, J., L. Gaedtke, et al. 2006; Dokka, S., D. Toledo, et al. 2000). El lipopoliplejo, objeto del presente trabajo, correspondería al segundo tipo.

4. TERAPIA GÉNICA Y CÁNCER

El cáncer es una enfermedad de los genes o, más concretamente, de la expresión genética. La presencia de alteraciones de diverso tipo, pero todas en último término con

origen en cambios en el material genético que producen una expresión genética alterada de los genes que se relacionan con el ciclo celular, conduce al desarrollo del fenotipo tumoral. Una gran cantidad de investigación fundamental sobre los mecanismos subyacentes a las alteraciones que se encuentran en las células de los diversos tipos de tumores han conducido a la visión actual del cáncer, como un proceso que se origina en los genes y en el que participan una serie de alteraciones genéticas encadenadas que son la que en último término conducen al fenotipo tumoral. Existen pues múltiples tipos de cáncer según el mecanismo que conduce a la alteración del control del ciclo celular, y los diversos tratamientos en investigación relacionados con la transferencia de genes exploran diversas estrategias para eliminar las células cancerosas. Según datos recientes (Gene therapy clinical trials worldwide, www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical) más del 65% de ensayos clínicos en terapia génica humana han estado dirigidos a tratamientos del cáncer.

4.1 LAS CAUSAS MOLECULARES DEL CÁNCER

El cáncer es consecuencia de una alteración en los mecanismos reguladores de la proliferación celular. Esta alteración puede ser debida a una mutación dominante, que produce una sobreexpresión y proporciona una ganancia de función (que provoca una división celular descontrolada, es el caso de mutaciones en los llamados *protooncogenes*); o provenir de una mutación que provoca la pérdida de función de un gen que reprime el proceso de división celular (los llamados *genes supresores de tumores*). Ambos tipos de alteraciones genéticas pueden conducir a una desregulación del crecimiento celular. En cualquier caso, las alteraciones conducentes a la pérdida de control de la división celular son un fenómeno que puede calificarse de normal en humanos, como seres pluricelulares constituidos por billones de células que están expuestas a una multiplicidad de factores (agentes químicos mutagénicos, radiación UV, etc.). Sin embargo, el sistema inmunitario realiza funciones de vigilancia para

eliminar cualquier célula que muestre signos de haber sufrido una alteración en su expresión génica (antígenos), bien sea por estar infectada por un virus o por los cambios que siempre acompañan a cualquier célula que desarrolle el fenotipo tumoral (antígenos proteicos de membrana, etc.). Las células con capacidad citotóxica del sistema inmune pueden eliminar las células cancerosas y suprimir el tumor. De manera que el desarrollo de un tumor en una persona con un sistema inmunitario sano puede considerarse como un fenotipo tumoral particular que ha sido capaz de evadir la vigilancia inmunitaria por ser pobremente inmunogénico, ya sea por carecer de antígenos adecuados o por estar localizada la masa del tumor primario en un territorio del organismo de escasa inmunogenicidad. Una estrategia adecuada, válida para muchos tipos de cánceres, es estimular el sistema inmune con antígenos tumorales administrados en lugares adecuados (territorios del organismo con gran cantidad de células defensivas presentadoras de antígenos, por ejemplo por vía subdérmica) para dirigir la actividad inmunitaria a la destrucción de ese tipo de tumor (Simon J. Hall et al 2001). Por otro lado, se puede suprimir la sobreexpresión de oncogenes mediante el bloqueo de la síntesis del producto proteico con ARN de interferencia o bien, en el caso de pérdida de función (genes supresores de tumores), se puede proporcionar una copia correcta del gen mutante defectuoso mediante terapia génica. Por último, se puede eliminar las células cancerosas mediante la entrega de genes que causen una inducción de la apoptosis o que inhiban la angiogénesis suprimiendo el abastecimiento de oxígeno y nutrientes para el tumor, etc.

Así pues, resumiendo, los tratamientos basados en la transferencia de genes para tratamiento del cáncer se dirigen a:

- 1) Reemplazamiento de genes supresores de tumores defectuosos
- 2) Silenciamiento de oncogenes sobreexpresados
- 3) Entrega de componentes genéticos para terapias dirigidas a profármacos/genes suicidas

4) Modulación de la respuesta inmune antitumoral (inmunopotenciación genética)

La respuesta inmune

Los procesos de activación y selección clonal de las células del sistema inmunitario frente a un antígeno particular tienen lugar en los nódulos linfáticos, por mediación de las células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas y macrófagos. Las células T activadas destruirán las células portadoras de ese antígeno. Es **la respuesta celular**, que destruye las células tumorales a través de la inserción de perforinas en la membrana de la célula atacada y otros elementos que, por la vía apoptótica, van a provocar la muerte de las células reconocidas. Participan también en esta respuesta las células Natural Killer (NK) y los macrófagos.

La respuesta humoral a través de los linfocitos B incluye procesos como la citotoxicidad mediada por anticuerpos, la citotoxicidad mediada por el sistema de complemento y la opsonización. Además de los linfocitos T CD8+, diferentes poblaciones leucocitarias (fagocitos mononucleares, neutrófilos, eosinófilos y células NK) son capaces de inducir la muerte de las células diana, pero en muchos casos, la citotoxicidad mediada por estos requiere que la célula diana esté recubierta por Igs específicas: IgG, IgE o IgA. Para que un linfocito B se active totalmente, prolifere y se diferencie a célula plasmática productora de anticuerpos, requiere la colaboración de los linfocitos Th2.

La unión de los anticuerpos específicos a las células del tumor producirá la destrucción de las mismas mediada por el sistema del complemento, que en último término provoca la aparición de poros en la membrana que conducen a la lisis osmótica de la célula atacada. Simultáneamente el recubrimiento por anticuerpos de las células tumorales (opsonización) sirve de señal para que estas células sean fagocitadas por los macrófagos, procesarían los antígenos para presentarlos ulteriormente a otras células del sistema

inmune Simon J. Hall et al 2001; Brostoff, Male, Roitt 1997; Dranoff, G. 2001).

Sin embargo, las células tumorales escapan a estos sistemas de vigilancia del sistema inmune principalmente porque escapan al reconocimiento como algo extraño al organismo,, ya que son células propias y por lo tanto carecen en ocasiones de un perfil antigénico reconocible por el sistema inmune del paciente. Potenciar el reconocimiento y el rechazo a las células tumorales es uno de los frentes de la terapia génica contra el cáncer, y el terreno en el que hemos probado nuestro diseño de transportador de antígenos para inmunización, el lipopoliploje. El hecho de presentar los antígenos en un contexto adecuado puede hacer que el sistema inmunitario cambie la decisión de tolerarlos como propios (Botella R., Moret I. et al.2001). La estrategia a seguir consiste en nuestro caso, en introducir antígenos tumorales en forma de vacuna, acompañados de moléculas inmunoestimulantes (la citoquina GMCSF).

4.2 LA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA DE LA MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

El sistema inmune constituye la defensa natural contra el desarrollo de tumores y, de hecho, el cáncer se puede considerar bajo cierto punto de vista como un fallo en la función de vigilancia del sistema inmunitario sobre el desarrollo del fenotipo tumoral en las células del organismo. La búsqueda de estrategias terapéuticas basadas en la activación del sistema inmunitario contra los tumores es una de las más activas en el campo de la moderna investigación en terapia antitumoral. Su importancia se refleja en el dato de que un 48% (Kresina, TF 2001) de los protocolos de terapia génica del cáncer están basados en lo que llamamos inmunomodulación: el uso de nuestro propio sistema inmunitario para destruir las células cancerosas, activándolo de manera que potenciemos su acción frente a las células tumorales de un tumor que hasta el momento había escapado

de su acción. Una de las ventajas de esta estrategia terapéutica es su seguridad, ya que no presenta muchos de los problemas de toxicidad que muestran otros tratamientos. Potenciar nuestro sistema inmunitario frente al reconocimiento y rechazo de tumores, constituye pues la meta de este conjunto de estrategias de terapia génica.

En nuestros estudios hemos utilizado como activador del sistema inmune la citoquina GM-CSF. Las citoquinas son proteínas secretadas por las células inmunes que actúan como potentes mediadores de la respuesta inmune, produciendo la activación de funciones en las diferentes células implicadas, así como coordinando la acción entre todas ellas. Los fenómenos bioquímicos regulados por citoquinas son realmente complicados en sí mismos, ya que hay una enorme imbricación entre los procesos que cada citoquina desencadena. Además, una misma citoquina puede ejercer diferentes efectos sobre un mismo tipo celular, a veces muy diferentes, según sean las demás señales que están llegando a la célula. Asimismo una misma citoquina puede producir reacciones diferentes en cada tipo celular sobre el que actúa, y los procesos de regulación y vías de señalización mediados por citoquinas, interactuando unas sobre otras, son realmente complejos.

El uso de las citoquinas en las vacunas contra el cáncer es una de las primeras estrategias terapéuticas usadas en ensayos de inmunización contra esta enfermedad, y ya en los inicios se comprobó que los efectos antitumorales de las citoquinas eran mucho más efectivos si éstas eran secretadas por las propias células del entorno en lugar de aparecer tras ser introducidas por administración externa (Dranoff, G 2001). Es por ello que se han creado multitud de líneas de investigación que usan la terapia génica para entregar genes de citoquinas a las células del tumor u otras células accesorias, creándose así un ambiente alrededor de las células tumorales que podría facilitar su destrucción. Virtualmente todas las citoquinas estudiadas, en particular el GM-CSF, han mostrado un efecto en el crecimiento tumoral y en la

supervivencia en algunos modelos animales (Brostoff, Male, Roitt. 1997; Schneeberger A, Luhrs P, Kutil R et al. 2003; Soiffer R, Lynch T, Mihm M et al. 1998). Este efecto ha sido atribuido a la activación y expansión de células inmunes antitumorales presentes en el tumor y alrededores.

En la tabla 1 se muestran las citoquinas utilizada en ensayos clínicos. De ellas, una de las más estudiadas, y que ocupa el papel central en esta tesis, es el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, GM-CSF. Desde los inicios de los estudios con citoquinas en el campo del cáncer (Soiffer R, Lynch T, Mihm M et al. 1998) hasta los más recientes ensayos clínicos en humanos (Schreiber S, Kampgen E, Wagner E et al 1999; Abdel-Wahab Z, Weltz C, Hester D et al 1997; Berinstein NL 2007), el GM-CSF ha estado presente, mostrando todo un abanico de respuestas en diversos tipos de cáncer. La proteína GM-CSF se secreta junto con otros factores por las células T y macrófagos activados. La síntesis de GM-CSF por otros tipos celulares, como por ejemplo células endoteliales y fibroblastos, es inducida por factores como el TNF-alfa, TNF-beta, IL-1, IL-2 y IFN. Esta citoquina estimula la activación de células presentadoras de antígenos (APC), y por ello podría esperarse una expansión indirecta de las células T citotóxicas. GM-CSF es también un fuerte quimioatrayente de neutrófilos. Aumenta la actividad microbicida, el metabolismo oxidativo y la actividad fagocitaria de macrófagos y neutrófilos, aumentando también su actividad citotóxica. Además, estimula la proliferación y diferenciación de neutrófilos, eosinófilos, y líneas monocíticas, y también estimula la expresión de determinadas proteínas de adhesión celular, que pueden ser las responsables de la acumulación de los granulocitos en los lugares de inflamación. Estimula la liberación de los metabolitos del ácido araquidónico, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y aumenta la capacidad de presentación y reconocimiento de antígenos.

Citoquina	Actividad Biológica	Tumor
IL-2	Factor de crecimiento de células T, expande linfocitos Tc	Cerebro, mama, colon, pulmón, melanoma, ovario
IL-4	Factor de crecimiento de células T y B	Cerebro y estadios avanzados
IL-7	Inhibe respuesta Tc	Colon, linfoma, melanoma, renal
IL-12	Activa respuesta Th1, activa Tc	Melanoma y estadios avanzados
IFN- γ	Activata CD8+, activa macrófagos. Activa expresión MHC I y II	Melanoma, prostata, cerebro
GM-CSF	Activa Cél. Dendríticas y Macrófagos	Renal, prostata, melanoma, mama, ovario, pulmón, páncreas

Tabla 1. Citoquinas, Moléculas Accesorias, y Factores de Crecimiento que se han empleado en diversos ensayos clínicos en cancer.

Las células dendríticas son las APCs profesionales, las más potentes. Cuando el antígeno es introducido en el paciente, las APC lo incorporan, procesan y presentan a los linfocitos T en el contexto de las moléculas MHC de clase I (a los Tc, CD8⁺) y clase II (a los Th, CD4⁺). La unión del complejo péptido procesado-MHC con el receptor del linfocito T correspondiente constituye la “Señal I”. La siguiente unión de las moléculas B7.1 y B7.2 de la célula dendrítica a la molécula CD28 de las células T constituye la “Señal II”, que resulta en la transformación y activación de las células T. La presencia de la señal I sin la señal II resulta en tolerancia (no activación). Las llamadas células dendríticas “inmaduras” poseen bajos niveles de expresión de moléculas coestimuladoras pero son altamente fagocíticas e ideales por

ello para la carga del antígeno. En presencia de una señal de peligro, procedente de moléculas presentes en el medio debidas a muerte o daño celular o una invasión por un organismo patógeno extraño, las células dendríticas maduran, perdiendo su capacidad de toma de antígeno pero ganando altos niveles de expresión de las moléculas estimuladoras, que son ideales para iniciar una respuesta inmune. El carácter de la consiguiente respuesta estará altamente determinado por el perfil de moléculas de superficie y secreción de citoquinas de la célula dendrítica madura, lo que constituye la “Señal III”, que puede ser polarizada hacia la activación de Th1 (favoreciendo inmunidad celular) o hacia Th2 (favoreciendo la humoral) (Terando AM. et al 2007).

Ahora bien, las células neoplásicas por sí mismas carecen de las moléculas coestimuladoras y conocemos que la entrega de la señal MHC sin la coestimulación puede anergizar las células T (efecto negativo) y representar un mecanismo por el cual las células tumorales evadan el ataque inmunitario por tolerancia. Es por esto que una de las aproximaciones para superar esta falta de moléculas coestimuladoras haya sido incorporar a nuestros transportadores genes de inmunocitoquinas como el GM-CSF, de manera que las propias células transfectadas al incorporar el transportador (lipopolipéptido) las produzcan (Chong H, Todryk S et al. 1998; - Kim k-Y, Kang M-A, Nam M-J. 2001; Mukherjee S, Nelson D, et al. 2001; Parney IF, Farr-Jones MA et al. 2002). El melanoma es un tipo de tumor del que existen numerosos informes de casos de remisión espontánea del tumor con base inmunológica, lo que significa que una respuesta inmune adecuada puede ser capaz de eliminarlo. Ello ha propiciado que se hayan desarrollado múltiples investigaciones para aumentar esta característica mediante vacunación, a través de numerosas estrategias de vacunación, abarcando prácticamente todas las aproximaciones empleadas en terapia génica por inmunomodulación y todos los principales tipos de vectores (Terando AM. et al 2007).

Las vacunas contra el cáncer han sido una promesa durante muchos años, que aun a día de hoy no se ha visto totalmente

cumplida. En la actualidad existen más de 800 ensayos clínicos en curso o ya realizados dedicados al melanoma (www.clinicaltrials.gov), sin embargo los resultados obtenidos en humanos no han resultado tan espectaculares como los ensayos realizados en modelo animal en los estudios preclínicos. Una vez que el tumor está establecido, son muchos los factores que le procuran crecimiento y evasión del rechazo inmune y por ello cada vez queda más clara la idea de que el ataque antitumoral, al melanoma en particular, pero a todos los cánceres en general, debe ser en múltiples frentes, en lo que algunos autores han denominado “inmunoterapia multimodal”. Existe pues una necesidad de ensayar nuevas vías terapéuticas que pudieran conducir a una terapia efectiva cuando se da el salto desde los estudios preclínicos a los ensayos clínicos en humanos. En nuestro trabajo, hemos utilizado el nuevo vehículo desarrollado, el lipopoliplojeo, para probar con él una combinación de tres de las aproximaciones terapéuticas más interesantes en terapia antitumoral: la vacunación con antígenos, la inmunomodulación con citoquinas y la estrategia llamada “vacunas de ADN recombinante” (aunque en nuestro caso hay que puntualizar que no se trata de una vacuna de ADN ya que no codifica para un antígeno proteico tumoral, sino que lo utilizamos para producir la propia citoquina inmunoestimulante). Hemos probado el lipopoliplojeo en un modelo de antígeno único (GD3) o con extractos de proteínas de membrana de células tumorales, solo o acompañado de la citoquina coadyuvante GM-CSF, en modelo murino de melanoma utilizando células tumorales de melanoma de la línea B16 o B2CF167H. Contribuyendo con nuevos vehículos para este tipo de vacunas, así como a la mejora de los procedimientos en inmunización, que pueden optimizar en un futuro de forma significativa los ensayos lográndose un aumento en la supervivencia y/o la erradicación del tumor.

5. Vectores para vacunas basadas en antígeno vs. vectores para terapia génica.

Tanto los vectores para terapia génica no viral como los vectores dirigidos a estimular específicamente el sistema inmune contra un determinado antígeno o antígenos comparten una serie de características comunes. En ambos casos, el vector tiene como propósito el introducir un material foráneo (el ADN terapéutico o el antígeno) en el interior de la célula a la que va dirigida. En terapia génica, este material es siempre un ácido nucleico, pero en el caso de las vacunas puede ser introducido el antígeno como tal, por ejemplo un antígeno proteico; o bien la secuencia de ADN que codifica para ese antígeno. Las moléculas que se usan para construir los vectores son similares: tanto en terapia génica como en inmunización, se han utilizado tanto vectores lipídicos (liposomas) como poliméricos. Pero, a diferencia de los vectores para vacunas, existe una limitación esencial en el desarrollo de vectores no virales para terapia génica, que es el tamaño del vector resultante. Dado que estos vectores se inyectan en el torrente sanguíneo del paciente para acceder desde la sangre al tejido o territorio particular donde se encuentra la célula a la que van destinados, el tamaño del vector no debe superar el tamaño del poro del capilar sanguíneo, para salir al tejido y alcanzar la célula diana a la que van dirigidos. Este es, en la práctica, un problema importante a resolver en el desarrollo de los vectores no virales, del que depende primariamente el éxito en la transfección. Y es un problema recurrente en la tecnología de vectores no virales. Por ejemplo, los vectores poliméricos, como el PEI, típicamente generan agregados múltiples de moléculas de ADN plasmídico que son excesivamente grandes para superar la barrera capilar.

Los vectores liposomales pueden asociar el plásmido externamente; o bien encapsularlo en el interior del liposoma. En el primer caso sucede de manera similar a los vectores poliméricos: los complejos resultantes están formados por múltiples liposomas y moléculas de plásmido agregadas que resultan en complejos de un tamaño excesivo. En el segundo, los liposomas de pequeño tamaño (de tipo SUV, de 40-80 nm) encapsulan el ADN con una muy baja eficiencia, con lo que no son capaces de transportar suficiente material génico y

no son válidos para un uso en terapéutica; en cambio otros tipos de liposomas que sí encapsulan con alto rendimiento (MLV-FT o DRV, por ejemplo, con rango de tamaños típicamente entre 200-400 nm) son por el contrario demasiado grandes para ser usados como vectores para terapia génica no viral.

Los vectores destinados a vacunas no tienen esta limitación, ya que normalmente se introducen en el organismo por vía subcutánea, donde son alcanzados por los macrófagos titulares y otras células presentadores de antígenos para que se verifique la ulterior activación del sistema inmune. En este tipo de *vectores* (los llamamos así, aunque estrictamente hablando el término “vector” se aplica más bien a los complejos de ADN con otras moléculas destinados a la transfección celular) son aspectos importantes la capacidad para transportar una suficiente dosis de antígenos, y que todos los antígenos y coadyuvantes sean transportados simultáneamente a la misma célula que incorpora el complejo.

En el presente trabajo, se han desarrollado dos tipos de vectores que presentan óptimas propiedades en el campo de la terapia génica y la inmunización antitumoral, respectivamente:

- el vector RCC10, para terapia génica, que es capaz de generar una partícula muy pequeña, el mínimo teórico posible (resultado de la compactación de una única molécula de plásmido); y que constituye un “core” o núcleo para el futuro desarrollo de un vector más completo y con estructura y tamaño semejante al de un virus
- El LPP o lipopolipéptido, destinado a vacunas, que permite el transporte simultáneo de diferentes conjuntamente con un plásmido portador de un gen de una citoquina inmunoestimulante, para reforzar la respuesta inmune generada por el complejo.

5.1 Desarrollo de un vector de transferencia génica basado en Liposomas y Polímeros catiónicos: el lipopoliplexo

El objetivo inicial propuesto en nuestro laboratorio era desarrollar una vacuna antígeno-específica frente al melanoma, que permitiera optimizar la respuesta antitumoral alcanzada con las vacunas clásicas. Para ello, nos proponíamos preparar una vacuna basada en la entrega simultánea de un antígeno específico (gangliósido GD3) y genes de citocinas tales como las que codifican para GM-CSF o IL-4. El desarrollo de la vacuna estaría centrado en la preparación de liposomas multilamelares (de tipo FT-MLV o DRV) conteniendo el gangliósido GD3; y un polímero catiónico (PEI) previamente complejado con el plásmido de interés, formando un vector donde, presumiblemente, el antígeno (gangliósido GD3) se localizaría en la región lipídica (incorporado en la bicapa lipídica liposomal) mientras que en la región hidrófila, (núcleo del liposomas) se localizaría el poliplexo plásmido/PEI donde se situaría la construcción génica de interés.

Los poliplexos de ADN/PEI, según se refleja en la literatura y en la propia experiencia de trabajo en nuestro laboratorio, son poblaciones de partículas muy heterogéneas en tamaño, en un rango del orden de micras, y que exceden las dimensiones necesarias para lograr su encapsulación en liposomas de tipo FT-MLV o DRV (cuyos diámetros se encuentran típicamente en el rango de entre 200 a 1000 nm). Sin embargo, un trabajo relativamente reciente (Goula, D., C. Benoist, et al. 1998) proveía un método nuevo de preparación de poliplexos ADN/PEI, que proporcionaba complejos lo suficientemente pequeños (30-100 nm) como para que *a priori*, fuera factible conseguir una encapsulación eficiente con los métodos de preparación de liposomas tradicionales.

El aspecto esencial del protocolo de Goula consistía en formar el poliplexo en un medio libre de iones, es decir, en agua pura o bien en una solución glucosada al 5% (para proporcionar a la solución resultante una mejor compatibilidad con los tejidos biológicos, ya que el agua pura

resultaría irritante). En contraste con los protocolos habituales de preparación de poliplejos, que utilizan medios tamponados (típicamente PBS o HEPES). Y en los que se produce la complejación de múltiples unidades de plásmido y moléculas de PEI, obteniéndose poblaciones muy heterogéneas de complejos grandes, con tendencia a agregar con el tiempo. Por el contrario, en un medio libre de iones, el PEI una población estable y bastante homogénea de poliplejos, en el rango de nanómetros. Aunque en los artículos originales los autores utilizaban un PEI lineal de 22 kDa, comprobamos en nuestro laboratorio mediante microscopía electrónica que se obtenían resultados similares utilizando PEI ramificado de 25 kDa.

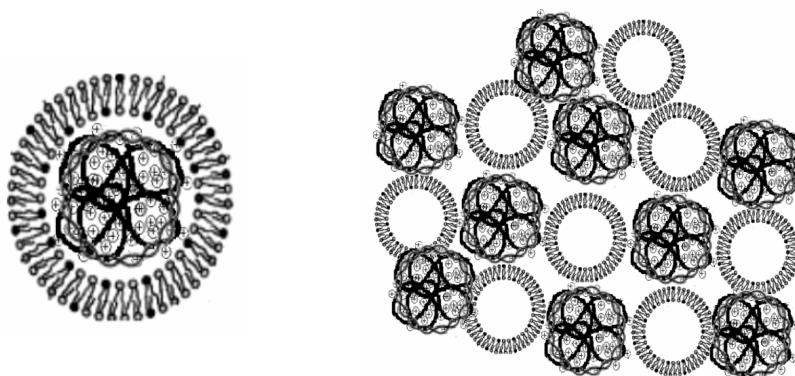


Figura 1. Izquierda: esquema del diseño original del vector de transferencia génica para vacunas contra el melanoma con el gangliósido GD3. Un complejo pequeño ADN/PEI (poliplejo) se situaría en el interior del núcleo del liposoma, mientras que el antígeno lipídico GD3 estaría localizado en la membrana liposomal. **Derecha:** poliplejos plásmido/PEI y liposomas asociados, formando un complejo.

El plan original para la preparación del vector consistía en formar poliplejos de pequeño tamaño en medio glucosado, de acuerdo al protocolo de Goula, y seguidamente encapsularlos según los métodos habituales en liposomas de tamaño medio o grande (FT-MLV o DRV), incorporando el gangliósido

GD3 en la mezcla de lípidos utilizada para formar el liposoma.

La cuantificación de la cantidad de plásmido encapsulado en los liposomas mediante fluorescencia permitiría evaluar el rendimiento de encapsulación. Mediante variaciones en la formulación lipídica de los liposomas, la concentración de los reactivos, el número de ciclos de congelación-descongelación, y otros factores., se conseguiría una optimización del protocolo de preparación del vector que rindiera una aceptable eficiencia de encapsulación del sistema para su uso como vacuna.

Sin embargo, los múltiples problemas experimentales encontrados durante las experiencias iniciales, nos hicieron desistir de la construcción del vector, en su diseño original. En su lugar, el desarrollo del proyecto condujo a la construcción de un nuevo diseño de vector, que asociaba externamente múltiples unidades de poliplejos y liposomas, cuyas características resultaban más interesantes que las del propio diseño original (ver figura 1).

5.2 Desarrollo de un vector sintético semejante a virus para terapia génica no viral

La terapia génica se apoya en el uso de vectores capaces de la transferencia de ácidos nucleicos portadores de genes terapéuticos a células receptoras del paciente.

Los virus son vectores de transferencia génica sumamente eficaces, pero su uso terapéutico conlleva en ocasiones problemas de seguridad. Otro problema asociado al uso de virus es la respuesta inmunológica que generan en el organismo hospedador, que puede dificultar o impedir la administración de las sucesivas dosis del vector viral (R.C. Mulligan, 1993) Por el contrario, los vectores no virales, basados en liposomas o cationes poliméricos, no tienen estos inconvenientes, aunque sí sus problemas específicos (pueden producir toxicidad); pero en general se considera que pueden constituir una alternativa más segura respecto al uso de virus.

Sin embargo, la tecnología de vectores no virales es de desarrollo reciente, y estos sistemas presentan hoy día importantes limitaciones con respecto a los virales. Fundamentalmente, una baja eficacia de transfección y dificultades en el escape a los tejidos desde el torrente sanguíneo por el excesivo tamaño del vector resultante (Nishikawa, M. and L. Huang 2001).

Uno de los problemas más importantes a resolver es el tamaño del complejo resultante. Dado que el vector ha de ser capaz de atravesar el endotelio del capilar a través de sus poros para alcanzar el órgano o tejido diana, su tamaño no puede exceder, en el mejor de los casos, de unos 100 nm, para que se produzca la salida desde el capilar. Sin embargo, la mayoría de vectores no virales disponibles, tanto lipídicos como poliméricos, producen grandes agregados ADN/vector muy heterogéneos en composición y tamaño, que asocian múltiples unidades de plásmido. Resultando partículas excesivamente grandes como para que se verifique el paso a los tejidos en la administración IV del vector (Navarro, J., N. Oudrhiri, et al. 1998).

En un avance relativamente reciente, el laboratorio de química genética de la universidad de la universidad Louis Pasteur (Dauty, E., J.-P. Behr, et al.; 2002), fue capaz de desarrollar un nuevo tipo de agente de transfección no viral capaz de inducir el colapso monomolecular de una única molécula de plásmido, resultando complejos muy pequeños, típicamente en el rango de 30-40 nm. Las partículas resultantes, esféricas y constituidas por un plásmido único, poseen una estructura y tamaño que recuerda al de los virus, y su pequeño diámetro las hace compatibles con el paso a través de los capilares sanguíneos tras su aplicación por vía IV. Estos nuevos agentes están constituidos por una molécula hidrocarbonada lineal y una *cabeza* catiónica polar. La naturaleza polar de la *cabeza* unida a una *cola* hidrofóbica concurrentes en la misma molécula confiere características de tensioactivos a estos agentes. En la *cabeza* polar se sitúan dos funciones químicas: un grupo químico tiol, que proporciona

la posibilidad de formar puentes de cisteína entre dos moléculas del agente; y una función amina (o similar) que, a pH adecuado, proporciona una carga positiva que va permitir que el vector interactúe con los grupos fosfato cargados negativamente del ADN plasmídico.

La propiedad esencial de este tipo de vectores es que, en forma de monómeros individuales, presentan propiedades de solubilidad de tensioactivos; sin embargo cuando se unen dos moléculas de vector formando un dímero, las propiedades de solubilidad cambian radicalmente, pasando a tener el dímero características de solubilidad de lípidos. Este cambio en la solubilidad del vector conduce a la estabilización de la partícula ADN-vector (Blessing, T., J. S. Remy, et al. 1998).

Una vez constituido el complejo plásmido-vector, la formación espontánea de enlaces disulfuro entre las funciones tiol de las moléculas del vector conduce a la estabilización de la partícula. Estas partículas “pseudovirales” presentan excelentes propiedades de distribución y escape del torrente sanguíneo tras su administración intravenosa y son la promesa de una nueva generación de vectores no virales similares a virus en cuanto a la facilidad de diseminación y distribución por los tejidos. Una propiedad inesperada, relacionado con el pequeño tamaño de estas partículas, es que los complejos tienen una movilidad electroforética superior a la del plásmido libre. Siendo el primer caso descrito en la literatura científica, ya que anteriormente se aceptaba que la unión de moléculas al ADN producía siempre un retraso en su movilidad respecto a la del ADN desnudo (Dauty, E., J. S. Remy, et al. 2001).

Resulta un tanto sorprendente la carencia de trabajos publicados en la bibliografía que utilicen moléculas análogas o pertenecientes a esta nueva familia de agentes de transfección. Apenas existen publicaciones de otros laboratorios que reproduzcan los resultados del grupo de Behr y colaboradores, pese al gran interés en terapia génica no viral del mecanismo de compactación monomolecular

ofrecido por estos agentes. Sin embargo, los escasos trabajos dedicados a probar análogos mecanístico-estructurales de estos compuestos reproducen los resultados del grupo de Behr, en particular el novedoso aspecto del pequeño tamaño del complejo que permite una migración electroforética superior a la del plásmido libre (Fabio, K., C. Di Giorgio, et al. 2005).

El objetivo del presente trabajo consistía en formar un complejo de ADN monomolecular, mediante un vector de diseño propio perteneciente a esta familia de moléculas. Nuestro diseño constaría de una cabeza polar Arginina-Cisteína unida a una cola hidrocarbonada de 12 o 10 carbonos (RCC12 y RCC10, respectivamente). Más adelante se sintetizó además un nuevo agente con una cabeza polar Histidina-Cisteína y una cola de 10 carbonos. Estos agentes se obtuvieron mediante síntesis química total, por encargo a un laboratorio comercial especializado en síntesis de péptidos (Diverdrugs SA). Químicamente, el agente RCC10 o RCC12 está constituido por un dipéptido Cisteína-Arginina unido a una molécula lineal de decano o dodecano respectivamente. El aminoácido Arginina se ha seleccionado porque posee un grupo guanidinio que, cuando se encuentra protonado, es conocido que se une fuertemente al ADN por sus grupos fosfato negativamente cargados, mediante enlace iónico (G Stein, J. Stein, L Kleinsmith, 1977). El residuo de Cisteína proporciona la función tiol, necesaria para la formación de los puentes disulfuro entre dos moléculas contiguas. Estos agentes como tales, es decir, en forma monomérica, tienen propiedades de solubilidad de tensioactivos; pero en forma dimerizada los dímeros, mucho menos hidrosolubles, se comportan como lípidos. Por lo tanto, cuando se encuentren en condiciones adecuadas que favorecen la formación de puentes disulfuro (pH básico y/o presencia de oxígeno) se produce la reacción entre moléculas del agente próximas y se forma el dímero, disminuyendo su hidrosolubilidad y pasando a tener propiedades de solubilidad de lípidos. Otra ventaja de la elección de la cabeza polar como un dipéptido Arg-Cys es que, presumiblemente, la molécula o sus

productos de degradación metabólica carecerán de toxicidad, frente a cualquier otro diseño que emplee una estructura xenobiótica.

Para la preparación del complejo plásmido-vector, el agente RCC10 es inyectado lentamente desde una solución stock concentrada 6mM en una solución de plásmido 0,02 µg de ADN/µl en tampón HEPES 15 mM pH 7.3 saturado con oxígeno y bajo constante agitación. En estas condiciones, el grupo guanidinio de la Arg se encuentra protonado, y está favorecida la oxidación del grupo tiol, por lo que se verifica la unión al ADN y formación de los puentes disulfuro entre los RCC10 adyacentes unidos al plásmido.

Mecanismo de formación del vector

Los vectores habituales utilizados en terapia génica no viral, cuando se utilizan para condensar moléculas pequeñas de ácidos nucleicos, ya sean oligonucleótidos o plásmidos, no rinden partículas pequeñas, sino que por el contrario producen grandes agregados (microscópicamente hablando), poblaciones muy heterogéneas en tamaño y que asocian múltiples unidades de plásmido u oligonucleótidos, resultando complejos excesivamente grandes para su uso en terapia génica *in vivo* (si bien estos complejos son eficientes transfectando células en cultivo). La limitación viene dada por el excesivo tamaño de la mayoría de los complejos de la población como para asegurar una buena distribución y escape del torrente sanguíneo tras su administración intravenosa, que impide el acceso eficiente a la célula diana a la que van dirigidos. Este problema se produce tanto en los vectores poliméricos como en los lípidos catiónicos que se emplean en la actualidad para transferencia génica.

Por el contrario, es conocido el hecho de que los tensioactivos catiónicos son capaces de producir la condensación del ADN en partículas pequeñas, que pueden estar constituidas por una única molécula de ácido nucleico (Behr, JP 1986). Sin embargo, estos complejos son

inestables, ya que se trata de un equilibrio dinámico en el que continuamente están intercambiándose moléculas unidas al ADN con otras libres en solución.

Como resultado, al entrar en contacto estos complejos con el plasma sanguíneo, rápidamente son desestructurados al diluirse el vector y el ADN es descompactado y liberado; por lo que los tensioactivos catiónicos no sirven como vectores de transferencia de ácido nucleico.

El mecanismo propuesto para la formación del vector tiene lugar en dos etapas. En la primera, las moléculas individuales del RCC10 cargadas positivamente interactúan con los grupos fosfato cargados negativamente del ADN en un proceso reversible pero desplazado hacia la formación del condensado ADN-vector.

La neutralización de las cargas negativas del ADN por los grupos amino de la Arginina del vector RCC10 posibilita la compactación del plásmido inducida por la formación de dominios “pseudomicelares” entre las colas hidrofóbicas del vector unido, que tienden a interactuar y a agruparse entre sí para disminuir el contacto con el agua (fuerzas de Van der Waals y “efecto hidrofóbico”).

Como consecuencia de la desaparición de la repulsión entre los grupos fosfatos negativamente cargados y de la agrupación de las colas hidrocarbonadas de las moléculas del RCC10 unido tiene lugar un colapso o condensación de la molécula de ADN, generándose una partícula de pequeño tamaño (Blessing, T., J. S. Remy, et al. 1998).

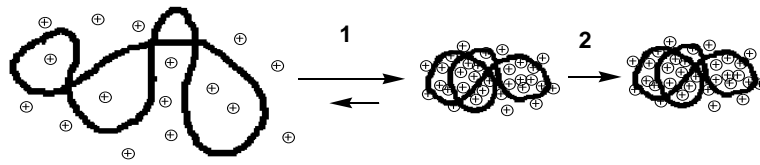


Figura 2. Etapas en la formación del complejo monomolecular plásmido-RCC10. En la etapa 1, el monómero RCC10 (representado por los círculos pequeños con carga positiva) se une al ADN (interacción ión-ión) en un proceso instantáneo y reversible que induce el colapso de la molécula de ADN. En la etapa 2, los grupos tiol de los residuos de cisteína que han quedado próximos entre sí pueden reaccionar y oxidarse produciéndose la dimerización de las moléculas de vector contiguas, por la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína. La partícula es “fijada” por la oxidación irreversible del vector a la forma dimerica $(RCC10)_2$ insoluble.

Este proceso se verifica en presencia del oxígeno del aire y es irreversible y más lento que el anterior. A consecuencia de la dimerización, las propiedades de solubilidad del RCC10 cambian: ya no tiene sino que disminuye grandemente su hidrosolubilidad, pasando a tener características de lípido. Como resultado, la partícula monomolecular generada es estable, pues el dímero $(RCC10)_2$ es hidrofóbico y no tiende a salir del complejo, como ocurría con el monómero.

Los tensioactivos en solución acuosa tienden a reorganizarse espontáneamente en micelas cuando superan una cierta concentración, la cmc. A concentraciones inferiores a la cmc, permanecen sin embargo como moléculas individuales en solución. Los vectores de la familia del RCCn deben encontrarse como moléculas individuales en solución, para interactuar adecuadamente con el ADN y constituir el vector. Si se encuentran a una concentración superior a su cmc, las moléculas de RCC10 contiguas en la micela

reaccionarán entre sí, y lo que obtendremos será un agregado de micelas y plásmidos, en lugar del colapso monomolecular del ADN buscado. Sin embargo, la concentración de trabajo del agente está definida por la concentración de trabajo del plásmido, desde que el vector debe estar en suficiente cantidad como para neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN. Y las concentraciones de los plásmidos no pueden ser muy bajas, ya que siempre es necesaria una cierta dosis suficiente de plásmido para cualquier experiencia de transferencia génica. Por lo tanto, para que un agente del tipo del RCC10 sea utilizable, su cmc debe ser lo suficientemente alta como para que no se formen micelas a las concentraciones de trabajo a las que es usado. La determinación de la cmc del agente RCC10 fue un aspecto clave del desarrollo del vector en el presente trabajo, desde que una cmc inferior a la concentración de uso del vector habría invalidado cualquier experiencia dirigida al colapso monomolecular del plásmido buscado.

5.3 Terapia génica viral y terapia génica no viral

El genoma viral ha aprendido a entrar muy eficientemente en las células, alcanzando el núcleo celular y expresando sus genes, en un proceso optimizado muy eficientemente a través de la selección natural operando durante miles de años de evolución. Los virus constituyen hoy por hoy los agentes más efectivos de los que disponemos para realizar la transfección celular, entregando el material genético terapéutico que nos interesa introducir en las células y expresándolo a niveles adecuados. El tropismo natural de ciertos virus hacia tejidos u órganos determinados ha facilitado mucho la entrega dirigida de genes a células diana, como sucede con los adenovirus para el hígado y los herpesvirus para el sistema nervioso. Sin embargo, la manipulación del genoma de virus en el laboratorio para mantener bajo control el virus modificado genéticamente para su uso en transferencia de genes terapéuticos no siempre resulta fácil y además las reacciones

adversas que en algún caso se han producido en los tratamientos al paciente (reacciones de hipersensibilidad de tipo inflamatorio, etc.) pueden llegar a ser peligrosas e incluso letales. Entre los potenciales efectos indeseados de los virus destaca la mutagénesis u oncogénesis insercional, que puede llegar a activar oncogenes produciendo el fenotipo tumoral (Li Z. et al. 2002). Recientemente, en un ensayo clínico realizado en el año 2003 por el grupo de Alain Fischer y Marina Cavazzana-Calvo en el que hasta el momento había sido el mayor éxito terapéutico de la terapia génica, el tratamiento reconstitutivo de la inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X causado por el déficit en una enzima mutada (SCID-X1), concluyó con un efecto adverso grave producido por el virus, la leucemia mieloide aguda, en alguno de los pacientes participantes (Cavazzana-Calvo M. et al. 2002).

Los procesos de integración de algunos de los virus usados en terapia génica todavía no están perfectamente controlados, y la activación de oncogenes por mutación insercional constituye todavía un riesgo cuando son utilizados algunos vectores virales, aunque se están realizando grandes esfuerzos al respecto (Kustikova OS. et al. 2007; Baum C 2007; Thornhill SI. et al. 2008). Estos hallazgos también han llevado a diferentes grupos a optar por otra familia de virus, los Lentivirus, como vectores más seguros, ya que parecen no tener preferencia por los sitios de integración de los retrovirus (Almarza E. et al. 2007; Cattoglio C. et al 2007) entre otras ventajas. Sin embargo, en la actualidad funcionan o se han llevado a cabo docenas de ensayos clínicos en terapia génica mediada por virus y de entre los cientos de pacientes intervinientes sólo se han encontrado los efectos adversos graves en unos pocos casos como los anteriormente mencionados, además de que se ha logrado un beneficio clínico que supera ampliamente los efectos adversos que eventualmente se han mostrado en estos ensayos (www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical). Hoy por hoy, los agentes de transfección con eficacia suficiente como para producir niveles terapéuticos de las proteínas codificadas por los genes que se utilizan para tratamiento de enfermedades

con base génica son los virus. Sin embargo, la terapia génica no viral ha experimentado un enorme desarrollo en los últimos años, consiguiéndose ya con ciertos sistemas niveles de transfección que están a niveles de los obtenidos mediante virus (Alino, Crespo et al. 2003).

En nuestro trabajo hemos elegido la opción de los métodos no virales, que aunque en general no logran a día de hoy las grandes eficacias de transfección y persistencia en la expresión de los virus, sí ofrecen por el contrario la ventaja de su facilidad de preparación y una mayor seguridad, pues carecen de los graves efectos adversos que en ocasiones pueden darse con el uso de los virus como agentes de transfección, aunque los vectores no virales pueden mostrar una cierta toxicidad. En ciertos terrenos, además, la obtención de niveles de expresión del trasgen no demasiado elevados y transitorios puede ser una ventaja, como por ejemplo en el caso de los ensayos de inmunización antitumoral, en los que la adecuada estimulación se logra con niveles no altos y no mantenidos en el tiempo de la expresión de la citoquina coadyuvante (Herrero, Botella et al 2006).

6. OBJETIVOS

La terapia génica no viral se apoya y fundamenta en el desarrollo de vectores adecuados para la transferencia génica con fines terapéuticos. El diseño de vectores eficientes y seguros, constituye el frente de avance y el principal motor de su desarrollo. Las estrategias terapéuticas actuales relacionadas con la transferencia de genes a células son amplias, e incluyen campos de desarrollo reciente como las vacunas de ADN recombinante y otros, en los que se utiliza la transferencia de material genético con un objetivo terapéutico.

En el presente trabajo el objetivo general es el desarrollo de dos tipos de vectores para transferencia génica no viral, cuyas

características y campo de aplicación son fundamentalmente distintos:

1. El vector RCC10. Es una construcción dirigida a la generación de una partícula de ADN de muy pequeño tamaño, del orden de nanómetros, lo cual es requisito fundamental para un uso mediante administración sistémica en transferencia génica, y una de las limitaciones clásicas y más difíciles de solventar en el diseño de vectores para terapia génica no viral. La generación de partículas de tamaño inferior al límite de paso de la “barrera capilar”, de unos 100 nm en el mejor de los casos, es uno de los aspectos clave del diseño de estos vectores.
2. El vector LPP, que tiene otro campo de aplicación. Son partículas de mayor tamaño (del orden de micras) cuyo propósito en el ámbito de las vacunas génicas es transportar asociadas, pero en compartimentos independientes, un gran número de antígenos y genes para ser incorporadas por las células presentadoras de antígenos en estrategias terapéuticas de inmunización. Los problemas de este tipo de construcciones son totalmente diferentes, ya que no se administran por vía sistémica, y su relativo gran tamaño es una condición necesaria, desde que actúan como portadores de una gran cantidad de moléculas asociadas. Lo esencial en estos vectores es demostrar la asociación real de sus elementos constituyentes y caracterizar la formación cuantitativa del vector.

Los objetivos concretos de la presente tesis doctoral son:

- 1) Diseño de un vector para construir partículas monomoleculares de ADN plásmídico, cuyo pequeño tamaño posibilite el ulterior uso como núcleo de desarrollo para construir vectores nanométricos de estructura y tamaño semejante a virus, aptos para superar

la barrera capilar tras su administración por vía sistémica.

- a) se han utilizado tres agentes químicos diseñados en nuestro laboratorio (RCC12, RCC10 y HCC10) para el objetivo final de constituir una partícula monomolecular de ADN
 - b) se ha desarrollado un nuevo método de preparación a baja temperatura que permite la compactación monomolecular de un plásmido de ADN con los agentes RCC10 y HCC10
 - c) se han caracterizado los agentes y complejos resultantes mediante la medida de la cmc (concentración micelar crítica) y técnicas electroforéticas y fluorimétricas
- 2) Diseño y desarrollo de un vector (lipopoliplexo) para transferencia simultánea de genes y moléculas basado en la asociación de liposomas con poliplexos ADN:PEI
- a) demostración de la constitución del vector mediante métodos nuevos desarrollados en nuestro laboratorio
 - b) desarrollo de una nueva técnica para la caracterización cuantitativa de la asociación entre liposomas y poliplexos para constituir el complejo
 - c) comprobación *in vivo* de la entrega de genes y del material hidrosoluble encapsulado en los liposomas a células en modelo de ratón
- 3) Evaluación biológica de los vectores en modelos de vacunas genéticas
- a) estudio de la respuesta inmunológica humoral inducida por el lipopoliplexo portando un antígeno lipídico (GD3) y el gen de la citoquina GM-CSF, en modelo murino.
 - b) estudio de la respuesta antitumoral tras inmunización con el lipopoliplexo portando

antígenos lipídicos situados en la membrana liposomal

- c) estudio de la respuesta antitumoral tras inmunización con el lipopolipéptido portando antígenos tumorales proteicos hidrosolubles situados en el núcleo liposomal

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y Métodos

2.1. *Principales productos y métodos utilizados*

2.1.1. Cultivos celulares

Las células se cultivan en frascos de cultivo de 25, 75 o 175 cm² en medio de cultivo DMEM adicionado de antibióticos y suero bovino fetal inactivado por calor (10%), en volúmenes 3, 12 y 25 ml respectivamente. Se cultivan las células en estufa a 37°C, en atmósfera de carbógeno (5% de CO₂ y 95% de O₂). La manipulación de las células se realiza en cabinas biológicas de seguridad de tipo II (campanas de flujo laminar vertical Telstar AV-30/70). Las líneas celulares utilizadas crecen adheridas al fondo del frasco, por lo que cuando la confluencia de crecimiento llega al 100%, es necesario despegarlas y sembrarlas en nuevos frascos. Para despegarlas, se utiliza una solución de PBS-EDTA o de tripsina-EDTA (BioMedia) en PBS y a 37°C. Por inspección visual, a simple vista y/o mediante el microscopio óptico de inversión, se comprueba el despegue total de la población celular, y se recoge el contenido del frasco en un tubo con medio de cultivo. Se centrifugan las células (a fuerza de campo baja), durante 5 minutos, quedando las células en el fondo del tubo. Se procede a continuación al conteo de las células vivas, mediante la cámara cuentaglobulos. Para ello, se mezcla un pequeño volumen (50 µl) con un volumen idéntico de solución del colorante vital azul tripam (Tripam blue solution, Sigma-Aldrich), y se deposita una gota en cada una de las dos subcámaras de conteo, contándose seis campos al azar, calculándose a partir del recuento la concentración de las células en el resuspendido anterior.

2.1.2. Líneas celulares y animales de experimentación

Líneas celulares. La línea celular de melanoma murino B16 ha sido la utilizada en todos nuestros experimentos de vacunación. Estas células son singénicas con los animales que empleamos, ratones C57BL/6 (Harlan, España). Esta línea fue aislada en los laboratorios Jackson (Maine, EEUU) en 1954, a partir de un tumor cutáneo espontáneo. La administración in vivo da lugar a un crecimiento bastante rápido y agresivo, en forma de nódulos de consistencia blanda y color negro, con capacidad metastática, en especial sobre el pulmón.

La línea celular B16 son células adherentes, productoras de melanina, que son mantenidas en frascos de cultivo con medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma, España), suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor (30 min a 60°C; Biomedica, Francia), y adicionado de los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 g/ml). Son cultivadas en incubadores humidificados con 5% de CO₂ y a 37°C. Para despegar y recolectar las células de sus frascos, se utiliza el método enzimático (Tripsina-EDTA a 37°C) o el del quelante de calcio (PBS-EDTA a 4°C), recogiendo y separándose del medio las células desprendidas por centrifugación durante 5 minutos a baja fuerza de campo y desechado por decantación del medio líquido. Seguidamente se resuspenden en medio fresco y se separa una alícuota para cuantificar la concentración de células, mediante conteo en cámaras de recuento celular estándar, en presencia de azul tripán, para discriminar las células viables de las muertas.

Las células B16 se han usado en nuestros experimentos, bien como células enteras para inducir la formación de tumores en los animales de experimentación, o bien empleadas para obtener un extracto de sus antígenos (TMP). Para su conservación, las células son despegadas y recolectadas por

centrifugación para resuspenderlas en SBF con un 5% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Panreac, España), almacenándose alícuotas de 1 ml en criotubos para ser congeladas a -80 ó -150°C hasta su uso.

Además ellas mismas se han utilizado como fuente de tumor experimental, implantando un número determinado de células frescas, salvajes, recién despegadas de sus frascos, en su medio habitual de cultivo limpio, en la pata izquierda de los animales, mientras que las vacunas se inyectaban en sus patas derechas.

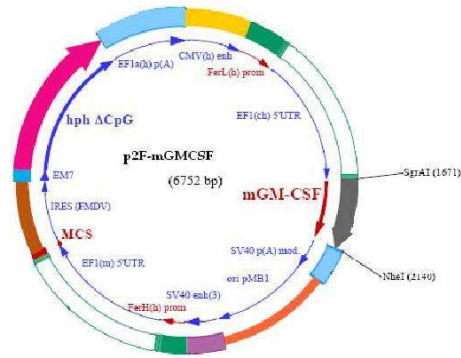
Para los experimentos de vacunación antitumoral con GD3, utilizamos una línea celular B2CF167H, derivada de células de la línea B16 modificadas genéticamente para expresar niveles altos del antígeno GD3 humano.

Animales de experimentación. Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 (*Harlan, España*), singénicos con las línea celular utilizada en los experimentos de vacunación. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de estabulación. En el caso de las experiencias de inmunización, los animales utilizados fueron hembras de entre 7-8 semanas de vida.

2.1.3. Plásmidos

p2F y p2F m-GM-CSF

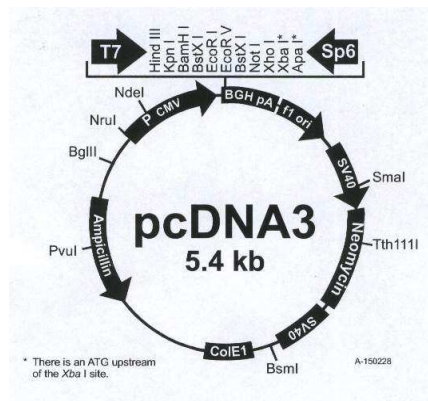
Los plásmidos p2F m-GM-CSF y p2F fueron obtenidos a partir del plásmido base pVITRO2 (Invivogen, France), conteniendo el gen murino de la citoquina GM-CSF o el plásmido "vacío" (sin inserto), respectivamente. Los plásmidos basados en pVITRO2 permiten la cotransfección simultánea de dos genes, pues contienen dos lugares de inserción con 2 promotores humanos, el de la cadena pesada de la ferritina (FerH) y el de la cadena ligera de la misma (FerL), combinados respectivamente con los intensificadores ("enhancers") de los virus SV40 (simian virus 40) y CMV



(citomegalovirus) y con un gen de resistencia al antibiótico higromicina, que permite tanto la selección de bacterias transformadas como de células eucariotas transfectadas. Para eliminar la regulación por hierro de los

promotores, sus regiones 5'UTRs han sido reemplazadas por las de los genes EF1α de ratón y chimpancé.

pcDNA3: El pcDNA3 es un vector de expresión comercial (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de 5474 pares de bases (pb). Posee una secuencia “enhancer” y un potente promotor



viral de citomegalovirus (CMV, citomegalovirus). Este promotor induce de forma constitutiva la expresión del gen de interés, presente en el mismo plasmido en células eucariotas. Presenta dos genes de resistencia a antibióticos (Neomicina y Ampicilina). Las

bacterias transformadas con este plasmido se cultivan en medio con Ampicilina, mientras que las células eucariotas se cultivan con Neomicina o con G418 (geneticina). A partir del pcADN3 se han obtenido los plásmidos p3C-EGFP y p3C-IL4, mediante la inserción de los respectivos genes en la región del clonación múltiple del plásmido.

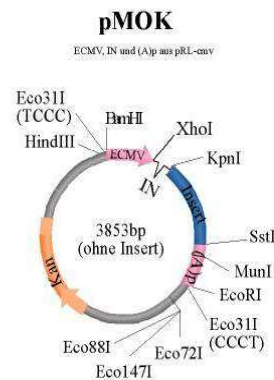
p3C-EGFP: presenta 6450 pb y deriva del pCADN3 y del pEGFP-N1. La clonación en el pcADN3 se obtiene tras digestión enzimática con Hind III y Afl II del plásmido pEGFP-N1 (plásmido que codifica una variante del tipo salvaje de la proteína verde fluorescente "*green fluorescent protein*", GFP y regulado por el promotor viral CMV). Proviene de un plásmido minimalista diseñado por el Dr. Witig de MOLOGEN,S.A. (Alemania).

p3C-IL4: sobre la base del pcDNA3, se ha insertado el gen que codifica para la IL-4 de ratón. La secuencia de la IL-4 murina es de 438 bp. Este plásmido se ha utilizado en algunas de las experiencias de caracterización del vector, pero no se ha hecho uso de la expresión del gen inserto de la interleukina IL-4, es decir, no se ha utilizado para experiencias *in vivo*.

pMOK y pMOK m-GM-CSF. Proceden del plásmido pRL con el promotor del citomegalovirus (pRL-CMV). A este promotor se le ha incluido un intrón que amplifica la serial (ECMV) dando lugar a un plásmido base de 3.853 kb. Otra diferencia con respecto al pCADN3 es que presenta el gen de resistencia a Kanamicina en lugar de los de Neomicina y Ampicilina.

pMOK m-GM-CSF contiene el gen murino de la citoquina GM-CSF controlado por el promotor del CMV y un gen de resistencia a la kanamicina. Las secuencias que presenta son:

- 1045-1839 resistencia a kanamicina,
- 2447-3244 promotor del citomegalovirus,
- 3251-3387 intrón,
- 3394-3819 GM-CSF de ratón,
- 3836-4037 sitio poliA.

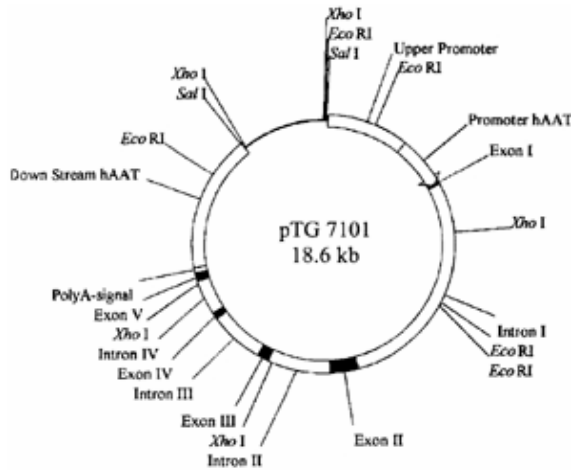


Estos plásmidos, generosamente proporcionados por el Dr. A. Koenig (Mologen, Alemania), se han utilizado en las experiencias *in vivo* del presente trabajo.

pTG7101. El plásmido pTG7101 (18.6 kb) conteniendo la secuencia completa del gen humano de la AAT se obtuvo por generosa donación del Dr P Meulien y el Dr JP Lecocq (Transgène

SA, Strasbourg, France). El pTG7101 contiene el fragmento genómico de 16.5 kb del gen hAAT gene, clonado en el sitio *SaI* del plásmido

Poly III–I. además contiene 1.8 kb de la secuencia genómica corriente arriba del promotor, el promotor y la secuencia completa del gen hAAT humano y 3.2 kb corriente abajo respecto del gen.



2.1.3.1. Obtención de plásmidos

Para la amplificación de los plásmidos se han utilizado bacterias *E. coli* pertenecientes a la cepa DH5a RecA" (Clontech Lab. Inc., USA). Las bacterias se transforman mediante choque térmico. Los plásmidos contienen, entre otros, genes de resistencia a uno o más antibióticos para los cuales es sensible esta cepa de *E. coli*. La selección de los clones bacterianos que han incorporado el ADN plasmídico se realiza seleccionando en placa de agar las colonias que han crecido en medio de cultivo selectivo LB (Pronadisa, Spain)

que contiene el antibiótico correspondiente; sólo las bacterias que han incorporado y expresado el gen de resistencia al antibiótico presente en el plásmido pueden dividirse y originar una colonia bacteriana. Tras identificar las colonias productoras, se cultivan a gran escala en presencia del antibiótico de selección y, mediante un procedimiento de extracción y purificación de plásmidos bacterianos basado en lisis alcalina y posterior purificación mediante una cromatografía en columna de intercambio aniónico (mediante los kits comerciales Nucleobond® y Quiagen®, en sus versiones *endotoxin-free maxiprep* y *gigaprep*, respectivamente), se extraen cantidades relativamente elevadas de plásmido purificado y libre de endotoxinas (aproximadamente 10 mg de ADN plasmídico por 2.5 litros de cultivo, en la extracción tipo *Gigaprep*) a partir de las bacterias transformadas.

2.1.3.2. Extracción

Todos los plásmidos utilizados en inmunización fueron extraídos a gran escala utilizando el kit comercial “Gigaprep” Endofree de Quiagen®, que permite obtener un extracto seco de plásmido altamente purificado y libre de endotoxina bacteriana, a excepción del primer ensayo de inmunización antiGD3, en el que se utilizaron kits de extracción *maxiprep endotoxin free* de Nucleobond®.

Las bacterias transfectadas con el plásmido correspondiente son cultivadas en medio LB (a 37° C y en agitación) durante unas 12-16 horas, hasta alcanzar el cultivo una DO_{660nm} de 0,9-1. En ese momento se detiene el crecimiento y se procede al centrifugado del cultivo para aislar las bacterias, que son lisadas y filtradas para separar el plásmido soluble del ADN cromosómico bacteriano y otros restos celulares no solubles. Esta solución se filtra por una columna de intercambio aniónico que une el plásmido y, tras diversos lavados que eliminan impurezas, se procede a extraer de la columna el ADN plasmídico ya purificado mediante un tampón de elución. Para obtener un mayor grado de pureza, se precipita

esta solución de plásmido con isopropanol, y se centrifuga a alta fuerza de campo para recoger el ADN precipitado. Se eliminan el sobrenadante y el pellet obtenido se lava con etanol (para eliminar los residuos de isopropanol) y se deja secar al aire, para resuspender luego el plásmido purificado en agua desionizada (milliQ), tampón Tris-EDTA pH 8,0 o solución glucosada (5%), según proceda.

El extracto purificado fue cuantificado por espectrofotometría ultravioleta (medidas de absorbancia a A260 y A280) para controlar su pureza y comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar su integridad. Se guarda congelado a -20 ° C hasta su utilización.

El kit de extracción comercial empleado permite la obtención del plásmido purificado de endotoxinas bacterianas, que se desprenden masivamente de las membranas celulares de las bacterias durante los pasos iniciales del protocolo de extracción, en el que hay una lisis celular. La endotoxina de la membrana celular bacteriana o lipopolisacárido bacteriano (LPS) ha sido asociado a bajas eficacias de transfección celular cuando se encuentra como contaminante procedente de los extractos de plásmidos utilizados en la transfección (u otras fuentes), y tienen otro efecto negativo en el caso particular de las experiencias de inmunización desde que el LPS es capaz de producir una estimulación inespecífica del sistema inmune in vivo. Tales circunstancias exigen la utilización de protocolos de extracción de plásmido que eliminen el LPS de los extractos previamente a su utilización en experiencias de vacunación y/o transfección.

2.1.3.3. *Cuantificación del ADN plasmídico y determinación de la pureza e integridad*

Se cuantifica por espectrofotometría de absorción. Se mide la absorbancia de una dilución 1/100 del extracto purificado anterior, a longitudes de onda de 260, 280 y 320 nm. Se mide asimismo la absorbancia de una muestra del solvente y se

determina la pureza (P) y concentración (C) de ADN mediante las siguientes fórmulas:

$C \text{ (mg/ml)} = [(A260 \text{ muestra} - A260 \text{ blanco}) - (A320 \text{ muestra} - A320 \text{ blanco})] \times 50 \times 100$; obteniéndose rendimientos de extracción típicos en el rango de 7 a 14 mg de ADN por columna de extracción, dependiendo del plásmido particular.

$P = [(A260 \text{ muestra} - A260 \text{ blanco})] / [(A280 \text{ muestra} - A280 \text{ blanco})]$; considerándose que el ADN tiene una pureza adecuada cuando se obtiene un valor de P en el rango 1,8-2,0

La integridad del plásmido extraído y purificado se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y tinción con bromuro de etidio y observación subsiguiente bajo luz ultravioleta del gel en un transiluminador.

2.1.4. Aislamiento de suero de plasma murino

El suero de ratón utilizado en las experiencias de protección frente a ADNsas séricas se extrae a partir del animal anestesiado con éter por punción intracardiaca. Se extrae la sangre total, y se procede al sacrificio del animal por dislocación cervical. Las muestras de sangre se guardan a 4° C en la propia jeringa de extracción y se procede posteriormente a aislar el suero por centrifugación. La jeringa se centrifuga a 500 g⁻¹ x 5 minutos, separándose el coágulo precipitado de color rojo de la fase sobrenadante transparente (suero sanguíneo), que se recupera y guarda a -20° C.

2.1.5. Extracción de antígeno GD3

El gangliósido GD3 utilizado en los ensayos con la línea celular B2CF167H fue suministrado generosamente por el Dr. Oriol Massó. Su extracción se desarrolla partir de las propias células B2CF167H en un proceso en cuatro etapas. Brevemente, se realiza una extracción de lípidos total por

homogeneización en presencia de solventes orgánicos seguida de una extracción por el método de reparto de Folch y Pi (Ledeen RW, Yu RK, 1982). A continuación se separan glicolípidos neutros de gangliósidos mediante una cromatografía de intercambio iónico y finalmente se purifica el GD3 mediante HPLC semipreparativa.

2.1.6. Aislamiento de proteínas de membrana de células tumorales

La mezcla de proteínas hidrofílicas de membrana de las células B16 (Tumor Membrane Proteins, TMP) empleada en los experimentos de inmunización, fue obtenida según el protocolo de Bordier (Bordier C, 1981). Brevemente, tras despegar de sus frascos y contar las células B16, previamente irradiadas, el pellet es resuspendido en 1ml de “tampón de extracción” por cada 10 millones de células. Este tampón está compuesto por Tris 10 mM, MgCl₂ 2 mM, Triton X-114 0.5% (Sigma, España) y un inhibidor de proteasas, el fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), 0.1 mM (Sigma, España), pH 7.2. La mezcla se incuba en hielo durante 45 min., agitando suavemente cada 10. Después se centrifuga a 5300 rpm, 4 °C, durante 15 min. Se recupera el sobrenadante y se añaden alícuotas de 750 ml sobre alícuotas de 250 ml de “tampón de centrifugación” (sacarosa al 10% en tampón de extracción) en tubos de centrifugación. Se incuba 3 min. a 37 °C y se centrifuga 5 min. a 2100 rpm. De nuevo el sobrenadante se recupera y esta vez a las alícuotas de 750 ml se les añade Triton X-114 hasta una concentración final del 0.5% antes de ponerlos en hielo sobre 250 ml de tampón de centrifugación. Tras 3 min. más a 37 °C y una última centrifugación de 5 min. a 2100 rpm, se obtienen dos fases, la superior contiene las proteínas hidrofílicas de las membranas celulares, que será retirada y guardada alícuotada a -20°C hasta su uso.

2.2. Preparación de liposomas

Los lípidos utilizados en la preparación de las diferentes formulaciones de liposomas fueron esfingomielina, colesterol, dicetilfosfato, fosfatidilcolina y el gangliósido GD3. Los liposomas fueron preparados según el método de obtención por dispersión mecánica (MLV) y por sonicación (SUV). La solución de lípidos en solvente orgánico (ClCH_3) preparada en la correspondiente relación molar para cada formulación fue sometida a evaporación rotatoria en un tubo de vidrio de fondo redondo bajo corriente de nitrógeno, obteniéndose una fina capa de lípidos desecados en el fondo del mismo. Las últimas trazas de solvente orgánico en el lípido desecado fueron eliminadas por extracción a vacío durante 1 hora, antes de proceder a la preparación de la suspensión liposomal.

2.2.1. MLV

Para la formación de los liposomas multilamelares grandes (MLV, Multilamellar Lipid Vesicles), el lípido desecado fue redispersado en solvente acuoso mediante agitación mecánica con Vortex, hasta la completa resuspensión del lípido. Se obtiene una población de liposomas muy heterogénea en tamaño, con múltiples bicapas lipídicas, de tamaño medio grande (0,7-1 micra). En promedio se obtienen hasta 10 bicapas por liposoma. (Lichtenberg D, Markello T. J Pharm Sci 1984;73:122–5.) La preparación de la suspensión de liposomas MLV constituye el paso previo común a los protocolos de preparación de los otros tipos de liposomas.

En una preparación típica, mezclamos la solución de lípidos en solvente orgánico (un total de 50 μmoles de SM:CH:DP en relación molar de 5:4:1 o SM:CH en ratio molar de 6:4) para formar la capa de lípidos desecada en el fondo del tubo de vidrio. A continuación, se añaden 500 μl de solución acuosa (tampón HBS, glucosa 5% o CF 30 mM en NaHCO_3 100mM). Una alícuota de 300 μl se somete a sonicación en

sonda y posterior centrifugación para la preparación de los liposomas SUV.

En el caso particular de los liposomas que encapsulan CF, los SUV se purifican de la CF no encapsulada y los residuos de MLV y partículas de Titanio por cromatografía de exclusión molecular, en lugar de mediante centrifugación. La suspensión sonicada se hace pasar por una columna cromatográfica de sepharosa-4B, obteniéndose los liposomas SUV purificados en la primera fracción del eluido.

2.2.2. SUV

Para la formación de los liposomas unilamelares pequeños (SUV, Small Unilamellar Vesicles), la suspensión de liposomas MLV anterior es defragmentada en vesículas unilamelares pequeñas (SUV) por sonicación mediante una sonda de ultrasonidos de titanio, hasta la completa clarificación de la solución. Las partículas de titanio liberadas por la sonda, así como los posibles residuos de liposomas MLV, fueron eliminadas de la suspensión mediante centrifugación (15000 g x 20 minutos). Este método de preparación rinde una población muy homogénea de liposomas pequeños (40-80 nm) y unilamelares (Walde, P. and S. Ichikawa 2001).

2.2.3. DRV

Preparación de liposomas por deshidratación-rehidratación (DRV, Deshidratation-Rehidratation Vesicles). Estos liposomas se preparan según el método de deshidratación-rehidratación, descrito por Kirby y Gregoriadis en 1984. Los lípidos se resuspenden por agitación en vortex con un volumen de 0.5 ml de agua destilada. Esta solución de aspecto lechoso, que contiene liposomas grandes multilamelares se somete a sonicación por sonda de ultrasonidos (Vibra cell) para reestructurar las vesículas y convertirlas en liposomas pequeños unilamelares (SUV),

momento en que la suspensión adquiere un aspecto semitransparente. Tras la sonicación se centrifuga la solución a 2500 g durante 20 minutos para eliminar las partículas de titanio contaminantes procedentes de la sonda y restos de liposomas MLV. En este punto se añade la sustancia a encapsular, se congela en nitrógeno líquido para evitar la reorganización de las vesículas y se deshidrata en un liofilizador durante 18 horas. Una vez liofilizada la muestra, se rehidrata lenta y progresivamente con agua destilada comenzando con 1/10 del volumen inicial durante 20 min. Al cabo de los 20 min. se completa el volumen hasta los 0.5 ml iniciales con tampón HEPES-NaCl (10 mM, 150mM), obteniéndose así liposomas multilamelares de tipo DRV.

2.2.4. MLV-FT

Preparación de liposomas obtenidos por ciclos de congelación-descongelación (MLV-FT, freeze-thawed Multilamellar Lipid Vesicles). Para su obtención se parte de una suspensión de liposomas MLVs preparada según lo descrito en el apartado anterior. Una vez obtenida se congela rápidamente en nitrógeno líquido (-80 °C), y seguidamente se descongela en baño termostático a 37° C. Este proceso se repite 5 veces para obtener los liposomas MLV-FT.

2.2.5. Cuantificación de lípidos

La cuantificación del contenido en fosfolípidos de la suspensión liposomal fue medida mediante la técnica colorimétrica de Stewartt. Este método está basado en la formación de complejos coloreados solubles en cloroformo, por la complejación entre el átomo de fósforo del fosfolípido y el ión ferrotiocianato (enlace de coordinación). Estos complejos se cuantifican por absorbancia ($\lambda=485$ nm). Alícuotas de cinco microlitros de la suspensión de liposomas fueron añadidas a tubos de ensayo con 2 ml de cloroformo y 2 ml de solución ferrotiocianato amónico. Los tubos se agitan vigorosamente en vortex durante 1 minuto (para permitir el

mezclado íntimo de las fases); y se dejan reposar durante 10 minutos para que se separen de nuevo y aislar la fase clorofórmica superior, que contiene los complejos coloreados. Esta fase se cuantifica por absorbancia y se interpola el valor obtenido frente a una curva estándar preparada en las mismas condiciones (a partir de un stock de PC o SM de 1 mg/ml) (Stewart, JC 1980).

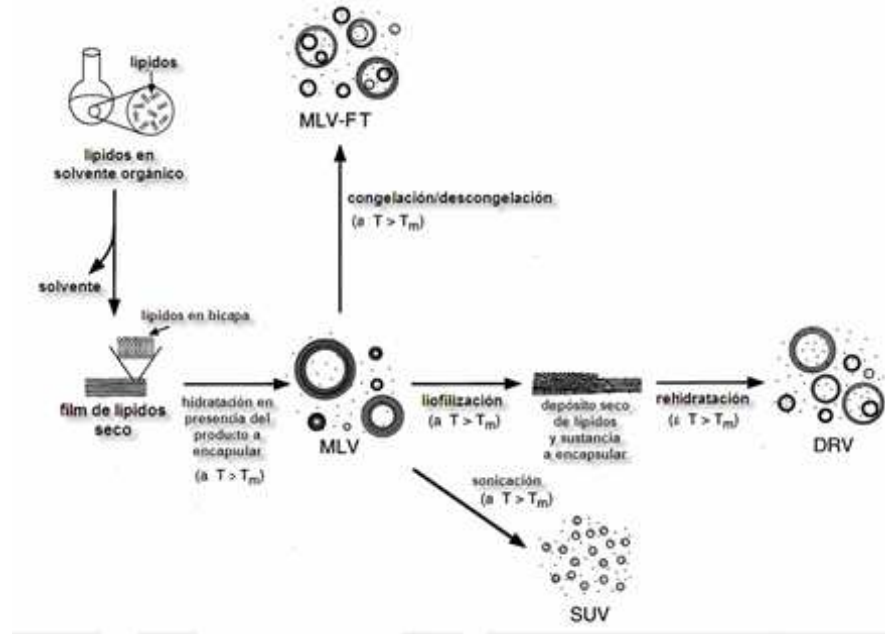


Figura 3. Esquema de los diferentes métodos de preparación de liposomas utilizados en el presente trabajo. Los liposomas de tipo MLV se preparan a partir de un film formado por desecación de una solución de lípidos en solvente orgánico sobre un matraz de vidrio de fondo redondo. Los liposomas se forman por adición de una disolución en solvente acuoso del material a encapsular y subsiguiente agitación mecánica para la resuspensión del lípido. Partiendo de la suspensión de liposomas MLV formada, pueden formarse liposomas de tipo SUV (mediante sonicación), liposomas de tipo MLV-FT (mediante ciclos de

rápida congelación-descongelación) o liposomas de tipo DRV (por liofilización y subsiguiente rehidratación).

2.2.6. Incorporación de sondas fluorescentes

Para la preparación de LPP cargado con la sonda fluorescente hidrosoluble carboxifluoresceína (CF), tras preparar la solución de lípidos en solvente orgánico y formar la monocapa por desecación con N₂ (g), se añade la CF (30mM en NaHCO₃ 100mM) y se forman los MLV (CF) por agitación en vortex. Los SUV se forman por sonicación en sonda a partir de los anteriores. Para purificarlos de la CF no encapsulada, se filtran por cromatografía de gel-exclusión en columna de sepharosa 4B. Se prepara una dilución seriada de la suspensión de liposomas SUV(CF) purificada, así como de los MLV(CF), y se cuantifican mediante el tratamiento con el detergente Triton X100 (que rompe los liposomas liberando la CF) y subsiguiente medida de la fluorescencia e interpolación en una recta patrón. Igualmente el contenido en lípidos de la suspensión liposomal se cuantifica por colorimetría con ferrotiocianato, calculándose la concentración en lípidos y rendimiento de la encapsulación.

2.3. *Preparación del lipopoliplexo*

2.3.1. Preparación de poliplexos ADN/PEI

Los poliplexos (PP) utilizados son complejos de plásmido y polietileneimina (PEI) que se preparan mezclando el ADN plasmídico con PEI de 25 Kda en un medio libre de iones. Los complejos se forman espontáneamente, por interacción iónica entre las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN y los grupos amino primarios y secundarios positivamente cargados del PEI. Se utiliza como solvente un medio libre de iones (5% Glc en agua milliQ) porque la

ausencia de iones en el medio de preparación produce poliplejos de pequeño tamaño, en el rango de nanómetros, frente a los poliplejos mucho mayores que se obtienen en los habituales medios tamponados con iones, del orden de micras (Goula, D., C. Benoist, et al. 1998).

El poliplejo se prepara en medio glucosado sin iones a una relación en carga N:P 10:1 respecto al ADN (que corresponde a una relación 1:1,4 en masa). El plásmido (1 mg/ml en 5% Glc) y el PEI (1.4 mg/ml en 5% Glc) se mezclan a volúmenes iguales y se agitan inmediatamente en vortex. Una vez preparados la solución se deja 15 minutos a temperatura ambiente antes de adicionar la suspensión de liposomas.

2.3.2. Preparación de lipopoliplejos

Los lipopoliplejos consisten en la asociación espontánea de poliplejos ADN:PEI con liposomas, formando un nuevo complejo que llamamos el vector LPP.

Los lipopoliplejos se elaboran usando una solución de poliplejo pADN/PEI de 25KDa, conteniendo 0.5 mg ADN/ml en 5% glucosa, incubada 15 min a T^a ambiente tras su preparación. En una preparación típica, un volumen de 1 ml de poliplejos se adiciona con el correspondiente volumen de suspensión de liposomas (preparada a 0,1 μ moles/ml). Las soluciones de lipopoliplejo se agitan en vortex y se incuban durante 60-90 minutos a T^a ambiente antes de su utilización.

Para su caracterización, así como para su empleo en inmunización, los lipopoliplejos se “cargan” con diferentes sustancias que se incorporarán en sus liposomas durante la preparación de estos. Por ejemplo, para su caracterización, los liposomas que formarán los lipopoliplejos se cargan de sustancias como CICs o carboxifluoresceína en su interior, o bien se marcan con una sonda fluorescente liposoluble (NPN, pireno) situada en la bicapa lipídica.

Incorporación de los antígenos en el lipopoliplexo. Para su uso en inmunización, los lipopoliplexos se cargan con antígenos, que se incorporan a los liposomas empleados en la preparación del lipopoliplexo en el momento de la elaboración de la suspensión liposomal:

a) en caso de tratarse de *antígenos liposolubles*, se añaden a la solución inicial de lípidos en solvente orgánico,

b) si son *antígenos hidrosolubles*, se añaden al líquido acuoso (5%Glc o HEPES o HBS pH 7,3) con el que se elaboran los liposomas

En el caso de los antígenos lipídicos, se asume para realizar los cálculos que los liposomas producidos mantienen en su composición la proporción de lípidos usada en la mezcla inicial en el solvente orgánico, de manera que se cuantifica la dosis de antígeno a partir de la cuantificación de la preparación de liposomas. Por ejemplo, utilizando la formulación SM:CH:DP:GD3 en proporciones molares 4:4:1:1 (es decir, con un 10% de GD3), se disuelven los lípidos en estas proporciones en solvente orgánico para preparar la suspensión liposomal y se asume que cuando se forme el liposoma un 10% de este estará constituido por el antígeno GD3. Por lo que para cuantificar una dosis de antígeno GD3 a inyectar a un ratón en forma de liposomas que contienen GD⁺, simplemente cuantificamos la concentración de lípidos en la suspensión liposomal recién preparada mediante una técnica apropiada, como la del ferrotiocianato de Stewartt (los rendimientos típicos suelen estar en torno al 85-90%, aunque varían en un rango más amplio, en torno al 60-95%).

En el caso de los antígenos hidrosolubles, en un primer paso se purifica el liposoma de los restos de moléculas hidrosolubles no encapsuladas (por diversos métodos: ciclos de centrifugación, lavados y decantación o diálisis o cromatografía de gel-exclusión). A continuación, una alícuota

del liposoma se trata con triton X100 para deshacer el liposoma y liberar el producto encapsulado, que se cuantifica por interpolación en una recta patrón mediante medidas espectrofotométricas (con el reactivo de Lowry o la sonda CBQCA en caso de proteínas, con picoGreen o Bromuro de Etidio en plásmidos, medida directa de la fluorescencia en sondas fluorescentes como la carboxifluoresceína, etc.).

Un esquema completo de la preparación del LPP puede verse en la figura 26.

2.3.3. Caracterización del Lipopolipolejo

A. Caracterización del Lipopolipolejo mediante ensayos de centrifugación

Los agregados formados después de la mezcla de los liposomas y el polipolejo fueron separados por centrifugación (15000 g x 20 min). La concentración de ADN total (antes de centrifugar) y la del sobrenadante después de centrifugar se determinan mediante la sonda fluorescente picoGreen® (λ_{ex} : 485; λ_{em} : 530) en un fluorímetro de microplaca (Cytofluor System, Millipore Corporation), mediante la interpolación en una curva estandar realizada con una solución seriada del mismo plásmido utilizado para preparar los complejos.

Previamente, se incuban las muestras con una solución de heparina al 5% y/o Triton X-100, ambas en exceso, para disociar los lipopolipolejos y/o polipolejos ADN/PEI y liberar el plásmido, permitiendo la accesibilidad de la sonda fluorescente (PicoGreen® o Bromuro de etidio).

Experimentos iniciales. Para preparar los lipopolipolejos en las experiencias iniciales de centrifugación, se utilizaron diluciones seriadas (1:5, 1:125 y 1:625) preparadas desde una solución stock de liposomas (SM:CH:DP o SM:CH) de 30 μ moles de lípido/ μ l: 80 μ l de cada dilución de liposomas se enfrentaron a 16 μ l de solución de polipolejo 0.5 μ gADN/ μ l

(pIL-4/PEI).

Caracterización con liposomas encapsulando CICs

La suspensión liposomal se prepara por adición de una solución de CICs 1M para la preparación de los liposomas MLV por redispersión mecánica de los lípidos, según lo descrito en el apartado anterior. Esta suspensión de liposomas encapsulando CICs se utiliza directamente para preparar los liposomas SUV por sonicación, según lo anteriormente descrito. Ambas suspensiones se purifican del CICs no encapsulado mediante sucesivos pasos de centrifugación a baja fuerza de campo y lavados en 5% Glc o tampón. Las suspensiones de liposomas encapsulando CICs así purificadas se utilizan para preparar los lipopoliplos y caracterizarlos por centrifugación en experiencias similares a la descrita en el apartado 2.3.3.1, pero a baja fuerza de campo centrífugo.

Caracterización del lipopoliplo por combinación de las técnicas de fluorescencia y centrifugación

EL LPP se prepara a partir de una suspensión de liposomas de 0,1 μ m "mixta", conteniendo un 98% de liposomas FT-MLV encapsulando CF 50 mM "mezclada" y un 2% de una suspensión de liposomas FT-MLV encapsulando CICs 1M, de composición SM:CH:DP 5:4:1 .

El PP se prepara con plásmido p2F y PEI 25KDa a relación N/P de 1:1,4, y a una concentración de 0,5 μ g/ μ l de ADN. Treinta microlitros de PP se adicionan de 15 μ l de diferentes diluciones de la suspensión de liposomas de CF y CS. Tras una incubación de 1h a T^a ambiente se cargan 2 μ l de las mezclas anteriores en una placa de 96 pocillos, adicionándose de 8 μ l de triton X-100 1% y 5 μ l de heparina al 5%, e incubando por 5 min en agitación y completando con tampón TAE a 180 μ l antes de medir la fluorescencia de la CF.

La placa se carga con muestras de los LPP antes y después de centrifugar a 15000 g x15min (tomándose en este caso las alícuotas de 2 μ l de los sobrenadantes).

Como control, se utilizan mezclas de 15 μ l de las diferentes diluciones de la suspensión de liposomas de CF y CS con 30 μ l de 5% Glc, cargadas en la placa en las mismas condiciones que las muestras de LPP.

B. Caracterización del Lipopoliplexo mediante técnicas electroforéticas

Para su caracterización por electroforesis, muestras de lipopoliplexo, liposomas, poliplexos y plásmidos fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio para determinar la retención por el gel de los diferentes componentes del lipopoliplexo. Esta técnica se basa en que los liposomas pequeños de tipo SUV pueden moverse a través del gel de agarosa debido a su pequeño tamaño, pero no es válida para liposomas de tamaño mayor de 100nm (pues este es el límite de paso a través del poro del gel). Para su visualización, los liposomas SUV se preparan encapsulando la sonda fluorescente carboxifluoresceína, que permite la localización de la posición de los liposomas en el gel bajo iluminación ultravioleta con un transiluminador

En una preparación típica, los liposomas SUV encapsulando carboxifluoresceína SUV(CF) fueron preparados a partir de 50 μ moles de lípidos con formulación SM:CH:DP (5:4:1) y 500 μ l de 30 mM carboxifluoresceína en NaHCO_3 100 mM, y la suspensión liposomal se purifica de los restos de CF no encapsulada mediante cromatografía en columna de gel filtración. El poliplexo se prepara a partir de una solución del plásmido (1 mg/ml de ADN en 5% glucosa) y una solución de PEI (1.41mg/ml in 5%glucosa). Las muestras de LPP y (SUV(CF) liposomas, poliplexos y plásmidos se cargan en alícuotas de 10 μ l, previamente adicionadas de Triton X-100 o heparina, según corresponda.

Las muestras fueron mezcladas con 4 μ l de solución de azul de bromofenol e incubadas por 15 minutos antes de cargar en el gel de agarosa (0.8%). La electroforesis se corre durante 40 minutos a 80 mV, y finalmente el gel es incubado con solución de bromuro de etidio (1 μ g/ μ l) para marcar el

ADN previamente a su examen bajo iluminación UV en un transiluminador.

Caracterización del vector mediante ensayo de retardo en gel

Para la demostración de la formación del vector y el ulterior análisis de sus componentes, hemos desarrollado un nuevo método electroforético que permite la caracterización de vectores de tipo lipopoliplexo realizados con liposomas pequeños (de tamaño no superior a 100 nm). El método se basa en la visualización por fluorescencia de liposomas SUV que encapsulan la sonda fluorescente carboxifluoresceína; así como en la disociación específica de los diferentes componentes del vector, mediante un detergente (Triton X-100) y un polímero aniónico (heparina). La heparina interacciona electrostáticamente mediante sus cargas negativas con el PEI (Moret, I., J. Esteban Peris, et al. 2001) desplazando a este de su unión con el ADN, y permitiendo la liberación del plásmido del poliplexo ADN/PEI. El Triton X-100 es un detergente capaz de disolver estructuras lipídicas tales como membranas celulares o liposomas.

En el siguiente experimento, se prepararon dos soluciones madre:

- a) liposomas SUV (SM:CH:DP en relación molar 5:4:1) preparados en 5% glucosa
- b) plásmido p3CEGFP a concentración 1mg/ml en 5% glucosa

A partir de estas dos soluciones, se elaboraron las soluciones de:

- c) poliplexo p3CEGFP/PEI
- d) lipopoliplexo p3CEGFP/PEI/ SUV (SM:CH:DP).

Las soluciones de liposomas solo(a), plásmido sólo (b) y poliplexo sólo (c) se utilizaron para preparar los controles que

acompañan en la electroforesis a las muestras de lipopolipéjido (d); fueron todas preparadas en condiciones análogas a las muestras de lipopolipéjido.

La electroforesis muestra cuatro tipos de muestras: a la izquierda aparece el grupo del “lipopolipéjido”, seguida por los grupos control de “liposomas sólo”, “polipéjidos sólo” y “plásmido sólo”. Cada uno de las muestras de los cuatro tipos ha sido adicionada con un volumen equivalente de:

- | | | |
|----|-------------------------|-------|
| 1. | Triton X-100 | (T) |
| 2. | 5% Glucosa | (G) |
| 3. | Heparina | (H) |
| 4. | Triton X-100 y Heparina | (T/H) |

Al finalizar la electroforesis, el gel ha sido teñido con una solución de bromuro de etidio, para visualizar el ADN; y sometido a iluminación UV en un transiluminador.

Determinación de la relación óptima entre polipéjidos y liposomas

Dado que el LPP se prepara a partir de dos componentes, polipéjidos y liposomas, hemos desarrollado un ensayo electroforético que define la cantidad de liposomas necesarios para preparar el lipopolipéjido a partir de una cantidad de polipéjido prefijada. Esta técnica pretende conocer la cantidad justa a adicionar de liposomas a una cantidad fija de polipéjido para que se forme el LPP, evitando que se añadan liposomas en exceso que permanecerían libres en solución sin formar parte del LPP (lo cual es un problema técnico grave en experiencias de inmunización con el LPP). La formulación de lipopolipéjido testada en este ensayo fue preparada mediante dos procedimientos diferentes: a) a partir de una serie de concentraciones decrecientes de soluciones de liposoma y b)

desde volúmenes decrecientes de una solución stock única de liposoma.

a) **Lipopoliplejos preparados desde concentraciones decrecientes de solución de liposoma.** Una serie de 8 diluciones de liposomas, con un volumen final de 80 μl se obtuvieron mezclando 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10 μl de liposomas SUV(carboxifluoresceína) (SM:CH:DP a 0.025 $\mu\text{mol lipid}/\mu\text{l}$) con 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 μl de solución 5% glucosa, respectivamente. Dos microlitros de poliplejo ADN/PEI (0.5 $\mu\text{g ADN}/\mu\text{l}$) fueron mezclados con cada una de estas soluciones, incubándose durante una hora para la preparación del lipopoliplejo.

b) **Lipopoliplejos preparados desde volúmenes decrecientes de una solución de liposoma.** Una serie de 8 diluciones de lipopoliplejo fueron preparadas mezclando 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10 μl de liposomas SUV(carboxifluoresceína) (SM:CH:DP a 0.025 $\mu\text{mol lipid}/\mu\text{l}$) con 2 μl de poliplejo ADN/PEI (0.5 $\mu\text{g ADN}/\mu\text{l}$).

Alícuotas de 8 μl de cada una de las anteriores preparaciones de LPP se mezclaron con 2 μl de tampón 40 mM, pH 8 Tris-acetato o 2 μl de solución de heparina (0.025% en 40 mM, pH 8 Tris-acetato) y 2 μl de azul de bromofenol. Después de 15 minutos, 10 μl de las muestras se cargaron en el gel de agarosa (al 0.8%) y se corrieron por 30 minutos a 60 mV. El gel fué examinado mediante iluminación UV en un transiluminador.

2.3.4 Terminología

Poliplejos. Las preparaciones de poliplejos constan de dos componentes, ADN en forma de plásmido y polietienimina (PEI). En el presente trabajo las notaremos como “*nombre del plásmido/PEI*”. Por ejemplo, una solución de poliplejo realizada con el plásmido p3CEGFP sería representada como

p3CEGFP/PEI. La proporción en la que intervienen el plásmido y la polietilimina se representa como *relación atómica o en carga*, indicando la relación que existe entre el número de cargas positivas del PEI por sus grupos amino positivamente cargados (en el supuesto de que todos los grupos aminos estuvieran efectivamente en estado ionizado) y el número de cargas negativas del ADN plasmídico debidas a los grupos fosfato ionizados (suponiendo de nuevo que todos los fosfatos se encontrasen ionizados). Estas relaciones se indican como “N/P” seguido de la proporción en que interviene cada tipo de ión. Por ejemplo, la relación N/P 10:1” significa que hay 10 cargas positivas (por los grupos amino o “N” del PEI) por cada negativa de los fosfatos o “P” del ADN. Estas relaciones son proporcionales a la cantidad o masa del ADN y el PEI; por ejemplo la relación N/P 10:1 corresponde a una relación en masa de 1’4 mg de PEI por cada 1 mg de ADN.

Liposomas. En las preparaciones de suspensiones liposomales, la notación empleada nos informa de tres aspectos fundamentales:

- el tipo de liposoma (MLV o SUV o DRV, etc.)
- la composición lipídica del liposoma
- la relación molar en la que interviene cada lípido en la formulación lipídica

Por ejemplo, una preparación de liposomas de tipo MLV, en la que intervienen la fosfatidilcolina (PC), el colesterol (CH) y el dicetilfosfato (DP) en relación molar de 6, 4 y 1 la notaríamos así: MLV (PC:CH:DP) 6:4:1

Lipopoliplejos. En las preparación de lipopoliplejos, intervienen tanto una preparación de poliplejos como de liposomas. En la notación aparecen ambos. Por ejemplo, un lipopoliplejo preparado con el plásmido p3CEGFP y liposomas SUV de esfingomielina, colesterol y dicetilfosfato, lo representamos así: p3CEGFP/PEI/SUV (SM:CH:DP)

2.4 Estudios de Microscopía

2.4.1 Microscopía electrónica de complejos RCC10/plásmido

La evaluación del tamaño y de la morfología de los complejos formados, tanto los lipopoliplos como los complejos de RCC10/ADN, puede ser realizada por microscopía electrónica de transmisión.

Se utilizan rejillas especiales para microscopía electrónica tratadas con solución de Formvar y cubiertas con una capa de grafito, para aumentar la capacidad de absorción de las mismas.

Las rejillas llevan un recubrimiento de solución de Formvar al 0.4% en cloruro de etileno. Esta película aumenta la adsorción y disminuye la luz de los cuadrantes de la rejilla, permitiendo la retención de partículas más pequeñas.

Una vez preparada la rejilla, se deposita una gota de muestra, permaneciendo en contacto 5 minutos. Tras lavar dos veces la muestra con PBS, se seca con papel absorbente y se deposita encima de la rejilla una gota de ácido fosfotúngstico al 1 %, durante dos minutos. Posteriormente se seca la rejilla con papel absorbente y se guarda hasta su estudio en un microscopio electrónico Philips CM-10 100 KW.

El ácido fosfotúngstico puede proporcionar una tinción negativa, en la que las muestras aparecen con color claro sobre fondo oscuro.

Preparación de las muestras

Las muestras de poliplojo se prepararon según el protocolo habitual, con 15 minutos de incubación del poliplojo antes de la mezcla con el liposoma (a una relación de 0,1 mg lípido/mg ADN) y con una hora de incubación desde la preparación del lipopoliplojo hasta su incorporación en la rejilla. El medio de preparación del LPP fue glucosa 5%.

Los complejos RCC10/ADN fueron preparados a una concentración de 0,02 mg/ml de ADN, a relación en carga

N/P 1:1; en solución tampón HEPES 15mM pH 7,4. Las muestras fueron cargadas en la rejilla dos horas después de su preparación.

2.4.2 Microscopía de fluorescencia del Lipopoliplejo

Estudio de la distribución de la fluorescencia del Ioduro de propidio en bazo

El ioduro de propidio (IP) es un fluorocromo no vital, es decir, no tiene capacidad para atravesar por sí solo las membranas plasmáticas celulares, debido al tamaño y carga eléctrica positiva del catión propidio. Por otro lado el propidio, una vez introducido en la célula, ingresa en el núcleo y se une al ADN nuclear; y solo bajo estas condiciones (unido al ADN) es capaz de emitir fluorescencia. Por lo tanto, es un buen indicador para comprobar la capacidad del LPP como vector de transporte como para introducir sustancias en el interior de las células. La solución de IP se localiza en el interior del compartimento liposomal del lipopoliplejo; y se introduce en este compartimento durante el proceso de preparación del liposoma.

Para constituir los lipopoliplejos cargados con IP, una suspensión de liposomas MLV (SM:CH:DP en relación molar 5:4:1) encapsulando Ioduro de propidio (IP) fue elaborada a partir de 25 micromoles totales de lípido y 250 microlitros de IP 10 mM en HEPES 15mM pH7,4.

Desde esta suspensión de liposomas MLV se prepararon por sonicación con sonda una suspensión de liposomas de tipo SUV. Ambas suspensiones liposomales fueron purificadas, mediante los siguientes procedimientos, para eliminar el exceso de IP no encapsulado:

- Los liposomas MLV fueron purificados del IP no encapsulado mediante seis ciclos de centrifugación y lavado sucesivos. Tras cada centrifugación (15000 rpm x 20

minutos) de la suspensión liposomal se resuspende el pellet en agua limpia, desechándose el sobrenadante.

· Los liposomas SUV se sometieron a diálisis en agua durante 24 horas para eliminar el IP libre; renovándose el agua cada 8 horas.

Para cuantificar el rendimiento de sonda encapsulada, una alícuota de 10 μ l de cada tipo de liposoma fue desecada mediante corriente de Nitrógeno en un tubo eppendorf y redisoluelta en 25 μ l de Cl_3CH para la disolución del liposoma y liberación del IP. A continuación, se añadieron 1500 μ l de tampón HEPES 15 mM pH 7,4 y se vorteoó durante un minuto, para facilitar la disolución del IP en la fase acuosa. Tras 10 minutos de reposo, se midió la absorbancia a 288 nm de la solución acuosa para determinar la concentración de IP en las suspensiones de liposomas, interpolando en una curva estándar realizada a partir de 0, 10, 20, 40, 60 y 80 μ l de IP 50 μ g/ μ l en tampón HEPES.

Con los datos de concentración de IP interpolados para cada tipo de suspensión liposomal, MLV y SUV, se prepararon sendas soluciones de liposomas MLV y de lipopolipolejo (preparado este a partir de los liposomas SUV, con una solución de polipolejo a 0,5 μ g/ μ l de pMOK) que contenían un total de 10 μ g de IP en 200 μ l totales de volumen. Estas soluciones fueron inyectadas en los animales a través de la vena de la cola, además de una solución control conteniendo 10 mM de IP en 5% Glc; tras lo cual fueron sacrificados una hora después mediante dislocamiento cervical.

El bazo fue extraído y fijado en solución formolada al 4%, crioprotectado por incubación en una solución de sacarosa al 30% durante 24 horas, y cortado mediante un criotomo de congelación (40 micras). Los cortes fueron colocados en un portaobjetos en grupos de seis mediante medio de montaje para microscopía para su observación bajo el microscopio de fluorescencia.

Formación del Lipopoliplejo

El vector lipopoliplejo puede visualizarse por microscopía de fluorescencia, utilizando liposomas previamente marcados con una sonda fluorescente (carboxifluoresceína).

Los liposomas SUV son demasiado pequeños para ser visualizados por microscopía óptica, por lo que se escogió preparar el LPP con este tipo liposomal. Volúmenes iguales de poliplejo pMOK/PEI se adicionó de cuatro suspensiones de liposomas SUV de distinta composición, que encapsulaban la sonda fluorescente carboxifluoresceína, en una relación de 0,3 moles de lípido por 50 microgramos de ADN.

Las composiciones ensayadas fueron:

- 1) PC:CH
- 2) PC:CH:DP
- 3) SM:CH
- 4) SM:CH:DP

Estas 4 suspensiones liposomales, preparadas a una concentración de 0,3 micromoles/ml, se mezclaron con un volumen igual de poliplejos pMOK/PEI de 0,5 microgramos de ADN/ml en relación N:P de 11:1 (1:1,4 ADN/PEI en masa).

Los liposomas SUV(CF) fueron purificados de la sonda libre no encapsulada mediante cromatografía de gel-exclusión en sephadex 4B antes de utilizarlos. La concentración de carboxifluoresceína encapsulada en los liposomas fue de 30mM.

Como controles, se usaron estas mismas soluciones de liposomas pero mezcladas con 5%Glc en lugar de con solución de poliplejos, así como una solución de poliplejos mezclada con un volumen igual de 5%Glc.

2.5 Ensayos in vivo del lipopolipéjido en modelo murino

2.5.1 Protocolo general de vacunación

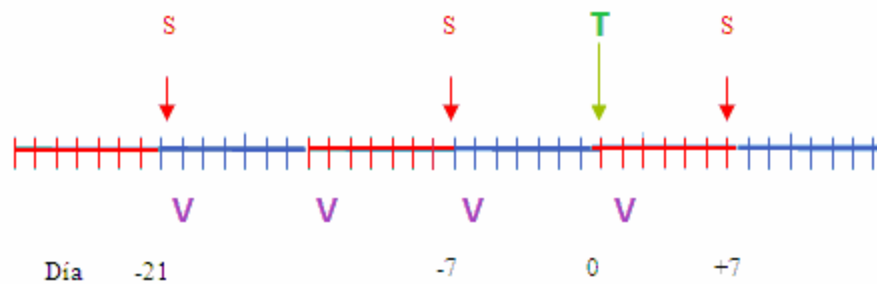
A lo largo de las diferentes experiencias de inmunización *in vivo* los animales han sido vacunado/tratados con diferentes dosis de lipopolipéjidos e inoculados en su caso con células para inducir el desarrollo del tumor, según cada experiencia, pero diseñadas todas ellas según un modelo de ensayo de inmunización común en el que se separan 14 días las dosis sucesivas de lipopolipéjido y se inocula el tumor (considerado como día 0) 7 días antes de la última dosis, tomándose muestras de sangre de los animales a los días -15, -1 y +15 respecto de la implantación del tumor.

Los datos medidos para evaluar las experiencias de inmunización son el volumen del tumor, la supervivencia final de los animales y la producción y subtipos de inmunoglobulinas específicas en las muestras de sangre periférica extraídas a los animales durante el ensayo.

Todos los experimentos que se refieren en la presente tesis doctoral siguen básicamente el mismo diseño experimental: el día de implantación del tumor es considerado como día 0, en el que 10^5 células salvajes B16 son implantadas en el pata izquierda de los animales.

Las dosis de vacunación se suministran los días -21, -7 y +7 (semanas -3, -1 y +1, respectivamente), por vía subcutánea, en la pata contralateral a la portadora del tumor.

Gráficamente, el diseño general de los ensayos de vacunación se puede representar así:



donde V es vacunación, T es implantación de tumor y S es extracción de sangre.

Estudio de la respuesta inmunológica inducida por el lipopoliplejo portando el antígeno GD3 de ratón

Los animales fueron vacunados los días 0, 20 y 40; y se tomaron muestras de 200 μ l de sangre los días -1, +19 y +39 respecto a la primera dosis de vacunación. La sangre fue reunida en un "pool" por grupo de vacunación, del cual se separó el suero sanguíneo, guardándose congelado a -80 °C hasta el momento de su uso. Los ratones fueron inyectados subcutáneamente en la pata izquierda. con una dosis de 130 μ l de lipopoliplejo, liposoma o 5% Glc. Las dosis de antígeno y ADN plasmídico recibidas fueron 0,03 μ g de GD3 y 50 μ g de plásmido pMOK, respectivamente.

Ensayo de vacunación antitumoral con el lipopoliplejo y el antígeno GD3 en modelo de melanoma murino

Los ratones son vacunados los días -21, -7 y +7 con respecto al día de la implantación de las células tumorales (día 0) en la experiencia a tres dosis de vacuna, y a -63, -49, -35, -21, -7 y +7 en la experiencia a 6 dosis. Se vacunan con aprox. 100 μ L de la suspensión de lipopoliplejos intradérmicamente y se implanta el tumor con 10^5 células en 100 μ L también intradérmicamente, en la pata trasera contraria a la de la vacunación.

En la experiencia a 3 dosis, los vectores se prepararon de la siguiente manera:

300 μ l plásmido (1 μ g/ μ l) + 300 μ l PEI 25KDa (1,4 μ g/ μ l) pH 7.0 ---> 600 μ l PP + 112.5 μ l liposomas SUV (0,016 μ moles lípido/ μ l) --> 712,5 μ l LPP

5,14 μ l de RCC10 30mM + 500 μ l de plásmido pMOK (0,5 μ g/ μ l en 5% Glc) ---> (en frío, 8 horas de incubación)--> + 100 μ l de 5%Glc---> 600 μ l + 112.5 μ l liposomas SUV (0,016 μ moles lípido/ μ l) --> 712,5 μ l complejos RCC10/liposomas

En la experiencia a 6 dosis los complejos se prepararon de manera similar.

Ensayo de vacunación antitumoral con el lipopoliplexo y extractos de proteínas tumorales de membrana (TMP).

Los ratones son vacunados los días -21, -7 y +7 con respecto al día de la implantación de las células tumorales (día 0). Se vacunan con 100 μ L de la suspensión de células intradérmicamente y se implanta el tumor con 105 células en 100 μ L también intradérmicamente, en la pata trasera contraria a la de la vacunación.

2.5.2 Volumen de tumor y supervivencia de los ratones

A lo largo de los ensayos de inmunización antitumoral, se registran:

- **El volumen de tumor.** Como el tumor se implanta intradérmicamente en la pata del ratón, esto provoca que en el grupo control y en los que ha fallado el tratamiento se desarrolle un tumor, que da lugar a un aumento del tamaño de la pata. Este es medido utilizando un pie de rey, que mide en mm, la longitud a lo alto y a lo ancho de la pata del ratón.

Una vez obtenidas las medidas, se calcula el volumen de tumor mediante la fórmula: $V = (D \times d^2)/2$, donde D= diámetro mayor, d= diámetro menor y $V = \text{mm}^3$.

- **Supervivencia de los ratones.** Al cabo de unas semanas de la implantación de tumor, comienza la mortalidad en los ratones no vacunados o en los que no ha funcionado la inmunización. Por ello, se hace un seguimiento diario de la supervivencia registrando el momento en que los ratones que van muriendo, para posteriormente construir las curvas de supervivencia.

Para comparar los resultados de los diferentes grupos de tratamiento se empleó el test estadístico Two-way ANOVA, con el post test de Bonferroni (95% intervalo de confianza), expresando las diferencias significativas en base al parámetro P-valor, siendo éste $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$, de menor a mayor diferencia estadísticamente significativa, respectivamente.

Las curvas de supervivencia se trazaron en base al método de Kaplan-Meier, para poder así aplicar posteriormente el test logrank y comparar las curvas dos a dos. Los cálculos estadísticos y las representaciones gráficas se realizaron mediante la aplicación GraphPad Prism v. 4.

2.5.3 Determinaciones inmunológicas

Producción de inmunoglobulinas

Para evaluar la producción de inmunoglobulinas como respuesta a la implantación y desarrollo del tumor, así como para evaluar la producción de citoquinas, se realizan tomas de sangre los días -1 y +15 con respecto al día de la implantación del tumor (día 0).

La extracción de sangre se realiza mediante una incisión en la vena de la cola, y se recoge por capilaridad en capilares previamente heparinizados, que son centrifugados a 1000G x

5 min para separar el plasma, que se guarda congelado a -20°C hasta el momento de su utilización.

Determinación de anticuerpos frente a GD3

Los títulos de anticuerpos contra el antígeno GD3 de las muestras de plasma de ratón fueron determinados por ELISA, según el procedimiento descrito en Masso O, Alino SF, et al. (1996).

Determinación de anticuerpos frente a TMP

La medida de IgG producidas frente a TMP a partir de muestras de plasma de los animales, se realizó según el protocolo descrito en la literatura (Herrero MJ, Botella R 2006). Básicamente, las placas de ELISA (Costar, España) se cubren con TMP a 0.8 µg/ml (100 µl) en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9.6, y se incuban a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se bloquea con solución de 1% PBS-BSA durante 1h a temperatura ambiente. Seguidamente se lava con PBS-Tween 20 al 0.1% y se añaden las muestras de plasma diluídas en PBS-BSA 1%-Tween 20 al 0.1% (a dilución 1/1.000 para determinar las inmunoglobulinas G totales y la subclase IgG1; y a dilución 1/100 para determinar las inmunoglobulinas de la subclase IgG2a). Se incuba durante 3h a temperatura ambiente. Los anticuerpos del plasma unidos a la placa se detectan a) con anti IgG de cabra (Biocheck, USA) a dilución 1/10.000 para la medida de IgG totales, y b) con los anticuerpos de antiinmunoglobulinas específicas de ratón para medir las subclases específicas, a dilución 1/1.000 (Sigma, Mouse monoclonal isotyping reagents, España). Seguidamente se adiciona anti-IgG-cabra biotinilado de conejo a dilución 1/5.000 (Sigma, España), y estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano picante (Sigma, España). Las placas son finalmente reveladas con una mezcla de ortofenilendiamina (OPD, Sigma, España) 30 mg/ml y peróxido de hidrógeno (Fluka, España), y la reacción detenida con HCl 1N, para leer la absorbancia a 492 nm.

Todas las muestras fueron ensayadas por duplicado, calculándose la absorbancia media y la desviación estándar.

2.5.4 Transfección tisular con el Lipoplejito

El *Acondicionamiento Genético Tisular* consiste en la transfección local in situ con plásmido desnudo administrado en gran cantidad por vía subcutánea en un volumen grande de vehículo de inyección. Este método de transfección fue utilizado para el LPP para verificar su transfección in vivo. EL LPP preparado con un plásmido con el inserto de la citoquina m-GM-CSF (pMOK) es inyectado por vía subcutánea en la pata derecha del ratón, administrándose un volumen igual de vehículo (5% Glc) en un grupo control negativo.

El LPP se preparó en condiciones asépticas utilizando reactivos y material esterilizado por calor en autoclave o mediante filtración esterilizante, y en campana de flujo de seguridad biológica tipo II.

A dos tiempos distintos (48 horas o 7 días desde la administración del LPP), se sacrifican los animales y se toman muestras de tejido (piel y capa de músculo subyacente) para extraer el ARNm y cuantificar por PCR la expresión del gen GMCSF. El pelo de la zona de la biopsia fue eliminado antes de tomar la muestra de piel.

Las muestras de tejido fueron colocadas en hielo en el momento de su toma y trasladadas inmediatamente a un refrigerador a -20° C, hasta completar su recolección.

A continuación, se homogeneizaron en baño de hielo con un homogeneizador y se extrajo el ARN total mediante el método de extracción con Trizol(R) (Invitrogen, España).

Seguidamente se mide la concentración y se determina la pureza de las muestras por espectrofotometría ultravioleta,

tomándose 1 µg de ARN de cada extracción para pasar el ARNm a cADN mediante transcriptasa reversa (utilizando un primer contra la cola poliadenilada del ARN mensajero).

Por último, se cuantifica el contenido el ARNm específico del gen del GM-CSF mediante PCR cuantitativa con los primers adecuados, a partir de los cADN anteriores. Para su realización se emplearon kits, reactivos y protocolos estandar de Applied Biosystems (España): TaqMan RT reagents, Taq Man Assay on Demand para *m-GM-CSF* y Abi Prism 7700 Software.

Los animales se inyectaron por vía subcutánea en la pata derecha. Se administraron dosis de 120 µl de LPP conteniendo 50 µg de plásmido (pMOK o p2F GM-CSF) y liposomas MLV-FT de composición SM:CH:DP (5:4:1); a una relación 0,03 µmol lípido/50µg ADN. Asimismo, como control negativo, se inyectaron dos grupos de animales con el medio de preparación del LPP (5% Glc).

Los ratones se separaron posteriormente en dos series de cinco jaulas. Una de las cuales se sacrificó a las 48 horas, y la otra a los 7 días desde el momento de la administración del vector. Se tomaron muestras de tejido (piel y parte del tejido muscular subyacente) de la pata derecha, en la que se aplicó el vector; y también de la pata izquierda, como control.

Las muestras de tejido fueron colocadas en hielo en el momento de su toma y trasladadas inmediatamente a un refrigerador a -20° C, hasta completar su recolección.

A continuación, se homogeneizaron en baño de hielo con un homogeneizador y se extrajo el ARN total mediante el método del Trizol®.

Día 1	Preparar liposomas Preparar ADN (1 mg/ml 5%Glc) y PEI (1,4 mg/ml 5%Glc) Preparar LPP Inyección subcutánea en los animales
Día 3	Sacrificar animales (48 HORAS) Extraer tejido (piel y músculo)
Día 11	Sacrificar animales (7 DÍAS) Extraer tejido (piel y músculo)
Día 12	Homogeneizar
Día 13	Extraer ADN y ARN del tejido
Día 14	Pasar ARNm a cADN
Día 15	RT-PCR cuantitativa

2.6 Preparación de complejos RCC10/plásmido

2.6.1 Productos

Los agentes RCC10, HCC10 y RCC12 se obtuvieron mediante síntesis química total por encargo a un laboratorio comercial especializado en síntesis de péptidos (Diverdrugs SA).

Los agentes RCC10 y RCC12 están constituidos por un dipéptido Arginina-Cisteína unido a una cadena hidrocarbonada lineal de 10 y 12 carbonos respectivamente (decano o dodecano). Sus fórmulas moleculares son Arg-Cys-(CH₂)₉CH₃ y Arg-Cys-(CH₂)₁₁CH₃.

El agente HCC10 está constituido por un dipéptido Histidina-Cisteína unido a una cadena hidrocarbonada de 10 carbonos. Su fórmula molecular es His-Cys-(CH₂)₈CH₃.

El agente RCC12 se presenta como una sustancia de aspecto céreo y translúcida. Los vectores RCC10 y HCC10 por el contrario se presentan como un polvo de color blanco.

La estructura química se confirma mediante análisis certificados de RMN-H por la empresa que realizó la síntesis.

2.6.2 Preparación de complejos con ADN plasmídico

El RCC se añade desde una solución etanólica concentrada (6mM) a una solución de plásmido en tampón HEPES 15mM pH 7,3 saturado con oxígeno, bajo intensa agitación en vortex. Típicamente, 200 μ l de una dilución en tampón del plásmido 0,02 μ g/ μ l se adicionan con 2 μ l de RCC 6mM en etanol (para una relación en carga N/P=1) y se deja en incubación (T^a ambiente o en refrigerador) durante 8 horas antes de su utilización.

Los complejos de plásmido con el agente HCC10 se preparan de la misma forma.

2.6.3 Determinación de la cmc

La determinación del valor de cmc del vector RCC10 se realiza mediante medidas fluorimétricas de una serie de soluciones del vector en presencia de la sonda fluorescente NPN (1-N-phenylnaphthylamine).

El medio base está constituido por una solución tampón HEPES 15mM pH 7.3 saturada con gas Nitrógeno, NPN a 10^{-6} M (añadido desde un stock etanólico 10^{-3} M) y DTT 1mM. Sobre este medio se preparan, por dilución seriada, una serie de diluciones decrecientes de RCC10. En un espectrofluorímetro de placa, se mide la fluorescencia a 320 nm de estas diluciones. Los datos de intensidad de fluorescencia se representando en forma semilogarítmica frente a la concentración de RCC10. La curva obtenida presenta un incremento brusco de intensidad de fluorescencia a partir de aquellas concentraciones en que se verifica la presencia de micelas. A partir de la curva, por extrapolación de la tendencia lineal de ambos tramos, el horizontal y el vertical, se obtiene el valor de concentración en el que se comienzan a formar las micelas

2.6.4 Método de preparación en frío

Los complejos de plásmido con los agentes RCC10 o HCC10 se preparan según el procedimiento descrito en 2.6.2, pero en el método “en frío” las soluciones empleadas son enfriadas previamente en un refrigerador (aproximadamente a una Tª de 4°C) y se mantienen en baño de hielo durante las manipulaciones necesarias para formar el complejo. Seguidamente el complejo se guarda refrigerado a 4°C durante el tiempo de incubación necesario para completar su preparación. Es aconsejable asimismo refrigerar previamente a 4°C y mantener en hielo las puntas de pipeta y recipientes utilizados en las manipulaciones durante la preparación del complejo.

2.6.5 Electroforesis

Muestras de 8 µl del vector preparadas según el procedimiento anterior se adicionan de HEPES 15mM pH 7,3, o SDS 1% (quedando una concentración final de 3mM), o DTT 180 mM (quedando a una concentración final de 6mM) ; y de 4 µl de solución estándar de azul de bromofenol. Alícuotas de 10 µl se cargan en el gel de agarosa al 0,8% y se corre la electroforesis durante 30 min a -80 mV.

2.6.6 Degradación en suero de complejos RCC10

Muestras de 20 µl del vector preparadas según el procedimiento anterior o de plásmido libre control se adicionan de 20 µl medio de cultivo DMEM conteniendo 10% de SBF y se incuban en baño a 37° C durante un tiempo de 1 hora; transcurrido el cual se detiene la reacción enfriando las muestras con hielo y adicionando 2 µl de solución de EDTA 10%. Se toman alícuotas de 10 microlitros y se mezclan con 2 µl de heparina 5% y 4 µl de azul de bromofenol antes de cargar el gel a 10 µl /pocillo. Se

preparan controles adicionales con DMEM sin SBF, así como con DMEM 10% de SBF añadido justo antes de cargar el gel ("*a tiempo cero*").

2.6.7 Espectrometría de masas de los agentes HCC10 y RCC10

La labilidad de los grupos tiol presentes en la estructura química de los agentes HCC10 y RCC0 hace necesario que estos productos se conserven a -80°C en atmósfera de nitrógeno, para evitar la oxidación de los tioles. Para comprobar la estabilidad de los productos almacenados, muestras de HCC10 y RCC10 conservadas bajo estas condiciones se analizaron mediante espectroscopía de masas, utilizando alícuotas de estas mismas sustancias oxidadas mediante la adición de NaOH (a concentración 0,1M e incubación o/n a 65°C) como control positivo, y alícuotas reducidas con DTT 10mM como controles negativos. El análisis por espectrometría de masas de muestras almacenadas durante 18 meses en las condiciones anteriormente citadas mostró que el 85-90% de ambos productos se encontraba en forma reducida (datos no mostrados).

RESULTADOS

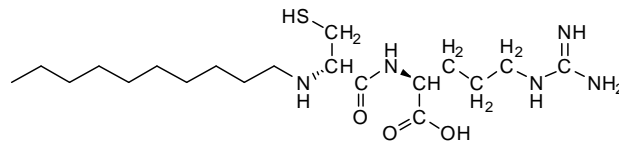
3 . Resultados

3.1 *Desarrollo de un vector de transferencia génica basado en detergentes catiónicos con grupos tioles dimerizables*

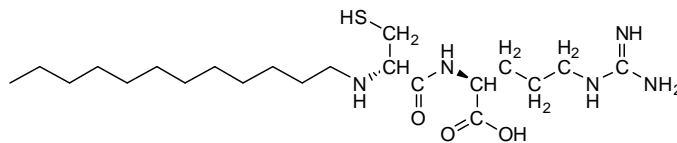
3.1.1 Diseño y caracterización del vector

Los agentes que hemos llamado RCC12, RCC10 y HCC10 han sido diseñados en nuestro laboratorio, y sintetizados por encargo en un laboratorio comercial de síntesis de péptidos. El patrón de diseño básico consiste en una “cabeza” polar y una “cola” hidrofóbica hidrocarbonada. La cabeza polar contiene las dos funciones químicas esenciales: un grupo tiol (para que los vectores puedan reaccionar entre sí y formar un dímero), y un grupo ionizable positivamente cargado bajo las condiciones de pH necesarias para que el ADN se encuentre con sus grupos fosfato ionizados (de forma que se verifique la unión por interacción electrostática entre el ADN y el agente). Tales funciones se obtienen mediante un dipéptido Arg-Cys (en los agentes RCC10 y RCC12) o His-Cys (en el agente HCC10). Al tratarse de un dipéptido, es menos probable que presente toxicidad, frente a otras estructuras químicas similares que pudieran diseñarse. Unida al dipéptido se encuentra una “cola” hidrofóbica hidrocarbonada de 10 carbonos ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9-$) para los agentes RCC10 y HCC10, o de 12 carbonos ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}-$) en el caso del agente RCC12. Para nombrar estos agentes, hemos utilizado el código de letras de los aminoácidos que componen la cabeza polar (R: Arginina, H: Histidina, C: Cisteína), y la extensión de la cola hidrocarbonada, que hemos abreviado como C10 o C12. Los vectores RCC12 y HCC10 poseen una estructura química similar al RCC10, diferenciándose únicamente en la longitud de la cola hidrocarbonada, más larga en el RCC12, y el aminoácido inicial que es la Histidina en lugar de la Arginina en el HCC10.

El vector RCC10 se compone de una cabeza polar formada por un dipéptido Arg-Cys y una cola hidrofóbica hidrocarbonada de 10 carbonos (figura 4).

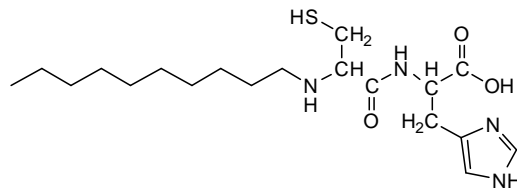


(S)-2-((S)-2-(decylamino)-3-mercaptopropanamido)-5-guanidinopentanoic acid



(S)-2-((S)-2-(dodecylamino)-3-mercaptopropanamido)-5-guanidinopentanoic acid

Figura 4. Estructura química de los agentes (1) RCC10 (H-Arg-Cys-NH-decyl), y (2) RCC12 (H-Arg-Cys-NH-dodecyl) y HCC10 (H-His-Cys-NH-decyl).



2-(2-(decylamino)-3-mercaptopropanamido)-3-(1H-imidazol-4-yl)propanoic acid

Figura 5. Estructura química del agente HCC10 (H-His-Cys-NH-decyl).

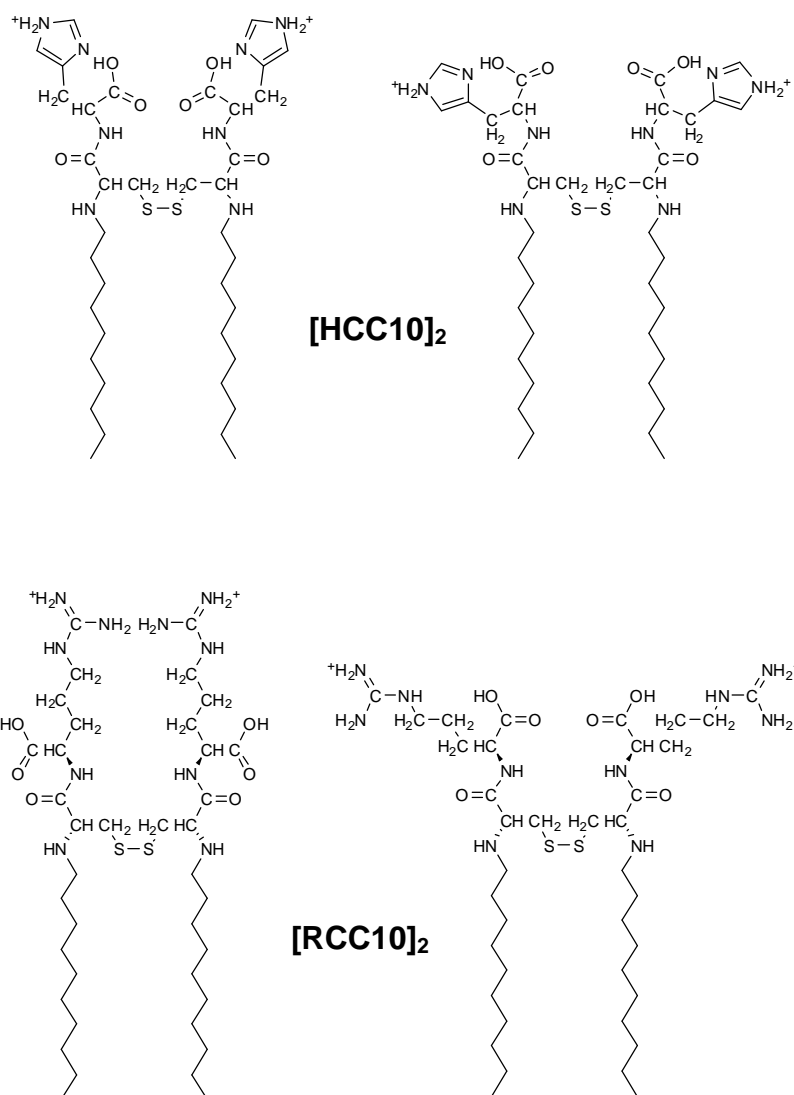


Figura 6. Estructura química de los dímeros de los agentes RCC10 y HCC10 en su forma iónica. La figura muestra dos posibles estados conformacionales de los dímeros de HCC10 (a) y RCC10 (b). En ambos casos, la distancia intermolecular entre

los grupos positivamente cargados que interaccionarán con el ADN puede variar significativamente, en función de la libre rotación de los enlaces simples.

En las condiciones de pH de trabajo habitual (7.3), el nitrógeno del grupo guanidinio de la Arginina se encuentra protonado y está favorecida la oxidación del grupo tiol de la Cisteína. La protonación del residuo de Arginina permite la interacción con los grupos fosfatos negativamente cargados del ADN. Los tioles de dos monómeros próximos de RCC10, unidos iónicamente al ADN, pueden reaccionar entre sí en condiciones favorables a la oxidación y formar un puente de cistina, lo cual origina un dímero de RCC10 que permanece unido al ADN por interacción entre cargas eléctricas. Para garantizar la formación del complejo según este mecanismo, es esencial que el RCC10 se encuentre a una concentración inferior a su concentración micelar crítica (cmc). Si la concentración es superior a la cmc, el agente RCC10 se encuentra en forma de micelas, de manera que los grupos tiol de monómeros próximos en la micela reaccionarían entre sí para formar el dímero.

Estructura, preparación y propiedades del vector RCC10. Químicamente, el vector está constituido por un dipéptido Cisteína-Arginina unido a una molécula lineal de hexadecano. El aminoácido Arginina se ha seleccionado por que posee un grupo guanidinio que, cuando se encuentra protonado, es conocido que se une fuertemente al ADN por sus grupos fosfato negativamente cargados, mediante enlace iónico. El residuo de Cisteína proporciona en cambio la función tiol necesaria para la formación de un puente disulfuro con otra molécula de RCC10. El RCC10 como tal, es decir, en forma monomérica, tiene propiedades de solubilidad de tensioactivo; pero en forma dimérica es un lípido. Por lo tanto, cuando se encuentra en condiciones adecuadas que favorecen la formación de puentes disulfuro (pH básico, presencia de oxígeno) el vector dimeriza aumentando su hidrofobicidad y pasando a tener propiedades

de solubilidad de lípido. Para su conservación, el vector debe almacenarse en condiciones que eviten la oxidación del grupo tiol (muy inestable): el vector se almacena a -80 °C en forma sólida o bien disuelto en etanol absoluto acidificado con HCl y libre de oxígeno (eliminado mediante burbujeo de Nitrógeno durante 30 minutos). Sin embargo, en el momento de uso, se favorece la oxidación de los tioles mediante el uso de un tampón oxigenado y ligeramente básico (tampón HEPES pH 7.4 que se ha sometido a 3 ciclos de saturación con oxígeno).

Para la preparación del complejo plásmido-vector, el vector es inyectado lentamente desde una solución stock concentrada 6mM en una solución de plásmido 0,02 µg de ADN/µl en tampón HEPES 15 mM pH 7.3 saturado con oxígeno y bajo constante agitación. En estas condiciones, el grupo guanidinio de la Arg se encuentra protonado, y está favorecida la oxidación del grupo tiol, por lo que se verifica la unión al ADN y formación de los puentes disulfuro entre los RCC10 adyacentes unidos al plásmido.

Determinación de la concentración micelar crítica (cmc) de los agentes RCC10 y RCC12. Existen diferentes técnicas para medir la cmc de un tensioactivo (balanza de Langmuir, etc.). De entre ellas, las más sensibles son las basadas en el uso de sondas fluorescentes. El fenómeno de formación de micelas es detectado por un aumento en la fluorescencia de una sonda apolar en solución que emite una fluorescencia más intensa cuando se encuentra en un ambiente hidrofóbico, como el interior de la micela, respecto a la fluorescencia que posee en el medio acuoso. Las sondas adecuadas para medir la cmc deben poseer una diferencia acusada entre la fluorescencia emitida en ambiente acuoso y la emitida cuando se encuentran internalizadas en el núcleo micelar (sólo así es factible utilizarlas a baja concentración). De esta forma, la posible alteración sobre el fenómeno de formación de micelas por la presencia de la sonda es mínima, porque unas pocas moléculas internalizadas en la micela bastan para conseguir una intensa emisión de

fluorescencia.

La sonda NPN es una molécula de naturaleza predominantemente hidrofóbica, aunque se disuelve en cierta medida en soluciones acuosas. Cuando se encuentra en un ambiente apolar, tal como el interior hidrofóbico de una micela, el rendimiento cuántico aumenta 10 veces y se desplaza hacia el azul el máximo de absorción. Si aumentamos progresivamente la concentración de RCC10 en una solución que contiene NPN, en el momento en que se verifique la formación de micelas la sonda en solución se introducirá en el interior apolar de las micelas recién formadas, y aumentará la emisión fluorescente.

La concentración mínima de trabajo de NPN necesaria para su uso en la determinación de la cmc es muy baja, 10^{-6} Molar, pero permite determinar valores de cmc de entre 10^{-2} y 10^{-5} molar (Brito, R. M. and W. L. Vaz;1986). Por esta la razón, se seleccionó esta sonda de entre la amplia variedad de moléculas fluorescentes similares disponibles para su uso con el vector RCC10, puesto que la muy baja concentración de moléculas de NPN es una ventaja en cuanto a una perturbación mínima del sistema, evitando la introducción de artefactos. Para evitar la oxidación del RCC10 durante la medida, la solución también contiene el agente reductor DTT, a baja concentración (1mM), suficiente para evitar la oxidación pero produciendo asimismo una mínima perturbación del sistema.

La cmc calculada es aproximadamente 1100 μ M (figura 7). Estos valores fueron tenidos en cuenta para establecer las concentraciones de trabajo que hemos utilizado en las posteriores experiencias. La cmc se determina a partir de la intersección entre las tangentes de la línea basal con la zona ascendente de la curva, en una representación semilogarítmica de la fluorescencia con la concentración del tensioactivo. En el momento en que, al ir aumentando la concentración del RCC10 en solución, se produce la formación de micelas, hay un aumento brusco en la

fluorescencia debido al reparto del NPN entre el medio acuoso y el interior apolar del core micelar. La sonda NPN se encuentra a una concentración $10^{-6} \mu\text{M}$.

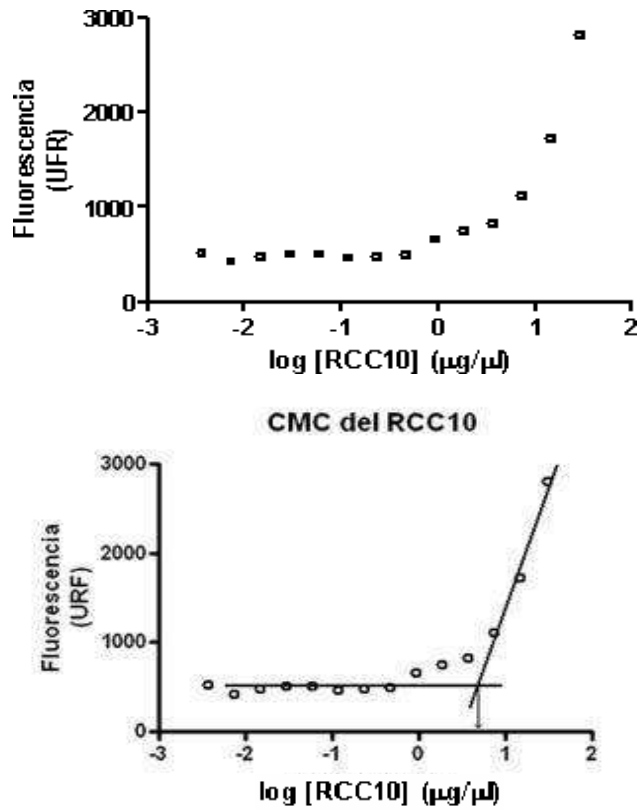


Figura 7. Determinación de la concentración micelar crítica (cmc) del vector RCC10 por fluorescencia con la sonda NPN. En el punto en que la concentración del RCC10 en solución es lo suficientemente elevada para que se produzca la formación de micelas, hay un aumento brusco en la fluorescencia debido a la internalización de la sonda fluorescente en el interior apolar del núcleo micelar, lo que provoca un aumento en la intensidad de emisión fluorescente del NPN. La cmc se determina a partir de la intersección

entre las tangentes de la línea basal con la zona ascendente de la curva de fluorescencia del NPN en representación semilogarítmica respecto de la concentración del RCC10, obteniéndose un valor de 1100 μM . Los datos representados son las medias de duplicados.

La cmc del RCC12 no fue posible determinarla, ya que esta molécula tiene una solubilidad muy escasa y probablemente precipita en solución acuosa antes de alcanzar una concentración suficiente para que se produzca la reorganización en micelas. La cmc del HCC10 no se determinó, ya que la medida de la cmc por fluorescencia requiere el consumo de una gran cantidad de reactivo, y la formación de los complejos HCC10/ADN fue caracterizada por otra técnica desarrollada posteriormente en nuestro laboratorio.

Caracterización electroforética de la formación del complejo plásmido-RCC10. Un ensayo habitual para demostrar la interacción entre el ADN y otra molécula o agente es el *ensayo de retención en gel*, en el que la formación de un complejo o de agregados, impide o retarda la migración electroforética del ADN. El efecto de retención en el gel de agarosa de un plásmido tratado con el vector RCC10 se utiliza en la siguiente experiencia para demostrar la interacción entre ambos. Asimismo, para demostrar a su vez que el efecto de retención está relacionado con la naturaleza lipídica del agente dimerizado, y con la formación de puentes disulfuro (tal como postula el mecanismo de formación propuesto), realizamos una electroforesis de retardo en gel del complejo RCC10/ADN (figura 8) en la que se demuestra que el plásmido en el complejo retenido en el pocillo es "liberado", permitiendo su migración electroforética, bien mediante la adición de un detergente (SDS, que solubiliza los lípidos) o bien de un agente reductor (DTT, que rompe los puentes disulfuro formados entre los grupos tiol del RCC10).

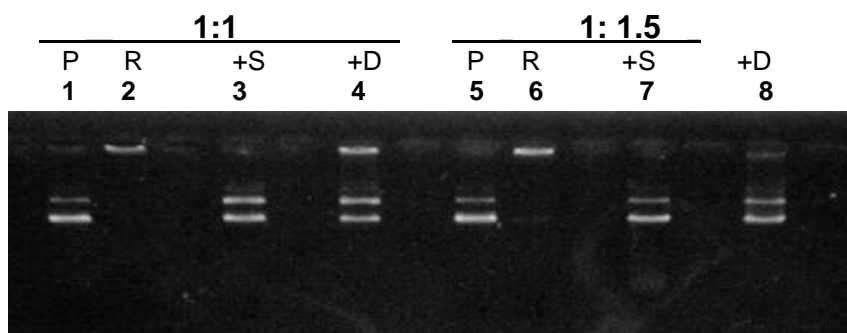


Figura 8. Demostración por electroforesis de retardo en gel de la formación del complejo RCC10/ADN. El complejo plásmido-vector es desestructurado con el detergente SDS o el agente reductor DTT (que rompe los puentes disulfuro del complejo) para liberar el ADN plasmídico. Las muestras se prepararon a 2 relaciones molares en carga RCC10:ADN de 1:1 y 1:1.5.

- (1) plásmido libre control
 - (2) plásmido + RCC10
 - (3) plásmido + RCC10 + SDS
 - (4) plásmido + RCC10 + DTT
- relación en
carga 1:1
- (5) plásmido libre control
 - (6) plásmido + RCC10
 - (7) plásmido + RCC10 + SDS
 - (8) plásmido + RCC10 + DTT
- relación en
carga 1:1.5

Abreviaturas: P (plásmido), R (RCC10), +S (adición de SDS), +D (adición de DTT)

Se han dejado calles de separación entre las muestras tratadas con SDS o DTT para evitar posibles efectos de contaminación de las muestras contiguas debido a la difusión de estas sustancias. El complejo se preparó a una relación

RCC10:ADN en carga de 1 (carreras 1 a 4) o de 1.5 (carreras 5 a 8).

La relación en carga es una forma habitual de describir la proporción en la que intervienen el ADN y un agente con el que interacciona iónicamente, y su significado *es moles de cargas positivas aportados por el agente* (el RCC10 en nuestro caso, que proporciona una carga positiva por cada molécula, en nuestras condiciones de pH) *frente a moles de carga negativa aportados por los grupos fosfato negativamente cargados del plásmido*.

Como muestra la figura 8, se produce la migración electroforética de las muestras de *plásmido+RCC10* sólo cuando es tratado con el detergente (carreras 3 y 7) o el agente reductor (carreras 4 y 8), para ambas relaciones en carga.

Ensayos de protección del complejo frente a la degradación en suero de ratón. La protección de un plásmido frente a enzimas nucleasas degradativas presentes en el suero o plasma es una experiencia clásica que apoya la formación del complejo con el plásmido, y demuestra que el vector ofrece la posibilidad de proteger frente a la degradación por las enzimas del suero en caso de ser administrado por vía sistémica.

En una amplia serie de experiencias, en las que se variaba tanto la proporción de SBF (entre 10-50 %) como el tiempo de incubación a 37°C (15 min - 2 horas), los complejos no mostraron una suficiente protección, ya que el plásmido constituyente aparecía completamente degradado (datos no mostrados).

De entre todas las combinaciones de tiempos y proporciones de SBF probadas, las condiciones mostradas en la figura 9 (5% SBF y 1 hora de degradación) fueron las únicas en las

que la diferencia en la degradación del ADN del *complejo* respecto al *plásmido solo control* se mostraba claramente.

El experimento se ha realizado mediante incubación con 5% de suero bovino fetal (SBF) a 37°C durante 1 hora, analizando el ADN posteriormente por electroforesis en gel de agarosa.

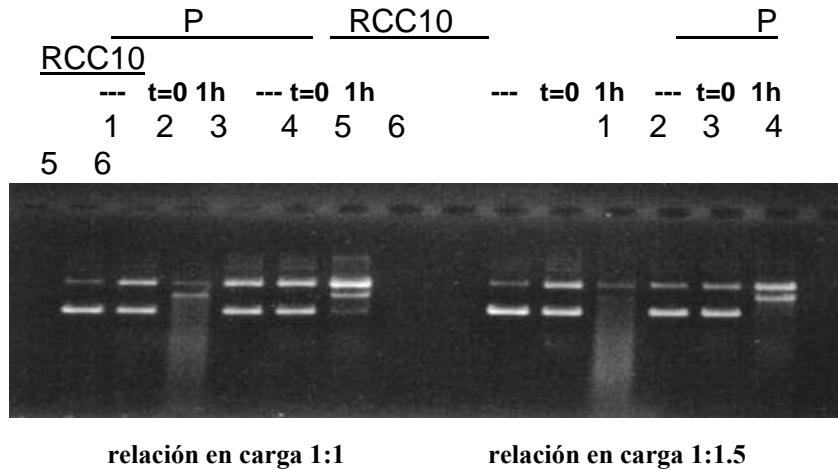


Figura 9. Protección ofrecida por el complejo RCC10/ADN frente a la degradación del plásmido por enzimas nucleasas presentes en suero bovino fetal.

La electroforesis muestra que el complejo RCC10/ADN es capaz de proteger el plásmido de la degradación por las nucleasas séricas, bajo estas condiciones experimentales.

- (1) plásmido libre control + Triton X-100
- (2) plásmido libre + 5% SBF a tiempo cero
- (3) plásmido libre + 5% SBF a 37° C x 1 hora
- (4) RCC10/ADN + Triton X-100
- (5) RCC10/ADN + Triton X-100 + 5% suero a tiempo cero
- (6) RCC10/ADN + Triton X-100 + 5% suero a 37° C x 1 h

El bloque de la derecha corresponde a muestras preparadas a una relación en carga de 1.5, mientras que el de la izquierda son muestras preparadas a una relación en carga de 1.

3.1.2 Preparación de complejos en frío

Los complejos ADN-RCC10 quedan retenidos en el pocillo en los ensayos de electroforesis en gel de agarosa, manifestando que son agregados grandes (lo cual se confirmó después por los estudios de microscopía electrónica del vector, en los que el complejo aparece como una población muy heterogénea de partículas de diferente diámetro, en el rango de nanómetros a micras). Este resultado invalida el propósito del vector tal como fue concebido, pues el diseño del agente RCC10 pretendía una molécula capaz de inducir el colapso monomolecular del plásmido portador de un gen terapéutico, resultando una partícula pequeña apta para uso por vía sistémica. Los complejos o agregados grandes no sirven a este propósito, desde que no pueden superar la barrera capilar, y por tanto no son aptos para su uso en terapia génica sistémica *in vivo*.

Con objeto de conseguir los complejos monomoleculares de pADN buscados, se consideraron varias modificaciones del protocolo de preparación. La hipótesis de la que partimos para diseñar modificaciones del protocolo fue que el fracaso en la obtención del colapso monomolecular se debía a que el agente RCC10 se oxidaba demasiado rápidamente tras su unión al ADN. Con lo cual las partículas se estructurarían “desordenadamente”, no formándose una estructura final con las colas hidrofóbicas dirigidas al interior, sino que se orientaban en direcciones azarosas, con lo cual el sistema tendía a agregar en partículas grandes para estabilizarse energéticamente evitando el contacto de las colas hidrofóbicas con el medio acuoso. Por tanto, las experiencias se dirigieron a evitar la temprana oxidación del RCC10 una vez unido al plásmido, y solo cuando las colas hidrofóbicas se hubiesen dispuesto en dominios pseudomicelares internos

formándose una partícula de plásmido compactado con la estructura “correcta”, que solo entonces se verificase la formación de los dímeros por reacción de los monómeros de RCC10 que hubiesen situado próximos en esta estructura.

Por ejemplo, en una serie de experiencias preliminares, el plásmido se adicionaba del agente RCC10 pero en presencia del agente reductor DTT (para evitar la formación de los puentes disulfuro), y la mezcla se sometía a diálisis para eliminar lentamente el DTT y permitir la formación de los dímeros una vez se hubiesen estructurado correctamente las partículas. Estas experiencias no condujeron a resultados positivos (datos no mostrados).

Otra serie de experiencias, dirigidas a lograr una estructuración correcta de las partículas con las colas hidrofóbicas orientadas hacia el interior, consistían en la técnica de preparación que llamamos "*en frío*". En ella, el complejo se prepara según el protocolo habitual pero enfriando previamente a 4°C todos los reactivos y manteniendo esta baja temperatura durante todo el proceso de oxidación del vector. La idea subyacente es que a temperatura inferior se conseguiría una menor agitación cinética de las colas hidrofóbicas, que favorecería la estructuración en los dominios pseudomicelares internos; y una disminución en la velocidad de reacción de los grupos tiol próximos para formar los dímeros. Este procedimiento si condujo a un resultado positivo, como muestra la figura 10 (calle 2), en la que aparece la banda del complejo con RCC10 desplazada respecto a la del plásmido libre control.

La electroforesis compara los complejos formados según el método original de preparación (que pasamos a llamar “*a temperatura ambiente*” (TA)) y el nuevo método "*en frío*". Los complejos preparados a TA quedan retenidos en el pocillo (calle 3), mientras que los formados en frío producen una banda de migración electroforética que supera a la del plásmido libre (calle 2). El tratamiento con el agente reductor DTT (calles 5 y 6, respectivamente) demuestra que estos

complejos dependen específicamente del enlace disulfuro (único enlace redox formable entre el RCC10 y el pADN); asimismo la reacción de reducción es más completa en el caso de los complejos en frío (5) que en los TA (6). Lo cual se relaciona con que los complejos TA sean agregados grandes, y el agente reductor DTT tiene dificultades para difundir a las zonas más internas de estos complejos. La incubación con suero asimismo mostró que los nuevos complejos *en frío* también ofrecían una mayor protección del plásmido frente a la degradación por las enzimas séricas.

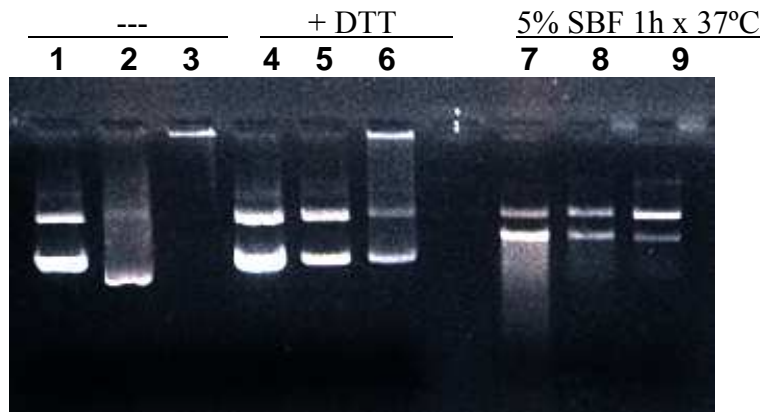


Figura 10. Caracterización de la formación del complejo RCC10/pIL-4. Carreras 1, 2 y 3: plásmido solo, complejo RCC10/pIL-4 en frío y complejo RCC10/pIL-4 a T^a ambiente, respectivamente. Carreras 4, 5 y 6: igual que 1, 2 y 3 pero con adición del agente reductor de grupos disulfuro ditioneitol (DTT). Carreras 7, 8 y 9: igual que 1, 2 y 3 pero incubados 1 hora a 37°C en SBF 5%.

En el vector RCC10, el resultado se reproducía en todos los diferentes plásmidos y variedad de condiciones ensayadas: en todos los casos el método en frío producía una banda de migración adelantada con distintos plásmidos y relaciones N/P en torno a 1. A relaciones inferiores a N/P= 0,8 el

complejo no se formaba por ninguno de los dos métodos (datos no mostrados). La formación a temperatura ambiente parece ser menos reproducible (figura 11): en ocasiones la fluorescencia no queda retenida totalmente en el pocillo (carrera 1) como sería de esperar; sin embargo en la carrera 7 sí se observa la retención total de la fluorescencia en el pocillo, que es el resultado más característico. La falta de reproducibilidad puede estar relacionada con que estos complejos se preparen a temperatura ambiente, con lo que la temperatura puede variar en unos pocos grados en los diferentes experimentos, según la temperatura ambiente del laboratorio en el momento de su preparación.

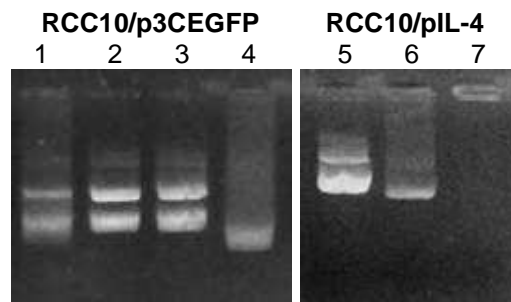


Figura 11. Preparación del complejo RCC10 con dos plásmidos diferentes (p3CEGFP y pIL-4) por los métodos frío y caliente. A la izquierda: el complejo RCC10/p3CEGFP preparado a temperatura ambiente (1) y plásmido solo control (2); o y el correspondiente plásmido solo control en frío (3) y el complejo preparado según el método en frío (4). Se observa en la carrera 1 que el complejo a temperatura ambiente no se ha formado, pues aparece una banda de migración de plásmido libre. A la derecha: plásmido solo (5), complejo RCC10/pIL-4 preparado por el método en frío (6) y complejo RCC10/pIL-4 preparado a temperatura ambiente (7). Todos los complejos se prepararon usando los mismos stocks de soluciones de RCC10 y plásmido, a relación en carga N/P=1.2.

En el caso de los vectores HCC10, el método en frío aparentemente no producía el complejo monomolecular deseado. Múltiples experiencias mostraban que no había diferencias patentes en la migración electroforética entre los plásmidos solos y los adicionados de HCC10, por lo que el complejo, al parecer, no se formaba.

Dado que en ocasiones se observa una falta de reproducibilidad al formar el complejo con el RCC10 (ver figura 11, carrera 1), es importante utilizar un control positivo. La figura 12 muestra una preparación simultánea de los complejos RCC10 y HCC10 con el plásmido p3CEGFP, en una electroforesis realizada manteniendo idénticas condiciones experimentales de preparación para ambos (mismos stocks de tampones y plásmido para ambos complejos, que fueron preparados a la vez y cargados en el mismo gel).

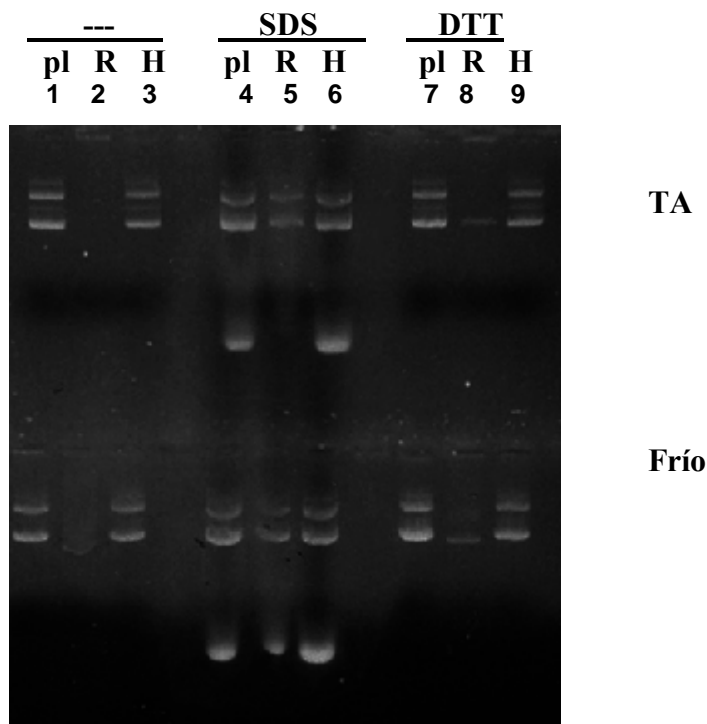


Figura 12. Caracterización de complejos preparados con los agentes RCC10 y HCC10 por los métodos frío y caliente, a relación N/P=1. Electroforesis superior: plásmido solo control, complejo RCC10/p3C-EGFP y complejo HCC10/p3C-EGFP preparados a TA, solos (1, 2 y 3 respectivamente), tratados con SDS (4, 5 y 6) o con DTT (7, 8 y 9) respectivamente. Electroforesis inferior: igual que los superiores pero preparados con el método *en frío*. Las bandas que se observan más adelantadas, en posición central y tanto arriba como debajo, corresponden a micelas del detergente SDS.

El complejo con RCC10 (carrera nº 2) se forma tanto a TA (quedando retenido en el pocillo) como en frío (apareciendo una banda de migración adelantada), pero no en el HCC10, en el que aparece como una banda de movilidad

electroforética similar a la del plásmido libre en ambos casos (calle nº 3).

Esta figura fue interpretada como evidencia de la no formación (aparente, como veremos más adelante) de los complejos con el HCC10, ya que el complejo RCC10 sí se haya formado representa una suerte de "control positivo" frente a la no reproducibilidad que se observa en ocasiones en las experiencias con estos agentes. El detergente SDS disuelve los lípidos y el agente reductor DTT deshace los puentes disulfuro que hayan podido formarse entre las moléculas de RCC10 o HCC10.

3.1.3 Microscopía electrónica de transmisión del complejo preparado en frío y a T^a ambiente

Los complejos RCC10-plásmido preparados con el plásmido p3cEGFP fueron examinados por microscopía electrónica de transmisión. Las microfotografías muestran una población homogénea de partículas de pequeño tamaño, de diámetro entre 30 y 50 nm, con un diámetro medio de unos 40 nm, que no aparece en las correspondientes microfotografías del control del plásmido p3cEGFP sólo (no mostradas), y que es coherente en tamaño con el colapso monomolecular esperado del plásmido.

Estas partículas constituyen una sólida evidencia de que la compactación monomolecular del ADN ha tenido lugar, de acuerdo con el mecanismo hipotético propuesto para el vector.

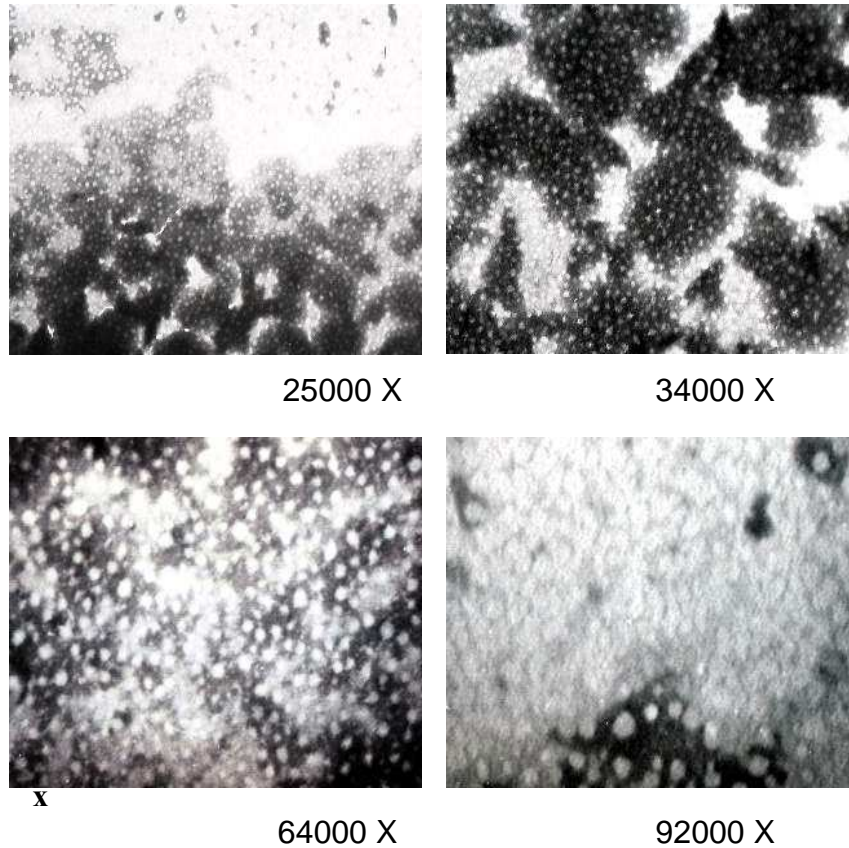


Figura 13. Microscopía electrónica de complejos RCC10/pADN preparados según el método en frío. Las microfotografías muestra la presencia de una población muy homogénea de partículas de pequeño tamaño (alrededor de 40 nm), que concuerdan con el tamaño del complejo monomolecular esperado. El tratamiento con ácido fosfotúngstico proporciona una tinción negativa, apareciendo las muestras (que han excluido el agente de tinción) de color claro sobre fondo oscuro.

El color blanco de estas partículas indica que no han incorporado el agente de tinción (ácido fosfotúngstico) por lo

que aparecen claras sobre fondo oscuro, y se trata de una tinción negativa (ver figura 13).

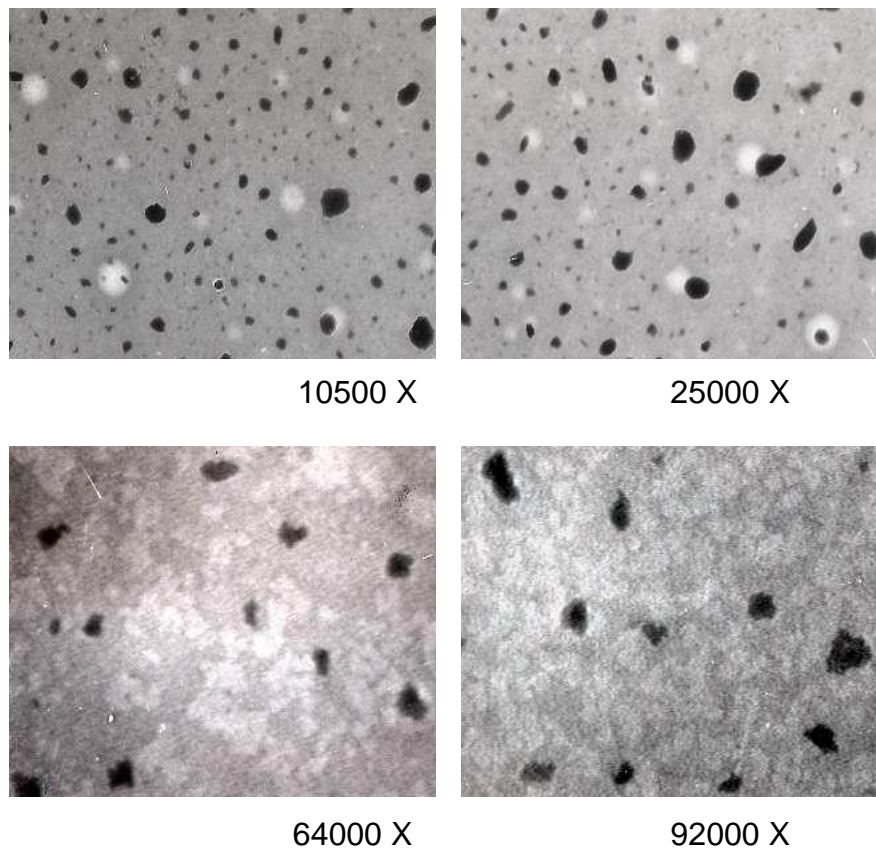


Figura 14. Microscopía electrónica de complejos RCC10-pADN preparados a temperatura ambiente (método “caliente”). Las microfotografías muestra la presencia de una población heterogénea en tamaños de partículas RCC10-pADN, de las cuales las más pequeñas concuerdan con el tamaño del complejo monomolecular esperado. El tratamiento con ácido fosfotúngstico proporciona una tinción negativa, apareciendo las muestras que han incorporado el agente de tinción con color oscuro sobre fondo claro.

Dado que el agente de tinción es soluble en agua, se puede relacionar con un interior hidrofóbico de las partículas, capaz de excluir el agente de tinción hidrosoluble, lo que concuerda con la estructura propuesta según el mecanismo de formación hipotetizado para el agente RCC10: un núcleo hidrofóbico constituido por las colas hidrocarbonadas orientadas hacia el interior y estructuradas en dominios hidrofóbicos internos semejantes a los de una micela.

Por el contrario, los complejos con el RCC10 preparados a temperatura ambiente (figura 14) muestran una población de partículas muy heterogénea. Son partículas que aparecen intensamente teñidas y con una población de tamaños muy variada, en un rango de nanómetros a micras. Este resultado se correlaciona con el efecto de retención en el pocillo que observábamos en las electroforesis para los complejos preparados a temperatura ambiente: son partículas excesivamente grandes para migrar a través del poro del gel de agarosa (cuyo límite se sitúa en unos 100nm), compuestas seguramente por múltiples unidades de plásmido agregadas por medio del agente RCC10.

3.1.4 Demostración de la formación del complejo con el vector HCC10 y preparación del complejo con plásmidos de alto peso molecular

Las experiencias anteriores muestran un aparente fracaso en la formación del complejo por el vector HCC10, tanto a temperatura ambiente como en el método de preparación en frío. Una posible razón se encuentra en el diferente pKa del grupo imidazol protonable de la Histidina del HCC10 (pKa ~ 6) respecto al grupo guanidinio de la Arginina del RCC10 (pKa ~ 9). Al pH neutro de trabajo habitual, el grupo amino de la arginina debe encontrarse completamente protonado, ya que su pKa está unas dos unidades por encima del pH de trabajo. En cambio, la Histidina tiene un pKa próximo al pH de trabajo, y cabe esperar que solo esté parcialmente

protonada. Esto podría explicar la no formación del complejo con el plásmido, desde que la interacción primaria ADN-vector es de tipo iónico, entre las cargas negativas de los grupos fosfato y los grupos amino positivamente cargados del agente HCC10.

Por esta razón, se realizaron una serie de experiencias en las que se variaba el pH de preparación del complejo HCC10/ADN en un rango de varios pH ácidos de entre 3 y 5.75. El bromuro de etidio presente en el gel de agarosa es capaz de revelar por fluorescencia la localización del ADN en el gel bajo iluminación ultravioleta en un transiluminador.

Los resultados no son concluyentes, desde que no se observa ninguna banda de migración adelantada respecto al plásmido libre control, como en el caso de los vectores RCC10. Las bandas del plásmido desaparecen casi completamente a pH 3 y 3.5, tanto en la preparación TA a NP/=1 como en la NP/=2 en frío, pero no en la NP/=1 en frío. De la misma manera, la preparación a pH 4.5 produce la casi desaparición de las bandas en N/P=1 a TA y la desaparición total en la NP/=2 en frío, pero no en la NP/=1 en frío. Una posible interpretación de que los resultados vayan parejos en este rango de pH en el complejo a TA y en el del frío a N/P=2 (cuando la relación molar vector/plásmido es del doble) es que esté relacionado con la cinética de la reacción química plásmido-vector. De manera que el efecto desfavorecedor de la baja temperatura se compense con una doble concentración de reactivo.

En la figura 15 de la página siguiente, se muestra la caracterización de la formación del complejo HCC10/p3C-EGFP preparado a diferentes pH ácidos. (3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 5.75) y por el método en frío o a TA. La electroforesis superior muestra el complejo a temperatura ambiente (TA) y N/P=1. La electroforesis central, el complejo preparado en frío y a N/P=1. La electroforesis inferior, el complejo preparado en frío y a N/P= 2

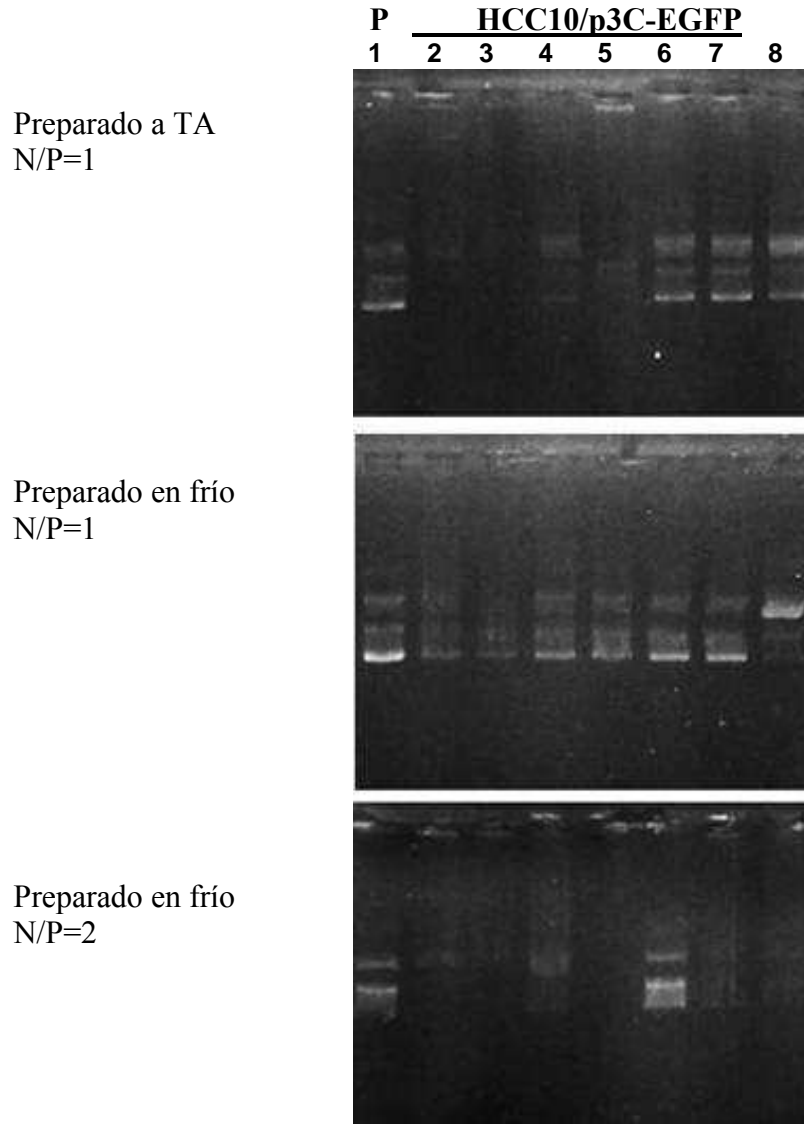


Figura 15. Caracterización de la formación del complejo HCC10/p3C-EGFP preparado a diferentes pH ácidos, y con la preparación en frío o TA a relación en carga N/P de 1 o 2. Plásmido solo control (1) o complejo HCC10/p3C-EGFP preparado a pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 5.75 (2 a 8, respectivamente).

El pH 4.5 parece, de los ensayados, el que mejor resulta en la formación del complejo, ya que es el más cercano a pH 7 en el que se produce la desaparición de las bandas de fluorescencia del plásmido (pero el resultado no es concluyente). A pH 5 parece que el complejo no se forma en absoluto en ninguno de los tres casos, pero curiosamente a N/P=2 *en frío* de nuevo desaparece totalmente la fluorescencia a pH 5.5 y 5.75.

pH	N/P=1 a TA	N/P=1 en frío	N/P=2 en frío
3.0	*	*	*
3.5	—	*	*
4.0	**	****	**
4.5	*	****	—
5.0	****	****	****
5.5	****	****	*
5.75	****	****	*

Tabla 2: resultados de fluorescencia observados en las experiencias de preparación de complejos HCC10/pTG701 a diferentes pH

-: desaparición total de la fluorescencia respecto del plásmido control
 **** : fluorescencia no afectada por la presencia de HCC10

Por otro lado, también el RCC10 fallaba en la formación del complejo con un plásmido de alto peso molecular (pTG7101), tanto por el método frío como a TA. La banda de migración adelantada no era observada en el caso del pTG7101. Dado que el vector había demostrado ser capaz de

formar el complejo con una variedad de plásmidos distintos, todos ellos de tamaño "normal" (alrededor de 5 KD), la no formación estaría seguramente relacionada con el tamaño mayor de los plásmidos pTg7101 (alrededor de 15 KD).

Por ello, se hipotetizó que quizás este plásmido grande necesitase de una mayor concentración del vector que los plásmidos "medianos", para poder compactar el plásmido desplegado y que se verificase la formación del complejo monomolecular. Una serie de experiencias electroforéticas con el vector, preparado en relaciones molares N/P superiores a las habituales, no mostró sin embargo ningún resultado favorable, desde que los complejos permanecían retenidos en el pocillo o directamente no aparecía fluorescencia ni en el pocillo ni a lo largo del gel (datos no mostrados).

Un punto de vista diferente, era considerar que un plásmido de gran tamaño, necesitase por el contrario menos unidades de vector que un plásmido de longitud normal.

La idea era la siguiente: el colapso monomolecular, según el mecanismo hipotetizado, es inducido por la formación de dominios pseudomicelares entre las colas hidrofóbicas del vector, siendo este el paso importante y limitante. Un plásmido de longitud triple que la habitual podría tener suficientes "colas hidrofóbicas" para estructurar los dominios pseudomicelares con solo un tercio de sus grupos fosfato uniendo el vector, ya que este número de "colas" basta para estructurarlos en los plásmidos medianos. Por esta razón, se prepararon los complejos con RCC10 y HCC10 en un rango de relaciones de concentración molar N/P inferior a la unidad.

Este experimento sí rindió el resultado esperado para el RCC10, apareciendo bandas de migración adelantada tanto en los complejos fríos como a TA en las relaciones próximas a N/P= 0.5. De hecho, los complejos a TA parecían rendir mejor resultado, una población de partículas más homogénea,

desde que las bandas electroforéticas aparecían más definidas. No se encontró sin embargo una banda de migración adelantada en el caso del HCC10, en ninguna de las relaciones ensayadas.

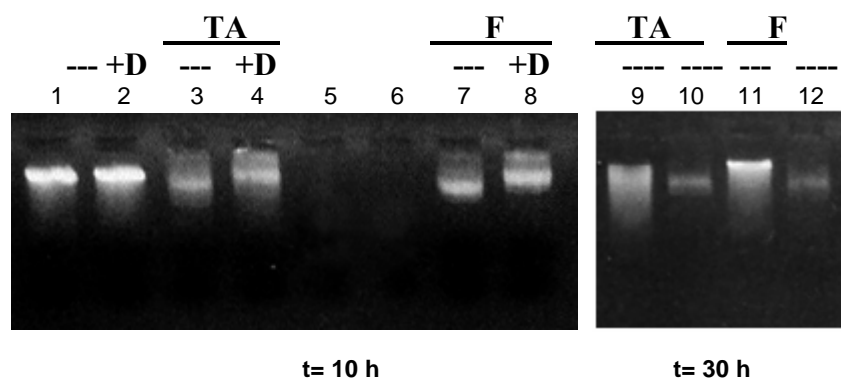


Figura 16. Caracterización de la formación del complejo con plásmidos grandes (RCC10/pTG7101) con los métodos frío y caliente a N/P=0,5. A la izquierda: plásmido pTG701 control solo o con DTT (1,2); complejo RCC10/pTG7101 preparado a temperatura ambiente (TA) solo o con DTT (3,4); o con el método frío, solo o con DTT (7,8) respectivamente, a las 10 horas desde su preparación. A la derecha: plásmido solo o complejo preparado a temperatura ambiente (9,10) y plásmido solo o complejo preparado con el método frío (11,12) respectivamente, a las 30 horas desde su preparación.

Abreviaturas: TA: temperatura ambiente; F: método en frío; +D: adición de DTT.

El tiempo de preparación durante el cual se verifica la oxidación y dimerización del vector, así como la relación molar de formación entre los dos componentes (descrita como relación molar N/P), son parámetros importantes en su formación, en particular el segundo.

En una serie de preparaciones con pTG7101 y RCC10 a distintas relaciones molares, la relación N/P= 0.5 muestra una banda de migración electroforética adelantada que se define perfectamente tras un tiempo de oxidación de unas 7 horas (ver figura 17).

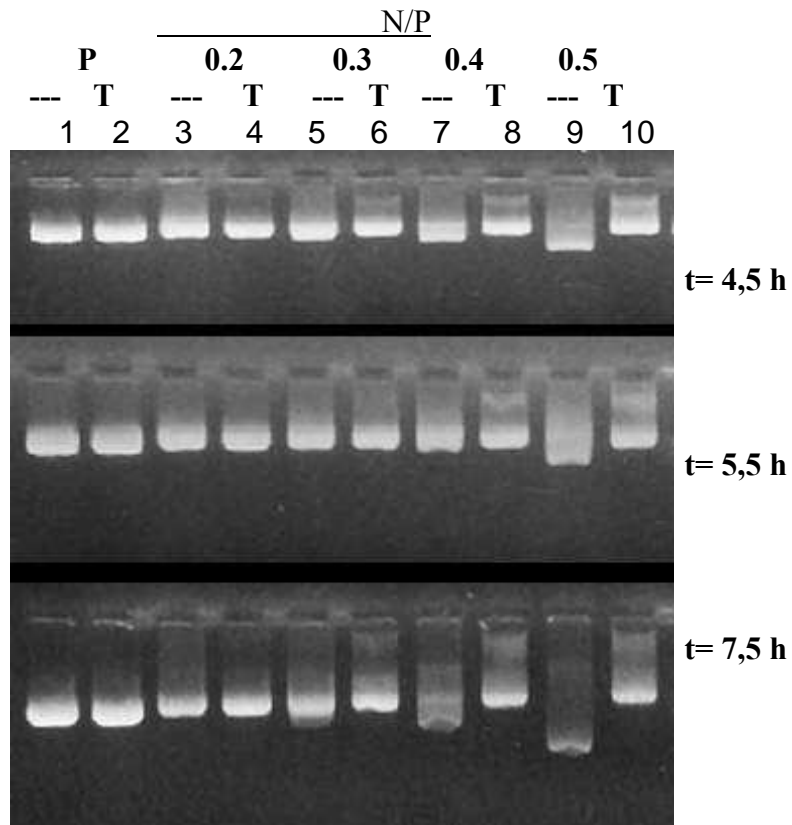


Figura 17. Preparación del complejo RCC10/pTG7101 a diferentes relaciones N/P (0.2-0.5) y a diferentes tiempos de oxidación. Las siguientes electroforesis muestran la relación N/P y el tiempo de oxidación del vector para una formación óptima (N/P=0,5 y t=7,5 h). Las muestras fueron cargadas en el gel a las 4,5h (arriba), 5,5h (centro) y 7,5h (abajo) desde su preparación. Plásmido pTG701 (calles 1 y 2) solo (1) o con TX100 (2); complejos RCC10/pTG7101

(calles 3 a 10) solos o con TX100 a N/P = 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. El complejo se preparó a T^a ambiente.

Las relaciones N/P 0.4 y 0.3 también dan lugar a una migración electroforética del ADN superior a la del plásmido libre, pero las bandas no están tan definidas ni tan desplazadas respecto al plásmido control como en la relación N/P= 0.5. Esto es indicativo de una población de partículas más heterogénea en tamaños y/o cargas, así como de un tamaño de partícula mayor. Probablemente se trate de complejos monomoleculares con un grado de compactación menor que los de N/P= 0.5, debido a un insuficiente número de moléculas de RCC10 en la solución.

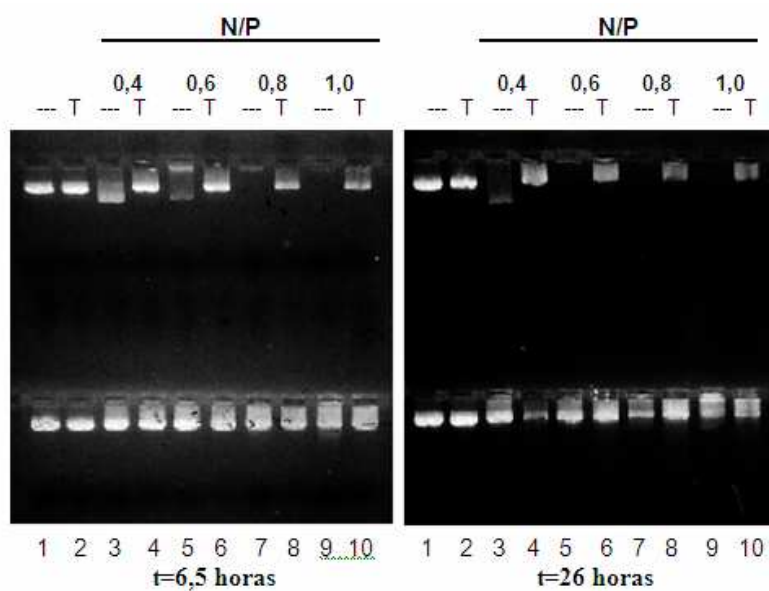


Figura 18. Caracterización de la formación del complejo con los agentes RCC10 o HCC10 y el plásmido pTG7101 a diferentes relaciones en carga N/P de 0.4 a 1.0. Electroforesis superiores: plásmido pTG7101 solo o con Triton X-100 (carreras 1 y 2); RCC10/pTG7101 solo o con

Triton X-100, a N/P de 0,4 (carreras 3 y 4), 0,6 (carreras 5 y 6); 0,8 (carreras 7 y 8); 1,0 (carreras 9 y 10). Electroforesis inferiores: igual que las superiores, pero con el agente HCC10. El tiempo de preparación del complejo fue de 6,5 horas en las electroforesis de la izquierda y de 26 horas en las de la derecha.

En la siguiente experiencia (figura 18), el complejo se preparó con los dos vectores, a un tiempo de oxidación típico (6.5 horas) y a un tiempo de oxidación largo, muy superior al habitual (26 horas), para comprobar si la no formación del vector HCC10, cuya cabeza polar (His-Cys) era distinta a la del RCC10 (Arg-Cys), se debía a que esta molécula requería un tiempo mayor de oxidación del agente. Como muestra la figura 18, se obtienen resultados positivos con el vector RCC10 a relaciones N/P 0.4 y 0.6, tanto en frío como a TA; pero no para el HCC10. La relación N/P=0.4 parece ser mejor que la 0.6 para el RCC10, desde que solo en esta se mantiene la banda adelantada a tiempo largo (26 horas). Los complejos formados a esta relación probablemente mantienen su "individualidad" con el tiempo, pero no en la 0.6 (ya que a tiempos largos aparece la fluorescencia en el pocillo, indicando la agregación de los complejos).

Seguimiento de la formación del complejo por fluorescencia con la sonda NPN. El fracaso de la demostración del complejo con el vector HCC10 por electroforesis no era concluyente respecto a la formación del complejo, ya que existía una posibilidad que no había sido considerada: que hubiese una coincidencia en las migraciones electroforéticas del complejo monomolecular y el plásmido libre. Este tipo de experiencias asumía que, si se formaba el complejo, se observaría una banda desplazada (bien adelantada, como ocurría en el RCC10; o tal vez retrasada respecto a la del plásmido libre). Ya que al interaccionar el agente HCC10 y el plásmido, el complejo resultante tendría distinto peso molecular, forma y potencial electrostático de superficie que el plásmido solo, migrando de forma diferente.

Pero ¿Y si la migración electroforética del complejo resultante coincidía con la del plásmido libre? En ese caso, la técnica electroforética no serviría, y resultaría necesaria otra estrategia para demostrar o descartar definitivamente la formación del complejo con el vector HCC10.

La nueva estrategia planteada consistiría en demostrar la formación del complejo con el HCC10 por fluorescencia, mediante una sonda fluorescente. La medida de la cmc mediante la sonda NPN se basaba en la propiedad de esta molécula de introducirse en ambientes hidrofóbicos cuando se encuentra en solución acuosa, aumentando grandemente su emisión fluorescente. La sonda NPN es poco hidrosoluble, prefiere ambientes apolares. Y, en el momento en que aparecen micelas en solución, se introduce en el interior hidrofóbico de estas, lo cual se traduce en un incremento acusado de la emisión fluorescente de la solución a 260nm.

Inspirado por la técnica de medida de la cmc por fluorescencia, un procedimiento similar pudo utilizarse para comprobar la aparición del complejo HCC10/ADN (la técnica es análoga, desde que estas partículas están constituidas por un núcleo hidrofóbico constituido por las colas hidrocarbonadas del HCC10 estructurando un dominio similar al de una micela).

La medida de la fluorescencia de la sonda NPN en las mezclas del agente HCC10 con el plásmido a diferentes relaciones N/P fue utilizada para detectar el punto preciso en que se formaban los complejos plásmido-vector (ver figura 19). El colapso monomolecular del plásmido tiene lugar, según el mecanismo de formación propuesto, cuando se forman los dominios pseudomicelares internos que estructuran el complejo. Es en este momento cuando la sonda NPN puede incorporarse a este ambiente hidrofóbico y delatar la formación del complejo.

De manera sencilla, puede describirse el fenómeno de compactación monomolecular del plásmido de la siguiente manera: a las relaciones N/P bajas, los agentes RCC10 y HCC10 se encuentran en equilibrio dinámico con el plásmido, del cual una fracción del agente está unida

mediante enlace iónico a algunos de los grupos fosfato negativos de las moléculas de plásmido “desplegadas”, y la otra fracción se encuentra libre. Cuando la relación N/P aumenta, aumenta el número de moléculas de RCC10 o HCC10 unidas al ADN. Hasta que hay tantas moléculas unidas al plásmido que sus colas hidrofóbicas interaccionan entre sí, estructurándose en un dominio pseudomicelar interno que compacta el plásmido en una partícula pequeña. Este fenómeno probablemente sea de tipo cooperativo, pues el dominio hidrofóbico recién formado favorecerá la incorporación de más moléculas del agente. A partir de aquí, el NPN se introduciría en el interior hidrofóbico de los complejos, aumentando la emisión fluorescente y adelantando su formación.

El experimento realizado para los dos vectores, a una concentración de sonda NPN de 10^{-4} M y en presencia de DTT para evitar la dimerización, muestra un salto de fluorescencia coincidente para ambos vectores, a una relación N/P aproximadamente de 0.5. Más aún, esta relación es coincidente con la que la técnica electroforética muestra que es a la que se forman los complejos con el vector RCC10 (N/P en el rango 0.4-0.6).

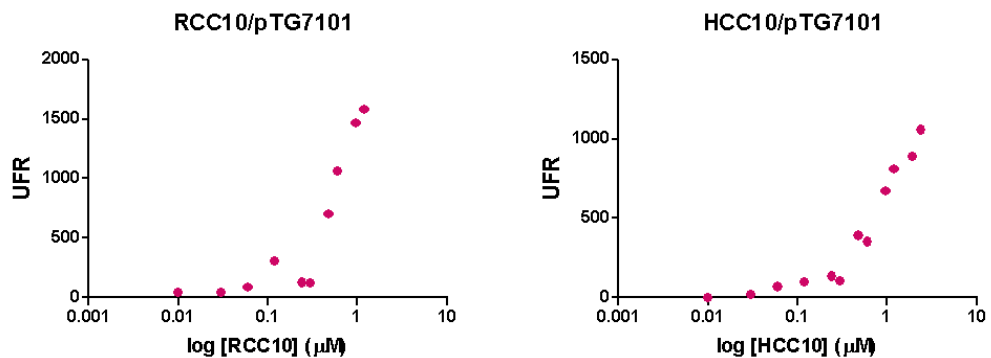


Figura 19. Seguimiento de la formación de los complejos de los agentes RCC10 y HCC10 con pTG7101 por fluorescencia con sonda NPN. Se adicionaron cantidades crecientes de agentes RCC10 y HCC10 sobre una solución de

plásmido a concentración constante, en presencia de la sonda fluorescente NPN y del agente reductor DTT. Cuando se forma el complejo, aparece un aumento brusco en la fluorescencia, debido a la internalización de la sonda NPN en el ambiente apolar que constituye el núcleo del complejo. El DTT evita la oxidación de los agentes RCC10 y HCC10.

Una experiencia idéntica con un plásmido pequeño, el p3cEGFP, y el RCC10 resultó en una curva similar, pero comenzando el salto de fluorescencia a una concentración del vector en relación N/P de aproximadamente 1. Esta relación es de nuevo coincidente con la que las experiencias electroforéticas muestran que son las relaciones de concentración que forman el complejo con plásmidos pequeños. En la figura 20 se comparan las curvas de fluorescencia con NPN para los 3 complejos.

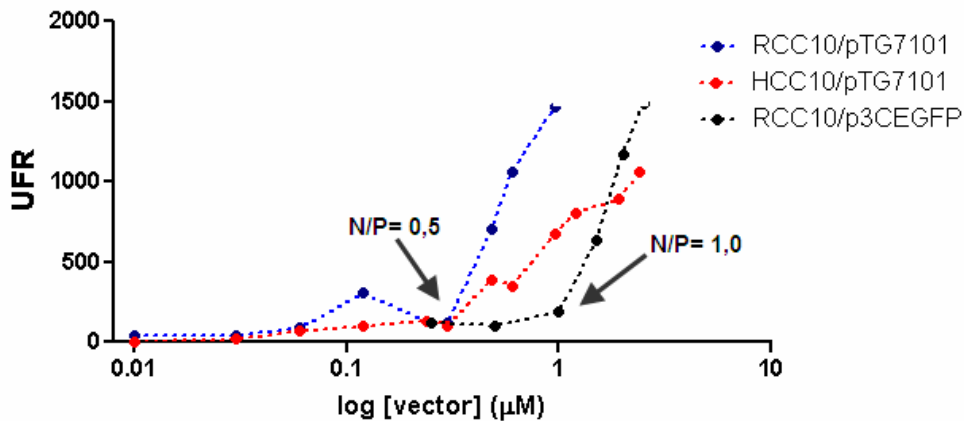


Figura 20. Comparación de las curvas de formación de complejos medidas por fluorescencia con la sonda NPN para un plásmido de alto peso molecular (pTG7101, de aproximadamente 18kDa) y el plásmido p3C-EGFP (5 kDa) . Las curvas muestran que la formación del complejo con el plásmido grande requiere una relación N/P de 0.5, tanto para el agente RCC10 como para el HCC10; mientras

que en un plásmido de peso molecular de 5KDa como es el p3C-EGFP es necesaria una mayor proporción de agente RCC10 (el complejo solo se forma cuando se alcanza una relación N/P de 1.0).

A la vista de estos resultados, un cuidadoso re-examen de las experiencias electroforéticas realizadas con las relaciones N/P en torno a 0.5 mostró que, en todos los casos, la banda de migración electroforética del vector HCC10 mostraba un ligerísimo retraso respecto de la del plásmido libre control. La diferencia es tan pequeña que había pasado desapercibida, pero a vista de los resultados anteriores con la sonda NPN, esta diferencia en la migración puede relacionarse con la formación del complejo HCC10/ADN.

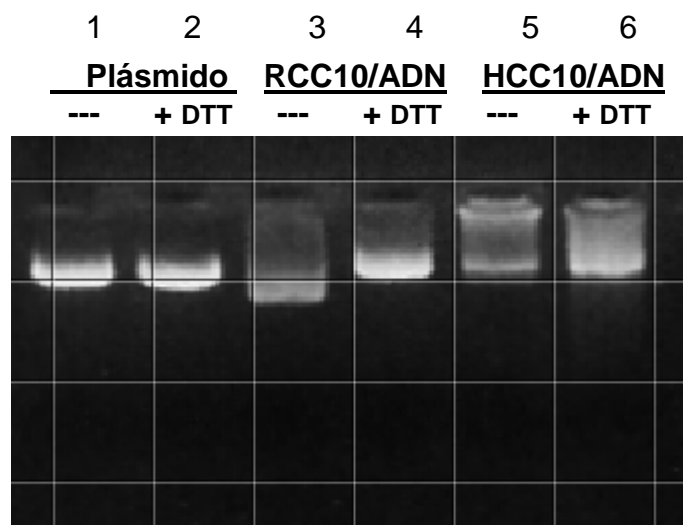


Figura 21. Preparación del complejo con RCC10 o HCC10 a N/P= 0.5. Plásmido pTG7101 solo o con DTT (carreras 1 y 2), RCC10/pTG7101 solo o con DTT (carreras 3 y 4) y HCC10/pTG7101 solo o con DTT (carreras 5 y 6).La carrera 5 correspondiente al complejo con HCC10 muestra una migración electroforética ligeramente inferior a la del plásmido solo control.

Formación del complejo a altas concentraciones de ADN

Los experimentos anteriores están realizados a una concentración de plásmido de 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, que es la que empleábamos habitualmente con los plásmidos de tamaño medio como el pMOK o p2F. Sin embargo, desde un punto de vista de unidades de gen a entregar por parte del plásmido pTG7101, preparar los complejos a esa concentración de ADN supone disminuir aproximadamente dos tercios el número de unidades de gen en el producto final, desde que el pTG7101 tiene un peso molecular aproximadamente el triple que los anteriores. Por otro lado, para futuras experiencias *in vivo*, resulta interesante preparar el vector a una mayor concentración molar del plásmido, para maximizar la transfección celular. La determinación de la relación adecuada para la formación ($N/P=0,5$) mediante la técnica anterior permitió finalmente formar el complejo con una alta concentración de plásmido. Lo que no había sido posible en una serie de experiencias anteriores, en las que se trató de formar el complejo a varias relaciones N/P de entre 1 y 4, sin resultado (datos no mostrados). En estas experiencias iniciales, la técnica de seguimiento de la formación con NPN aún no había sido ideada, y la no formación del complejo a $N/P=1$ era atribuida a la necesidad de una mayor concentración relativa del RCC10 para compactar los plásmidos grandes.

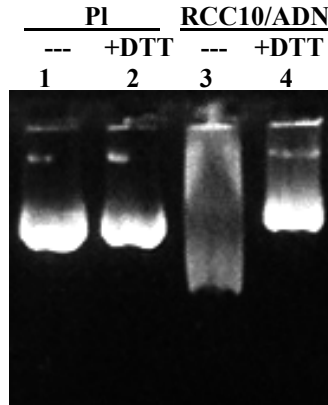


Figura 22. Preparación del complejo con plásmido de alto peso molecular (pTG7101) a N/P=0,5 a altas concentraciones de ADN. Plásmido solo o con DTT (1 y 2), RCC10/pTG7101 solo o con DTT (3 y 4) y cargados a las 4,5 horas desde su preparación. La concentración de plásmido utilizada para preparar el complejo fue de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (10 veces superior a las concentraciones de trabajo habituales).

3.2 Desarrollo del Lipopoliplojejo

3.2.1 Caracterización de la formación del poliplojejo por decaimiento de la fluorescencia

El bromuro de etidio (BrEt) emite fluorescencia en presencia de ADN libre, por intercalación entre las bases nitrogenadas (la fluorescencia del BrEt libre en solución acuosa es baja). La unión del ADN plasmídico a un polímero catiónico como polietilenimina (PEI) produce la exclusión del BrEt del ADN, por lo que una disminución en la fluorescencia de una solución de ADN y bromuro de etidio puede utilizarse para comprobar si el ADN se encuentra libre o unido al PEI.

El poliplojejo PEI/p2F se prepara a una relación de cargas N/P = 10 (que equivale a una relación en masa 1 μg ADN/1,4 μg PEI), según lo descrito en el apartado correspondiente en

Material y Métodos. Las muestras se preparan por duplicado, según las siguientes cantidades:

25 μ l de poliplejo
50 μ l de solución tampón
125 μ l de BrEt (10 μ g/ μ l) en 5% Glc

Las soluciones tampón utilizadas en el ensayo fueron glicina de Sorensen I (ajustado el pH a 3,5 con HCl), HEPES ajustado a pH 5,2 con HCL, HBS ajustado a pH 7,4 con HCl, Borato sódico a pH 9,3 y Glicina de Sorensen II ajustado a pH 10 y 12 con NaOH.

Se mide la fluorescencia por duplicado de muestras de mezclas de plásmido con PEI y de plásmido solo a los diferentes pH, expresándose los resultados como tanto por cien de disminución de la fluorescencia ($F1/F0 \times 100$) donde F1 es la fluorescencia de la mezcla de plásmido y PEI, y F0 la fluorescencia del plásmido solo para cada pH.

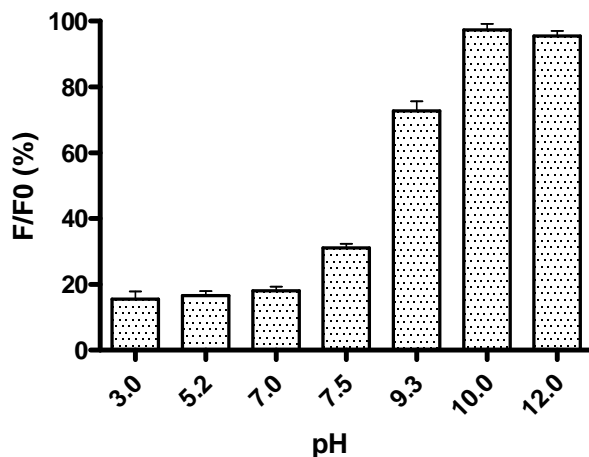


Figura 23. Caracterización de la formación del poliplexo plásmido/PEI por decaimiento de la fluorescencia bajo diferentes condiciones de pH de preparación. Los complejos plásmido/PEI a relación en carga N/P=10 se preparan a diferentes pH. La fluorescencia del ADN en la solución se mide en presencia de bromuro de etidio y se expresa como fluorescencia normalizada (F/F_0) x 100 (fluorescencia del ADN en la solución de poliplexos/fluorescencia de muestras de plásmido solo en las mismas condiciones de pH). Los datos se expresan como la media \pm SEM de duplicados.

Se observa (figura 23) una disminución acusada de fluorescencia a partir de pH 10, que cae a los valores del blanco sobre pH 7. El PEI contiene grupos amino primarios y secundarios susceptibles de protonarse y desprotonarse. A pH bajo estos grupos se encuentran protonados, mientras que a pH elevado se encuentran desprotonados y por tanto no son capaces de interactuar iónicamente con los grupos fosfato negativamente cargados del ADN. La disminución de fluorescencia observada cuando se prepara el complejo a pH más ácido se interpreta como la formación de los poliplexos

porque el PEI se encuentra ya protonado y susceptible por tanto de interactuar con el ADN, formando un complejo iónico que excluye el BrEt.

Mediante esta experiencia, se confirma la formación del poliplejo en nuestras condiciones de trabajo.

3.2.2 Experimentos preliminares que condujeron al desarrollo del lipopoliplejo

Las soluciones de liposomas y poliplejos son casi transparentes en las concentraciones empleadas en los protocolos de trabajo habituales de nuestro laboratorio. Sin embargo, al mezclar una solución de poliplejos y liposomas, durante uno de los pasos intermedios de un protocolo de encapsulación de poliplejos, la mezcla resultante tenía un aspecto translúcido pero sin precipitados apreciables. A partir de esta observación casual, surgió la idea de que ambos componentes, liposomas y poliplejos, podrían estar interactuando para formar complejos de pequeño tamaño, inaparentes a simple vista.

Para comprobarlo, se realizaron dos tipos de experiencias: se centrifugaron (15000 rpm x 30 min) mezclas de liposomas (de tipo SUV y MLV) y poliplejos en diferentes proporciones de mezcla. Tras la centrifugación, aparecía un precipitado blanco muy aparente en los dos tipos de liposoma; indicando la presencia de algún tipo de agregado sedimentable. Se comparó asimismo la absorbancia a 660nm de las soluciones de poliplejos y suspensiones de liposomas, tanto por separado como sus mezclas, comprobándose un aumento evidente de la A_{660nm} de las mezclas de liposomas y poliplejos respecto de las que tenían las soluciones por separado (datos no mostrados). Estos resultados confirmaban la formación de algún tipo de precipitado, se había formado algún tipo de complejo o agregado al mezclar los liposomas con el poliplejo. Para caracterizar el complejo de forma más precisa,

sin embargo, se requería de experiencias más elaboradas, que permitieran cuantificar con precisión qué cantidad de liposoma respecto al poliplexo intervenía para formar el complejo, que llamamos lipopoliplexo (LPP).

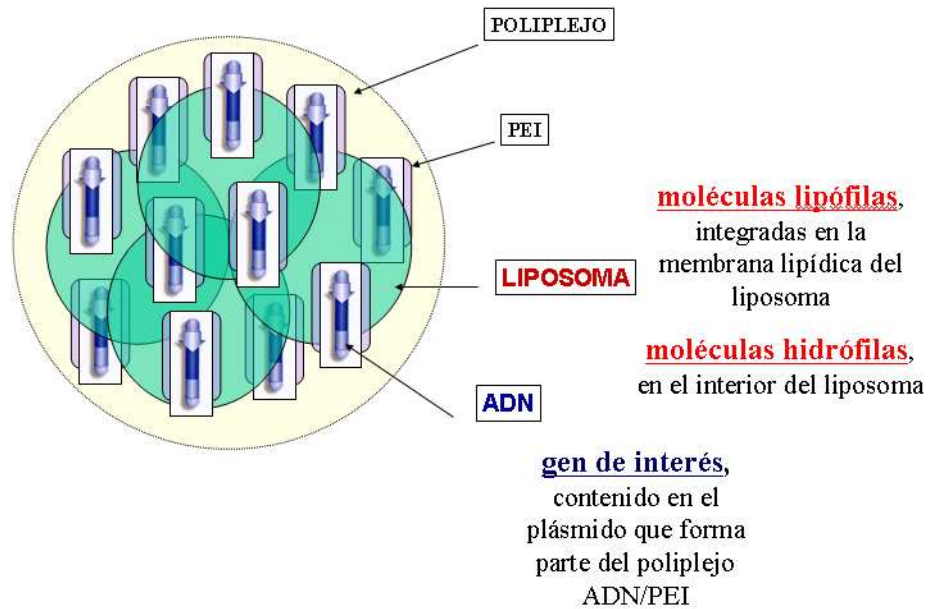


Figura 24. Estructura propuesta del vector lipopoliplexo. Múltiples unidades de poliplexo pADN/PEI se encuentran asociadas con liposomas (transportando moléculas hidrosolubles en su interior o bien liposolubles asociadas a la membrana) formando un complejo. En el plásmido utilizado para formar el poliplexo puede incorporarse un gen terapéutico.

Caracterización del lipopolipolejo por centrifugación

Los experimentos iniciales que utilizamos para caracterizar el lipopolipolejo trataban de determinar la cantidad mínima de liposomas necesarios para sedimentar completamente los polipolejos ADN/PEI por centrifugación. El propósito del experimento era demostrar la formación de un complejo sedimentable (en nuestras condiciones de centrifugación) entre el polipolejo ADN/PEI y los liposomas, así como medir la relación liposomas/polipolejos óptima para formar el complejo. A este respecto, se prepararon mezclas a partir de una concentración de polipolejo constante a la que se adicionaban cantidades crecientes de liposomas. El complejo liposomas/polipolejos resultante se eliminaba del medio por centrifugación. Cuando la concentración de lípido fuese suficientemente elevada, todo el polipolejo estaría formando parte del complejo y sería arrastrado al sedimento en la centrifugación. El sobrenadante quedaría por lo tanto libre de polipolejos.

A continuación, las alícuotas de los sobrenadantes de cada relación de mezcla se trataban con el polímero aniónico heparina (que se une al PEI, disociando el polipolejo ADN/PEI y liberando el plásmido) para medir la concentración de ADN del sobrenadante por fluorescencia, mediante la adición de una sonda fluorescente.

Ha sido descrito que los polipolejos ADN/PEI preparados en medio libre de iones se caracterizan por ser poblaciones de complejos de tamaño pequeño y relativamente homogéneas, y estables tras centrifugación a fuerzas de campo moderadamente altas (Goula, D., J. S. Remy, et al. 1998). Por lo tanto, como medio de formación del polipolejo, utilizamos una solución de glucosa al 5% en agua milliQ, que no contiene iones, a diferencia de otros medios habituales de preparación de complejos no virales para transferencia génica (que utilizan soluciones de tampones como PBS o HEPES, etc.).

Nuestra técnica de caracterización asumía que la fuerza de campo utilizada en la centrifugación sedimentaría los liposomas, pero no los poliplejos libres, que se mantendrían en solución tras la centrifugación. Los poliplejos sólo sedimentarían si se encontraban unidos al liposoma, en cuyo caso se verían arrastrados al interaccionar con estos formando un complejo (ver esquema).

La concentración de ADN en el sobrenadante antes y después de centrifugar se midió por fluorescencia, mediante una sonda fluorescente específica (PicoGreen®) (ver figura 25). Para ello, se tomaron alícuotas antes y después de centrifugar a las que se añadió heparina (para disociar los poliplejos ADN/PEI, permitiendo el acceso de la sonda fluorescente al plásmido). Asimismo, las alícuotas se trataron con el detergente Triton X-100 para solubilizar los lípidos y deshacer los liposomas. De esta manera, el tratamiento conjunto con Triton X-100 y heparina permite la disociación de cualquier tipo de asociación o complejo que hubiera podido formarse con el ADN, liberando el plásmido y haciéndolo accesible a la sonda, permitiendo su medida por fluorescencia.

Sin embargo, la presunción de que el poliplejo no sedimentaría en nuestras condiciones de centrifugación, resultó no ser cierta. Las soluciones de poliplejos ADN/PEI sólo utilizadas como control, mostraban que el sobrenadante contenía una proporción de ADN de aproximadamente el 60-70% respecto a la solución antes de centrifugar. Lo que mostraba que solo un 60% de la población de poliplejo son partículas lo suficientemente pequeñas o poco densas, y resistentes por tanto a la sedimentación en nuestras condiciones de centrifugación.

Sin embargo, la mezcla de poliplejo con los liposomas conduce a la pérdida total de la fluorescencia del ADN en el sobrenadante después de la centrifugación, lo que interpretamos como la formación de un complejo sedimentable entre los poliplejos y los liposomas (lipopoliplejo). A diluciones sucesivamente mayores de la

suspensión inicial de liposomas, no existe pérdida de la fluorescencia después de la centrifugación, lo que atribuimos a una cantidad insuficiente de liposomas para formar complejos sedimentables con los poliplejos.

Dado que la proporción de poliplejo que se mantenía en el sobrenadante variaba bastante a lo largo de las diferentes preparaciones de poliplejos (en un rango amplio de entre el 40-75%, pero típicamente en torno al 60-70%) la sedimentación por centrifugación no resultó una técnica adecuada para lograr una caracterización precisa del lipopoliplejo.

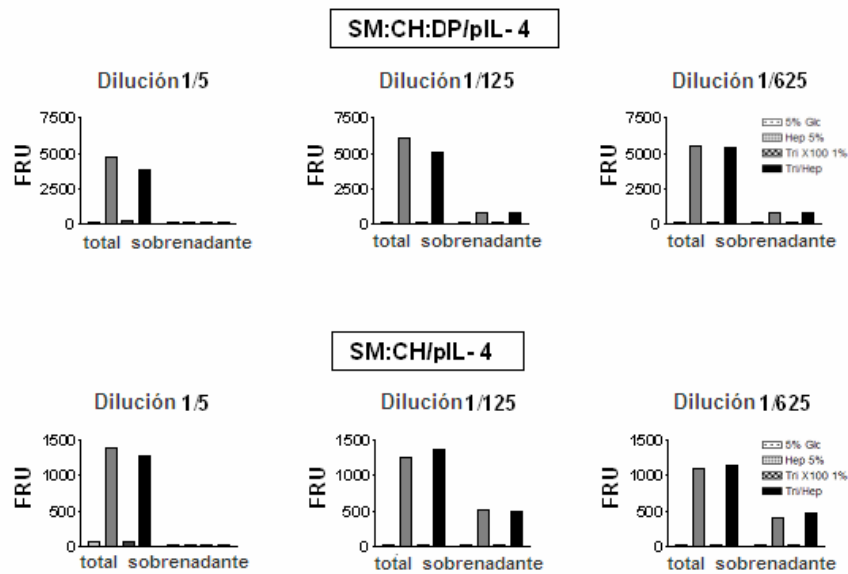


Figura 25. Caracterización de la formación del lipopoliplejo por centrifugación. Se prepararon tres soluciones de lipopoliplejo con distintas diluciones (1/5, 1/125 y 1/625) a partir de una solución madre de liposomas (SM:CH:DP o SM:CH) y una concentración fija de poliplejo (0.5 μg ADN/ μl de plásmido). La fluorescencia del ADN en la solución de lipopoliplejo tratada con heparina o Triton X-100 fue medida con la sonda fluorescente picogreen® antes (total) y después de centrifugar (15000 g x 20 minutos). La fluorescencia del ADN después de centrifugar es nula en el lipopoliplejo preparado con la

solución de liposomas 1/5, indicando la formación de un complejo sedimentable entre los liposomas y el poliplexo. El experimento está realizado con dos formulaciones de lipopoliplexo: SUV (SM:CH:DP):pIL-4/PEI y SUV(SM:CH):pIL-4/PEI.

Esta variabilidad en la sedimentación del poliplexo, según advertimos más adelante, estaba relacionada con la proporción de sales contaminantes que se introducían con el plásmido al preparar los poliplexos. Los complejos pequeños ADN/PEI preparados según el protocolo de Goula exigen un medio libre de iones. Pero el plásmido, obtenido a partir de cultivos bacterianos mediante extracción y purificación con un kit comercial basado en cromatografía de intercambio iónico (Nucleobond®), contenía una cierta proporción de sales, que era variable en cada extracción.

La utilización de estos extractos para formar el poliplexo introducía pues una cierta cantidad de sales que afectaba probablemente aumentando el tamaño de la población de partículas generada, causante de la variabilidad en la proporción de los poliplexos sedimentados.

En particular, este problema afectó no solo en el desarrollo de estas experiencias, sino que constituyó un problema grave en los ensayos de inmunización. El plásmido agregaba en precipitados macroscópicamente visibles, muy grandes y aparentes, tras la adición del PEI, lo que invalidaba el producto. Estos grandes precipitados se observaban solo al tratar de preparar el poliplexo en las importantes cantidades en que eran necesarios para los ensayos de vacunación (del orden de 1-2 ml de solución de poliplexos a 0,5 µg ADN/ µl), no observándose en las preparaciones a pequeña escala (del orden de hasta 100 µl).

Sólo más adelante en el desarrollo del proyecto identificamos y solucionamos el problema de las sales en los plásmidos extraídos. El cambio de los kits de extracción de plásmido de Nucleobond® por los de Quiagen®, basados en un

procedimiento de purificación similar, pero que rendían un producto más puro, libre de sales, solucionó definitivamente el problema de la precipitación de los poliplejos ADN/PEI.

Estandarización del protocolo de preparación de los poliplejos. Como se ha comentado, el centrifugado previo de la solución de poliplejos para eliminar las partículas más grandes o densas antes de mezclarlas con el liposoma, no constituyó una solución viable. Ya que disminuía excesivamente la concentración de poliplejos, introducía nuevos factores de variabilidad incontrolados y nuevos pasos en la técnica (la necesidad de cuantificar la concentración de ADN en la solución precentrifugada antes de utilizarla) y, además, cuando se utilizaban estas soluciones precentrifugadas en los experimentos, curiosamente en los controles de "poliplejo solo" volvía a precipitar una cierta pequeña fracción tras la centrifugación, indicando que había habido un fenómeno de agregación o similar tras la primera centrifugación que volvía a generar partículas sedimentables en cierta fracción de los poliplejos. Este resultado nos condujo indirectamente a percibir la importancia de fijar un tiempo estándar de preparación de la solución de poliplejos, antes de mezclarla con el liposoma.

El tiempo de preparación de los poliplejos ADN/PEI es un parámetro muy importante, ya que se ha comprobado que las poblaciones de los complejos evolucionan con el tiempo (Goula, D., C. Benoist, et al. 1998). A tiempos excesivamente largos desde la preparación de los poliplejos, estos tienden a aumentar de tamaño, debido a la agregación. Por otro lado, tiempos cortos pueden resultar insuficientes para que se compleje y compacte la totalidad del ADN plasmídico. Resulta pues imprescindible fijar un tiempo de preparación del poliplejo antes de adicionar la suspensión de liposoma para formar el LPP, para estandarizar resultados. Este tiempo de preparación del poliplejo debiera ser tal que condujera a un óptimo en la población de poliplejos, en sentido de una suficiente compactación del ADN pero evitando la

agregación en complejos grandes. El experimento para calcular el tiempo óptimo de preparación se basó en la suposición, un tanto arbitraria, de que los complejos ADN/PEI suficientemente compactados eran lo bastante densos para ser sedimentados en las condiciones de centrifugación utilizadas (15000 g x 20 min). El tiempo seleccionado (15 minutos) coincide con el que los autores del método de preparación de complejos en medio libres de iones encuentran en el caso del PEI lineal de 22kDa.

El uso de varios medios de preparación de los complejos distintos (5% Glc, tampón HEPES pH 7,5 o agua milliQ) tampoco resultó ninguna ventaja en cuanto a la fracción de poliplejos solos que sedimentaban, es más, en el caso del medio base glucosa 5%, debido a la diferente densidad, los liposomas de tipos más grandes flotaban, acumulándose como una capa superior flotante en el sobrenadante tras la centrifugación, lo que invalidaba la caracterización por este método. Decidimos mantener la preparación en 5% Glc, aún con el coste de no poder utilizar la técnica de caracterización mediante centrifugación.

3.2.3 Método de preparación del lipopoliplexo

Protocolo general de preparación de lipopoliplexos. El complejo ternario liposomas/PEI/ADN que constituye el LPP se forma en dos etapas consecutivas (figura 26):

1. En primer lugar, el plásmido es condensado con el PEI para formar poliplejos ADN/PEI de pequeño tamaño, lo cual requiere utilizar soluciones libres de iones, tal como la solución de glucosa al 5%, ya que en medios “iónicos” o salinos, se obtienen complejos plásmido/PEI de tamaños mucho mayores y más heterogéneos (Goula, D., J. S. Remy, et al. 1998).

2. En segundo lugar, sobre la solución de poliplejos anterior se añaden los liposomas, que se asocian a los anteriores para formar espontáneamente el complejo que llamamos lipopoliplejo.

Para preparar los poliplejos, se mezcla por agitación en vortex una solución de plásmido de concentración de ADN de 1mg/ml con un volumen igual de PEI 25KDa de 1,4 mg/ml pH 7.3. De esta manera se obtiene una solución final de poliplejos de 0,5 µg de ADN/ml, a una relación en carga N/P de 10:1. Esta relación en carga ADN/PEI, según la experiencia de trabajo en nuestro laboratorio, es óptima para la eficacia de transfección de los poliplejos.

Para la formación del lipopoliplejo, la mezcla se incuba 15 min antes de añadir sobre ella la cantidad apropiada de suspensión de liposomas, en un proceso espontáneo mediado seguramente por interacción electrostática entre cargas opuestas (las positivas de los grupos amino libres del PEI del poliplejo y las negativas procedentes fundamentalmente del dicetilfosfato en el liposoma). El pH de trabajo debe ser tal que ambos grupos, el fosfato del plásmido y el amino del PEI, se encuentren ionizados, para que se verifique la interacción electrostática. Se agita en vortex inmediatamente y se incuba a T^a ambiente durante hora y media antes de su uso. En cuanto a la incorporación de moléculas al LPP, las moléculas hidrosolubles se incorporan a la solución acuosa que se utiliza para la redispersión mecánica de los lípidos desecados en la formación inicial del liposoma de tipo MLV; mientras que los antígenos hidrofóbicos se añaden de la mezcla inicial de lípidos en el solvente orgánico. Hay que tener en cuenta que en los sucesivos pasos para la preparación del liposoma puede perderse parte de los antígenos hidrosolubles, por lo que habrá que evaluar la cantidad de material incorporado al liposoma final (rendimiento de encapsulación). No obstante, para liposomas preparados según los métodos DRV o MLV-FT, la bibliografía típicamente recoge rendimientos de encapsulación de proteínas excelentes, cercanos al 100%.

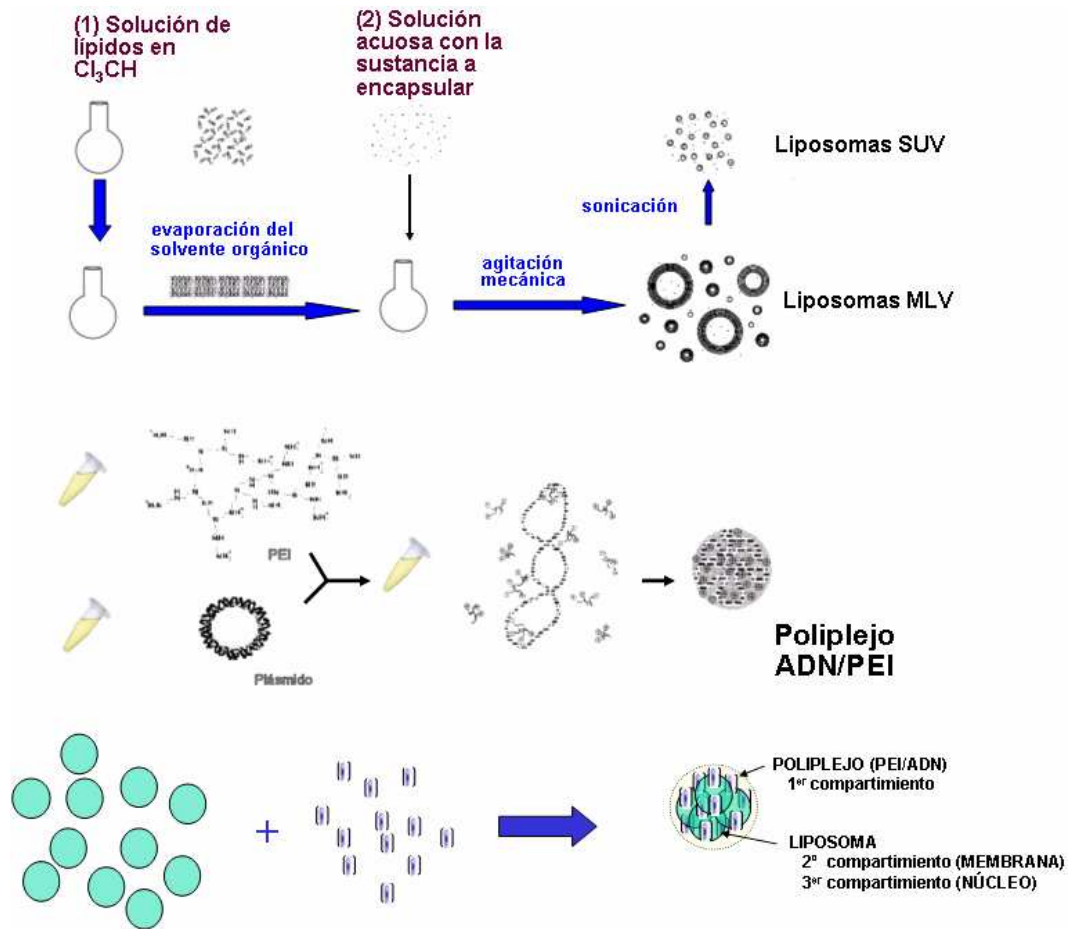


Figura 26. Esquema de la preparación del lipopoliplejo con liposomas MLV y SUV. Los dos subsistemas, liposomas (a) y poliplejos (b) se preparan independientemente. Los antígenos se incorporan al liposoma introduciéndolos en la mezcla de lípidos inicial, bien en solvente orgánico para el caso de antígenos lipídicos (1) o bien en la fase acuosa que se situará en el interior del núcleo liposomal, en el caso de antígenos o moléculas hidrosolubles (2). Una vez mezclados, ambos componentes (liposomas y poliplejos) interactúan espontáneamente para formar un complejo (lipopoliplejo) (c).

3.2.4 Visualización del LPP por microscopía confocal

Para demostrar la formación del lipopolipolejo, se prepararon 4 suspensiones de liposomas SUV encapsulando la sonda fluorescente verde carboxifluoresceína, de formulación:

1) SM:CH:DP	5:4:1
2) SM:CH	6:4
3) PC:CH:DP	5:4:1
4) PC:CH	6:4

Estos liposomas, aunque son fluorescentes *per se* debido a la carboxifluoresceína que contienen, son demasiado pequeños (el rango de tamaños típico para este tipo de liposomas es de de 20 a 80 nm) para ser visualizados por microscopía óptica bajo nuestras condiciones de observación, y el campo aparece oscuro. La subsecuente aparición de agregados con fluorescencia verde tras la adición del polipolejo es interpretada como la formación de un complejo entre los liposomas y polipolejos.

Las mezclas de liposomas SUV y polipolejos aparece en microscopía óptica de fluorescencia como una población de partículas fluorescentes de tamaño micrométrico, que no se observa en las muestras con polipolejos ni con liposomas SUV solos.

Este resultado se obtiene en los cuatro tipos de formulaciones de liposomas empleadas, aunque la población de partículas generadas tiene características diferentes:

- las mezclas de liposomas SM:CH:DP con polipolejos se revela como una población de partículas heterogénea, con un rango de tamaños desde 5 a 20 μm (aunque puede haber partículas aun más pequeñas, por debajo del límite de resolución). Son agregados que aparentan muy compactos,

por la intensidad de la fluorescencia que emiten, debiendo tratarse de complejos de alta densidad en liposomas (ver figura 27).

- las mezclas de liposomas SM:CH con polipéptido son partículas más pequeñas, de 1-5 μm , aunque la mayoría de partículas están en torno a 1 μm . La población aparece bastante homogénea, con elevada fluorescencia, sugiriendo partículas de alta densidad en liposomas (ver figura 28).

- las mezclas de liposomas PC:CH con polipéptido dan agregados aparentemente más laxos (parece un fenómeno de coagulación más que de complejación), los mayores de un tamaño de entre 5-10 μm , de escasa intensidad de emisión fluorescente, y constituidos por partículas más pequeñas (de 1 μm o menores) agregadas. La densidad en liposomas de estos complejos parece ser menor que en los anteriores (ver figura 29).

- las mezclas de liposomas PC:CH:DP con polipéptido dan agregados muy grandes y de formas irregulares (parece claro aquí que es un fenómeno de coagulación), de partículas compactas más pequeñas (en torno a 1 μm y menores), de fluorescencia intensa pero menor que en las formulaciones con SM (ver figura 30).

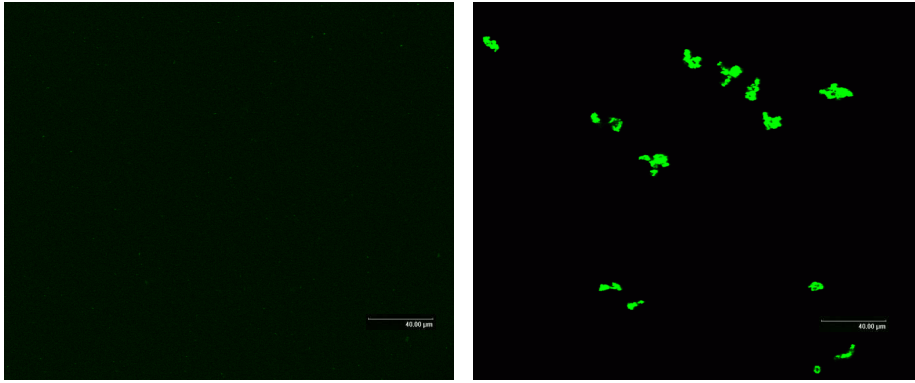


Figura 27. Visualización por microscopía de fluorescencia del lipopolíplejo SUV(SM:CH:DP):PEI/p3C-EGFP. Las microfotografías muestran el aspecto de una suspensión de liposomas de formulación SUV(SM:CH:DP) encapsulando la sonda fluorescente verde carboxifluoresceína, antes (fotografía izquierda) y después (fotografía derecha) de añadir la solución de políplejo PEI/p3CEGFP para formar el lipopolíplejo.

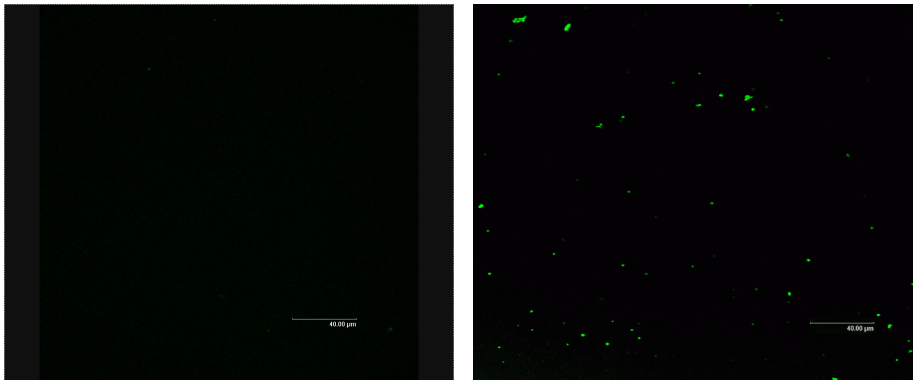


Figura 28. Visualización por microscopía de fluorescencia del lipopolíplejo SUV(SM:CH):PEI/p3C-EGFP. Las microfotografías muestran el aspecto de una suspensión de liposomas de formulación SUV(SM:CH) encapsulando la sonda fluorescente verde carboxifluoresceína, antes (fotografía izquierda) y después (fotografía derecha) de añadir la solución de políplejo PEI/p3CEGFP para formar el lipopolíplejo.

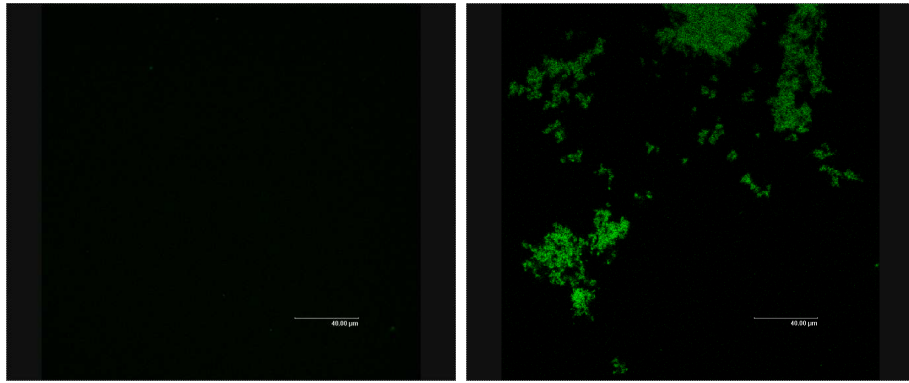


Figura 29. Visualización por microscopía confocal de fluorescencia del lipopoliplexo SUV(PC:CH:DP):PEI/p3C-EGFP . Suspensión de liposomas SUV(PC:CH:DP) encapsulando la sonda fluorescente verde carboxifluoresceína antes (fotografía superior) y después (fotografía inferior) de añadir solución de poliplexo PEI/p3C-EGFP preparada a N/P = 11. La subsecuente visualización de agregados con fluorescencia verde tras la adición del poliplexo es interpretada como la formación de un complejo entre los liposomas y poliplexos.

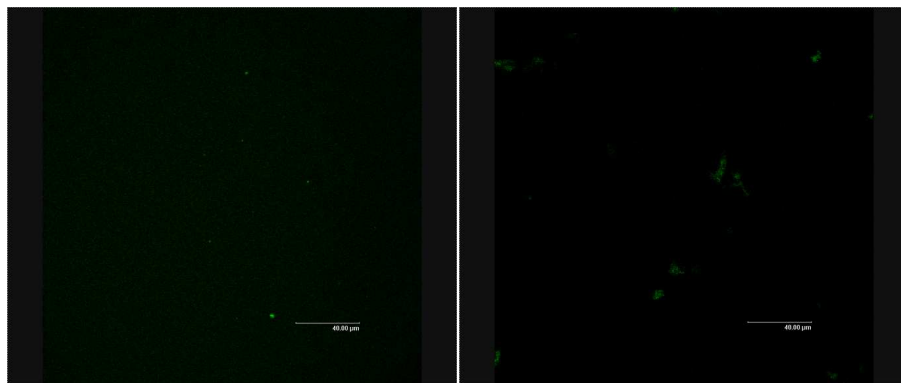


Figura 30. Visualización por microscopía de fluorescencia del lipopoliplexo SUV(PC:CH):PEI/p3C-EGFP. Las microfotografías muestran el aspecto de una suspensión de liposomas de formulación SUV(PC:CH) encapsulando la sonda fluorescente verde carboxifluoresceína, antes (fotografía izquierda) y después (fotografía derecha) de añadir la solución de poliplexo PEI/p3CEGFP para formar el lipopoliplexo.

3.2.5 Caracterización electroforética del lipopoliplejo

La visualización directa por microscopía de fluorescencia confocal prueba la formación de un complejo o agregado entre los liposomas inducido por la presencia del poliplejo, pero no demuestra cuantitativamente la formación del lipopoliplejo. La estructura de un lipopoliplejo presumiblemente consiste en un agregado de liposomas unido por los poliplejos ADN/PEI, mediado por interacción electrostática, como muestra la figura 31. Al no existir en la bibliografía técnicas adecuadas para caracterización de un complejo de tales características, fue necesario que desarrollásemos técnicas capaces de demostrar la formación cuantitativa del lipopoliplejo. La electroforesis permite la caracterización de los lipopoliplejos formados con liposomas pequeños (de menos de 100 nm), que es el límite de paso a través del poro del gel (Gillies et al 2002).

Demostración cuantitativa de la formación del lipopoliplejo

Las electroforesis en gel de agarosa de los lipopoliplejos permite la caracterización de la formación del lipopoliplejo. Para lo cual, se cargaron en el gel lipopoliplejos solos o tratados con un detergente (Triton X-100) o un polímero aniónico (heparina), que son capaces de disociar los liposomas o los poliplejos respectivamente. La migración electroforética rinde el siguiente patrón de bandas tras el revelado del gel y ulterior examen bajo iluminación UV (figura 24):

- el LPP tratado con el detergente Triton X-100 (calle 1) no muestra ninguna banda en el gel, pero presenta una mancha verde fluorescente intensa en la parte inferior; el aspecto coincide con los controles del grupo “liposoma sólo” tratado con Triton X-100 (calle 5) o Triton X-100 más heparina (calle 8).

- el LPP solo adicionado de 5% glucosa (calle 2) presenta una señal fluorescente intensa en el pocillo, pero no aparece ninguna banda fluorescente en el seno del gel.

- el LPP tratado con heparina (calle 3) presenta una banda fluorescente verde bien definida, en la parte media del gel; la posición de esta banda coincide con las bandas que aparecen en el grupo control “liposomas solos” tratados con 5% glucosa (calle 5) o heparina (calle 7). Presenta además una banda fluorescente rosa-anaranjado, en la parte media del gel; la posición de esta banda coincide con las bandas que aparecen en el grupo control “poliplejo solo” tratados con heparina (calle 11) o Triton X-100 más heparina (calle 12).

- en el LPP tratado con Triton X-100 más heparina (calle 4) presenta una banda fluorescente rosa-naranja bien definida, en la parte media del gel; la posición de esta banda coincide con las bandas que aparecen en el grupo control “poliplejo solo” tratados con heparina (calle 11) o Triton X-100 más heparina (calle 12). Presenta una mancha verde fluorescente intensa en la parte inferior.

Por observación directa en microscopia de fluorescencia no es posible decidir si todos los liposomas forman parte de los complejos o si, por el contrario, existe una fracción del liposoma total que no interviene en la formación del lipopoliplejo. Mediante la técnica electroforética sí se puede demostrar que todo el componente liposomal, o al menos la mayoría de él, forma parte del lipopoliplejo. En caso de que una fracción de los liposomas no haya reaccionado y permanezca por tanto libre en la solución, aparecerá como una banda de migración electroforética de fluorescencia verde en el seno del gel.

La electroforesis en gel de agarosa tiene pues un carácter cuantitativo en cuanto a la demostración de la formación del LPP, ya que permite determinar la relación liposomas/poliplejos óptima para formar el lipopoliplejo

(entendiendo por óptima aquella relación en la que no hay un exceso de componentes que quedan sin reaccionar).

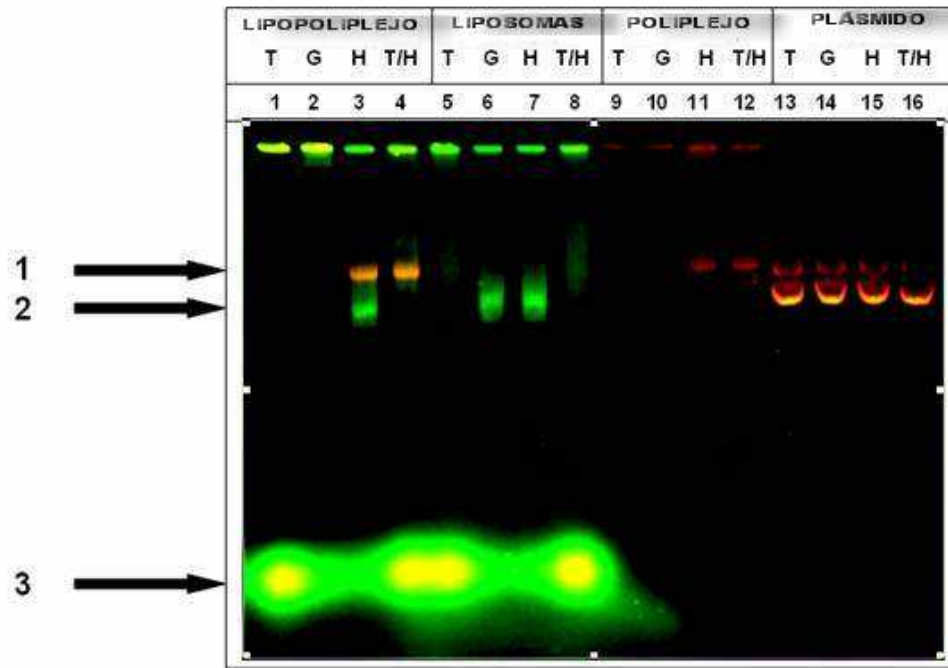


Figura 31. Caracterización del LIPOPOLIPLEJO por electroforesis en gel de agarosa. Lipopolipoplejo (líneas 1 a 4), liposomas (líneas 5–8), polipoplejo (líneas 9–12) y plásmido p3C-EGFP libre (líneas 13–16) fueron añadidos de Triton X100 (T), glucosa 5% (G), heparina (H) y Triton X100 más heparina (T/H). El gel fue incubado con bromuro de etidio tras la migración electroforética para visualizar el ADN. Los liposomas utilizados, tanto los libres como los constituyentes del lipopolipoplejo, eran de tipo SUV y encapsulaban en su interior la sonda fluorescente verde carboxifluoresceína. La formulación de los liposomas fue SM:CH:DP (5:4:1). Los liposomas de carboxifluoresceína (bandas verdes, flecha 2), plásmido libre (bandas naranja, flecha 1) y carboxifluoresceína libre (bandas amplias de color verde, flecha 3) fueron visualizados bajo iluminación ultravioleta.

Análisis en detalle del método electroforético nuevo para caracterización de lipopoliplos. Este método electroforético en principio es aplicable a cualquier vector de tipo “lipopoliplo”, es decir, vectores que consisten en la asociación de liposomas con poliplos de cualquier tipo (PEI/ADN en nuestro caso, o polilisina/ADN; o protamina/ADN, etc.). Sin embargo, no se presta al análisis de lipopoliplos elaborados con cualquier tipo de liposoma, ya que existe una restricción respecto al tamaño máximo, que viene condicionado por el tamaño de poro del gel de agarosa (los liposomas no deben superar los 100 nm, que es el tamaño máximo de poro del gel de agarosa (G T Gillies et al 2002); y también es posible, aún con un tamaño adecuado, una incompatibilidad en cuanto a la composición lipídica del liposoma (los liposomas catiónicos elaborados con DOTAP no pueden analizarse mediante esta técnica debido a que el DOTAP interacciona químicamente con el gel de agarosa, impidiendo la migración electroforética del liposoma aún con el tamaño adecuado). En nuestro caso, hemos utilizado liposomas de tipo SUV (“Small Unilamellar Vesicles” o Liposomas Unilamelares Pequeños), obtenidos mediante sonicación de una suspensión de liposomas de tipo MLV, que se caracterizan por estar conformados por una única bicapa lipídica y por un rango de tamaños típicamente entre 40 y 80 nm. Asimismo las formulaciones lipídicas empleadas han sido combinaciones de fosfatidilcolina o esfingomielina con colesterol, en el caso de formulaciones neutras; y adicionando a los anteriores el lípido aniónico dicetilfosfato para las formulaciones aniónicas.

Los detergentes o tensioactivos, por encima de su cmc, tienen la propiedad de “solubilizar” las membranas celulares y/o bicapas de lípidos, como las de los liposomas. Las micelas solubles del tensioactivo conforman un ambiente hidrofóbico en el que pueden incorporarse los lípidos de la membrana celular o liposomal hasta la total desaparición de la estructura en bicapa. En presencia de un tensioactivo a concentración adecuada, las bicapas lipídicas de los liposomas quedan “solubilizadas”,

desapareciendo la estructura liposomal y liberándose al medio externo el contenido que encerraba en su interior el liposoma. El detergente Triton X-100 solubiliza los liposomas SUV(CF), liberando la carboxifluoresceína encapsulada.

El ensayo permite demostrar la formación de un complejo entre los liposomas y el PEI mediante una electroforesis de retardo en gel. La electroforesis de retardo en gel es un ensayo habitual en el desarrollo de vectores no virales para terapia génica, por el cual se puede demostrar la formación de un complejo o agregado entre los diferentes componentes del vector que estamos tratando de ensamblar. Si los componentes por separado (plásmido, polímeros cargados, liposomas) son capaces de migrar a través del gel electroforético, pero no cuando han sido mezclados, podemos suponer que se ha producido una interacción química que conformado un “complejo” de mayor tamaño que es incapaz de migrar a través de los poros del gel. En el caso del lipopoliplexo, suponemos que la interacción es de tipo electrostático, entre las cargas negativas de los lípidos aniónicos del liposoma (dicetilfosfato) o los lípidos polares (esfingomielina, fosfatidilcolina); y las cargas positivas en exceso de los poliplexos ADN/PEI.

La figura 32 muestra el análisis por electroforesis de los diversos componentes del vector. Las muestras que contienen LPP no migran por el gel, permaneciendo retenidas por el pocillo. Sin embargo, al tratar con heparina, que disocia el poliplexo ADN/PEI, aparecen tanto las bandas del plásmido (fluorescencia naranja) como las de los SUV(CF) (fluorescencia verde), que interpretamos como la disociación del poliplexo y subsiguiente desensamblaje de los liposomas que formaban el complejo.

El tratamiento combinado de los lipopoliplexos con heparina y Triton X-100 produce la aparición únicamente de la banda de ADN, al haber sido destruidos los liposomas SUV (CF) por el detergente. Asimismo, la comparación con los controles que contienen solo liposomas SUV (CF) permite identificar las

bandas fluorescentes verdes que aparecen al disociar el LPP con heparina como liposomas SUV que encapsulan CF. Los liposomas del control migran por el gel de agarosa separándose de la CF libre no encapsulada, mostrando bandas electroforéticas bien definidas. La CF libre no encapsulada que acompaña la suspensión de liposomas aparece en una banda ancha y difusa, en el extremo del gel (debido a la mayor difusibilidad de la CF libre) y de mayor intensidad que la banda del liposoma (por el autoapantallamiento de la sonda encapsulada). El tratamiento con Triton X-100 destruye estos liposomas, no apareciendo la banda verde intermedia y aumentando la intensidad de la banda de CF libre; en cambio el tratamiento con heparina no afecta al liposoma.

Los controles de poliplejo ADN/PEI muestran que el plásmido formando parte del poliplejo es retenido en el pocillo, mientras que el tratamiento con heparina lo libera, apareciendo una banda internalizada en el gel, situada en la misma posición que las de los controles de plásmido sólo. El tratamiento con Triton X-100 no afecta al poliplejo.

Las bandas de fluorescencia verde atribuidas a los liposomas tienen el aspecto típico de las distribuciones gaussianas observadas en los cromatogramas de gel-exclusión: una zona central más intensa, y una disminución paulatina en intensidad por delante y por detrás de esta zona central, más “alargada” en la zona de la “cola” posterior. Dado que los liposomas tipo SUV presentan una distribución gaussiana de tamaños, interpretamos el aspecto de estas bandas como el efecto cromatográfico del gel sobre los distintos tamaños de liposoma presentes en la población total de liposomas SUV. Aunque menos probable, no es descartable que esta distribución en la banda electroforética este relacionada con diferencias en cuanto a la carga en superficie, originadas por pequeñas diferencias en cuanto a la proporción de DP que ha entrado a formar parte de los liposomas durante su formación. O que ambos efectos, diferencias en la distribución de carga y diferencias de tamaños, estén simultáneamente implicados.

Las manchas verdes del final del gel son carboxifluoresceína libre (cuando se carga este producto sólo en el gel de agarosa, migra en idéntica posición y con el mismo aspecto); en las muestras tratadas con Triton X-100 esta mancha es mucho más intensa, tanto en liposomas solos como en el LPP. Lo que evidencia la rotura de los liposomas por el detergente y salida de la CF al exterior.

Otra ventaja de la electroforesis como técnica en nuestro caso es que elimina las interacciones entre los distintos componentes de las muestras (heparina, ADN, detergente, etc.) que influían sobre la emisión de las sondas fluorescente (BrEt o Picogreen®) como ocurría en las experiencias de centrifugación anteriores, lo que dificultaba en gran medida la interpretación de los resultados. Una muestra de lipopoliplojeo adicionada de detergente, heparina, etc., queda "limpia" de estos reactivos en el transcurso de la migración electroforética, ya que estos también migrarán a distinta velocidad hacia los polos positivo o negativo según la carga eléctrica que tengan, separándose cada uno de los componentes de la mezcla que había en el pocillo.

Sin embargo, nuestra técnica electroforética solo permite el análisis de lipopoliplojeos realizados con liposomas pequeños, de tamaño inferior a 100 nm, como los SUV o liposomas tallados mediante extrusión en filtro. Tales liposomas, si bien no plantean limitaciones en cuanto al transporte de materiales hidrofóbicos insertos en sus membranas, no son los más adecuados en cuanto a la encapsulación de moléculas hidrosolubles, como proteínas antigénicas y otras sustancias que se situarían en el core liposomal. Los rendimientos de encapsulación de estos liposomas suelen ser bajos, y en consecuencia están limitados en cuanto a la cantidad de material que pueden transportar. Se hacía necesario el desarrollo de otra técnica analítica, que permitiera caracterizar lipopoliplojeos formados por otro tipo de liposomas de diámetro mayor, tales como los FT-MLV o los DRV, los cuales presentan excelentes rendimientos de encapsulación de proteínas (cerca del 100%); y por tanto son más adecuados para lipopoliplojeos que transportan antígenos proteicos hidrosolubles, por ejemplo. En resumen, el ensayo muestra que se ha formado un complejo (el

LPP), entre los liposomas y los poliplejos, que es incapaz de migrar a través del gel de agarosa, quedando retenido en el pocillo. Al tratar el LPP con heparina, la destrucción del poliplejo ADN/PEI libera el plásmido, que aparece como una banda fluorescente anaranjada por la presencia de BrEt en el gel; y también se liberan los liposomas SUV (CF) que forman el complejo, apareciendo como una banda de fluorescencia verde bajo iluminación por luz ultravioleta. De esta forma, los dos componentes principales del LPP, el plásmido y el liposoma, son separables e identificables electroforéticamente.

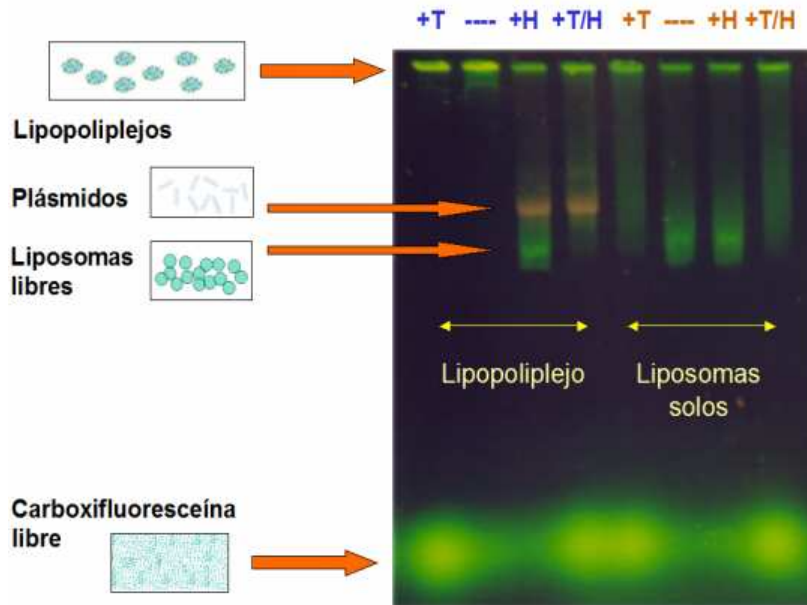


Figura 32. Interpretación del análisis electroforético del lipopolipolejo. Las líneas 1 a 4, desde la izquierda, muestran el LPP. Las líneas 5 a 8 son liposomas solos. Ambos grupos, LPP y liposomas, fueron cargados en el gel con: Triton X-100 (+T), con sólo tampón (---), con heparina (+H) y con Triton y Heparina (+T/H).

Determinación de la relación óptima entre liposomas y poliplejos. Se prepararon lipopolipolejos a partir de un volumen fijo de una solución de poliplejos de 0.5

μg de ADN y cantidades variables de liposomas SUV(SM:CH:DP) que encapsulaban la sonda fluorescente verde carboxifluoresceína. Las distintas preparaciones de LPP muestran en la electroforesis las bandas correspondientes a los liposomas que están en exceso y no constituyen parte del LPP (figura 33). Las muestras de LPP preparadas con la menor cantidad de liposomas no liberan liposomas al gel (no aparece la banda de fluorescencia libre) y consideramos que ello define la relación óptima entre liposomas y poliplejos para la preparación del vector sin exceso de liposomas libres. Esta relación es, para el vector utilizado (con formulación SM:CH:DP en relación molar 5:4:1 y poliplejos del plásmido pMOK con PEI y a una relación N:P de 10:1) de 0,1 μg de liposomas/ μg de ADN.

Para dar solidez a nuestra interpretación del experimento, la preparación de las diferentes soluciones de LPP se realizó mediante dos procedimientos distintos. En el primero, se utilizaron diluciones sucesivamente menores de una solución madre de liposomas, que se añadían en un mismo volumen (80 μl) al poliplejo para formar el complejo. En el segundo, se añadieron volúmenes decrecientes de la solución madre de liposomas al poliplejo. En todos los casos, la cantidad de poliplejo utilizada fue de 2 μl de poliplejo pMOK/PEI a 0,5 μg de ADN/ μl en 5%Glc. Los resultados para ambos tipos de preparaciones de LPP fueron similares: según disminuye la cantidad de liposomas utilizada en la preparación, disminuye la banda fluorescente verde del liposoma en el gel, hasta desaparecer en las muestras con menor cantidad de liposoma. Las muestras con LPP se sitúan en el bloque de la izquierda de cada gel; a la derecha están situados los controles de disociación del complejo con heparina, que rinden una banda de fluorescencia verde con la cantidad total de liposoma que se utilizó para la preparación de cada muestra.

En todos los casos, la cantidad de poliplejo utilizada fue de 2 μl de poliplejo pMOK/PEI a 0,5 μg de ADN/ μl en 5% Glc. Los resultados para ambos tipos de preparaciones de LPP fueron similares: según disminuye la cantidad de liposomas utilizada en la preparación, disminuye la banda fluorescente

verde del liposoma en el gel, hasta desaparecer en las muestras con menor cantidad de liposoma. Las muestras con LPP se sitúan en el bloque de la izquierda de cada gel; a la derecha están situados los controles de disociación del complejo con heparina, que rinden una banda de fluorescencia verde con la cantidad total de liposoma que se utilizó para la preparación de cada muestra (figura 33). La relación óptima, utilizada para los ulteriores estudios *in vivo* de inmunización con antígenos lipídicos con el lipopolipolejo, se sitúa en torno a 0,3 micromoles de líposomas/50 μ g de plásmido.

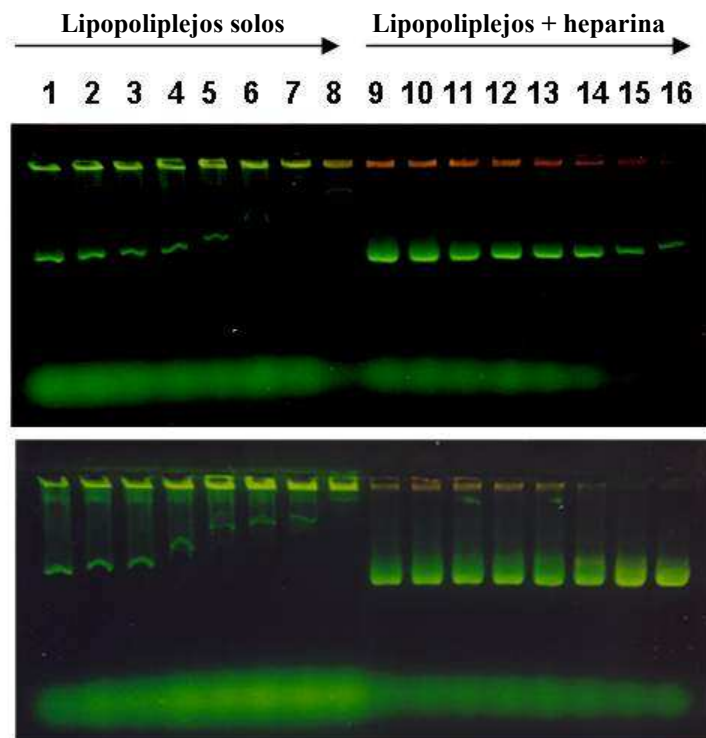


Figura 33 . Determinación de la relación óptima liposomas/poliplexos para formar el lipopolipolejo. Se preparó el lipopolipolejo a 8 relaciones diferentes de mezcla liposomas/poliplexos (1.20, 1.05, 0.90, 0.75, 0.60, 0,45, 0.30 y 0.15 μ m lípido/ μ g de ADN). Los lipopolipolejos de la electroforesis superior e inferior fueron preparados según dos procedimientos

diferentes. En el gel superior, se añadieron volúmenes decrecientes de una solución stock de liposomas a un volumen fijo de polipéptido de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN; en el gel inferior se utilizaron volúmenes iguales de soluciones de liposomas previamente diluidas sobre un volumen fijo de polipéptido de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN. Las carreras 1 a 8 se cargaron con muestras de lipopolipéptidos solos; las carreras 9 a 16 fueron cargadas con el lipopolipéptido preincubado con heparina. Las relaciones que contienen un exceso de liposomas muestran una banda de migración electroforética de color verde correspondiente a los liposomas libres que no han intervenido en la formación del lipopolipéptido.

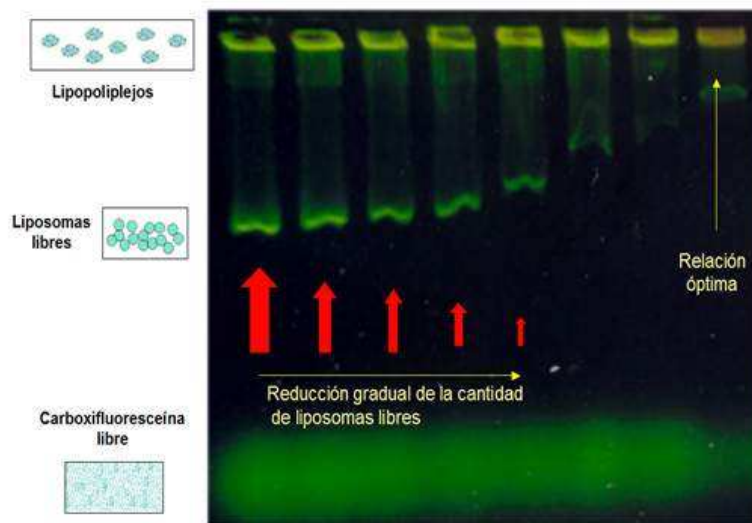


Figura 34. Determinación electroforética de la relación óptima liposomas/polipéptidos para formar el LPP. Las bandas de color verde en el seno del gel corresponden a liposomas libres que no han intervenido en la formación del LPP, indicando un exceso de liposomas a la relación de mezcla de preparación.

Interacción de liposomas catiónicos de DOTAP con el gel de agarosa. La interacción entre los liposomas SUV preparados con DOTAP y la agarosa gelificada puede demostrarse mediante centrifugación.

Para micronizar la agarosa se sometió 5g de un gel de agarosa preparado al 0,8% a 4 ciclos de sonicación en sonda. El producto final tiene el aspecto de un líquido ligeramente viscoso y *granulado*. Después, 150 µl de esta suspensión de agarosa se mezclaron con 5µl de una suspensión de liposomas SUV, centrifugándose a continuación a 12000g x 10min. Las mezclas fueron fotografiadas bajo iluminación ultravioleta antes y después de centrifugar (figura 35). La experiencia se realizó con distintos liposomas SUV conteniendo DOTAP en su formulación, así como otras formulaciones usadas como control negativo:

DOTAP:CH 6:4
SM:DOTAP:CH 5:4:1
SM:CH 6:4
SM:CH:DP 5:4:1

Los liposomas fueron marcados con la sonda fluorescente pireno antes de su utilización. En las dos formulaciones con DOTAP (figura 36), el pellet obtenido muestra fluorescencia tras iluminación ultravioleta, pero no en las formulaciones con SM. Una experiencia similar, pero adicionando 1850 µl de diferentes tampones antes de centrifugar (figura 37), mostró idéntico resultado: los pellets de agarosa se tornaban fluorescentes, indicando que la interacción no tiene que ver con el pH y por tanto con el grupo catiónico del DOTAP.

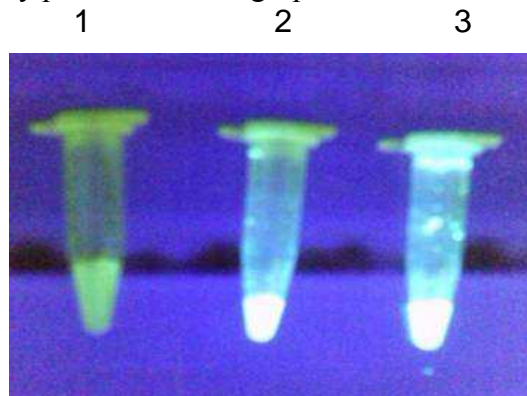


Figura 35. Visualización en el transiluminador UV de liposomas marcados con sondas fluorescentes en la membrana. Liposomas sin marcar (1), marcados con la sonda NPN (2), y marcados con pireno (3).

La agarosa es fundamentalmente un polímero sulfatado compuesto principalmente de ácido D-glucurónico, extraído de ciertas algas. Las diferentes agarosas comerciales utilizadas para geles electroforéticos presentan una cierta variedad en cuanto a la composición, dependiendo de su fuente de origen, método empleado para su extracción y purificación, etc., y una posibilidad es que alguno de los componentes de nuestra agarosa fuese el responsable de la interacción con el DOTAP, por lo que simplemente eliminándolo del gel (cambiando a otra agarosa de diferente composición) la técnica electroforética podría funcionar con los liposomas de DOTAP. Para explorar esta posibilidad, realizamos algunas experiencias adicionales, en la que se mezclaban agarosa micronizada y liposomas de DOTAP marcados fluorescentemente, separando luego la agarosa del sobrenadante por centrifugación. Se utilizaron distintas agarosas comerciales de diferente composición, pero en todas ellas se obtuvo interacción con los liposomas de DOTAP (figura 38).

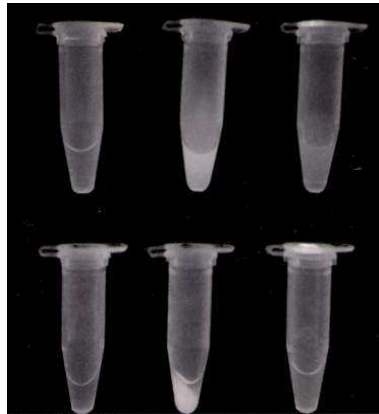


Figura 36. Interacción agarosa-DOTAP. Una suspensión de agarosa gelificada y micronizada se mezcló con una solución de pireno (a), con una suspensión de liposomas SUV-DOTAP:CH marcados con pireno (b), o con liposomas SUV SM:CH:DP marcados con pireno (c). La figura muestra el aspecto de las mezclas bajo iluminación UV en un transiluminador, antes de centrifugar (fila superior) y

después de centrifugar a 15000 g x 10 min (fila inferior). Sólo en el caso de los liposomas de DOTAP (b), aparece fluorescente el sedimento de agarosa. Aunque en la fotografía bajo iluminación UV en un transiluminador sólo se aprecia el pellet central, los tres sedimentos resultaban perfectamente visibles bajo luz natural.

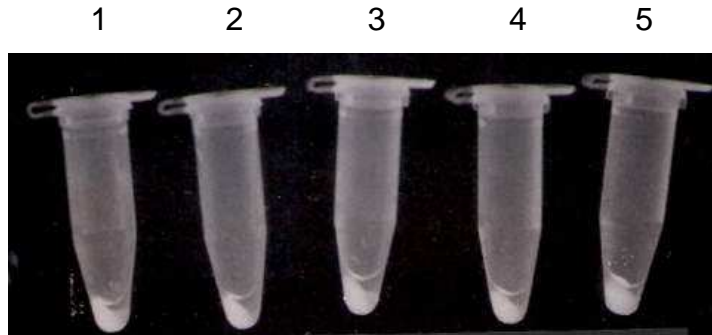


Figura 37. Interacción entre el gel de agarosa y liposomas de DOTAP a diferentes pH. Después de centrifugar (15000 g x 10 min) los pellets aparecen fluorescentes bajo iluminación UV, indicando la interacción entre los liposomas SUV (DOTAP:CH) marcados con pireno y el gel de agarosa. De izquierda a derecha, 1) tampón PIPES (pH 6.5), 2) MOPS (pH 7.5), 3) HEPES (pH 8.0), 4) agua, y 5) Glicina de Sorensen II (pH 10).

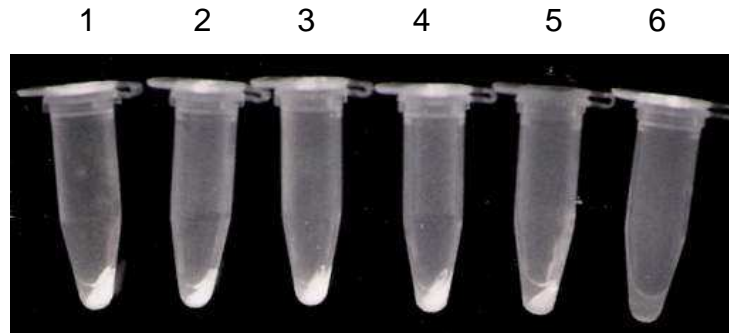


Figura 38. Interacción entre liposomas de DOTAP y distintas agarosas comerciales de diferente composición. (1 a 5): liposomas SUV (DOTAP:CH) marcados con pireno mezclados con distintas agarosas y centrifugados (15000 g x 10 min) y (6) liposomas solos (como control negativo).

3.2.6 Caracterización del LPP por centrifugación

Caracterización del Lipopoliplojejo por centrifugación con liposomas encapsulando cloruro de cesio

Las experiencias de centrifugación iniciales no dieron los resultados esperados, debido a las dificultades en la separación por centrifugación de los liposomas y poliplojejos. Una posible solución, para conseguir una separación limpia y eficaz de ambos componentes, consiste en aprovechar las propiedades de encapsulación de sustancias por los liposomas para proporcionarles una mayor densidad. El Cesio (Cs) es el elemento más pesado de la serie de los metales alcalinos (número atómico 55, peso atómico 132905 uma). Sus sales más hidrosolubles, como el CICs ($M_w=168.36\text{g/M}$), pueden constituirse como soluciones de elevada densidad, debido a su alto peso atómico y su elevada hidrosolubilidad. El cloruro de cesio (CICs) encapsulado en un liposoma aporta un incremento importante en su densidad, permitiendo su sedimentación a fuerzas de campo centrífugo inusualmente bajas. Al tratarse de una sustancia iónica, muy soluble en agua y de pequeño tamaño, es presumible que no genere problemas en cuanto a su encapsulación, quedando retenida en el interior del compartimento acuoso del liposoma por su naturaleza iónica. Además, la densidad de una solución de CICs depende de su concentración, de manera que las soluciones son más densas cuanto más concentrado está (ver tabla 3). El límite de solubilidad acuosa del CICs se sitúa un poco por encima de 7M.

Conc.	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M
ρ (g/ml) a 25°C	1.1242	1.2496	1.3737	1.4968	1.6189	1.7413	1.8622

Tabla 3. Densidad de las soluciones acuosas de CICs en el rango de concentraciones de 1 a 7 Molar.

Una serie de experiencias iniciales condujo a elegir una concentración de trabajo de 1M, puesto que se comprobó que era suficiente para permitir una eficaz sedimentación a baja fuerza de campo. Los liposomas más pequeños, de tipo SUV, son los que requieren mayores fuerzas de campo para lograr su sedimentación, así que se eligieron como referencia para desarrollar la técnica del CICs. Para determinar qué concentración mínima de CICs permitía la sedimentación a baja fuerza de campo centrífugo de liposomas de tipo SUV, se realizó el siguiente experimento (figura 39).

Se prepararon seis soluciones de liposomas SUV (SM:CH:DP) encapsulando una mezcla de carboxifluoresceína a 1 M y CICs a concentraciones 5, 3, 2, 1, 0,5 y 0,25 M. Las soluciones se centrifugaron a baja fuerza de campo (85 g x 15 min) y se midió la fluorescencia de la carboxifluoresceína en el sobrenadante antes y después de centrifugar a 15000 g x 20 min y a 85 g x 15 min, previo tratamiento con Triton X-100, para liberar la sonda fluorescente del liposoma. La centrifugación a 15000 g x 20 min se realizó como control positivo, pues es conocido que en estas condiciones el liposoma SUV sedimenta totalmente. A 85 g x 15 min la concentración de trabajo de CICs más baja de entre las testadas que produce la sedimentación total de los liposomas fue de 1M.

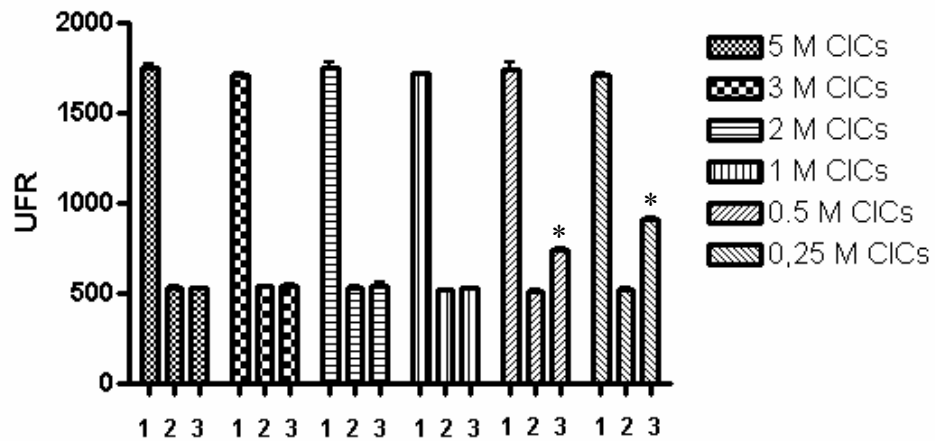


Figura 39. Determinación de la concentración óptima de CICs para las experiencias de centrifugación de lipopoliplexo a baja fuerza de campo. Se prepararon seis suspensiones de liposomas SUV (SM:CH:DP) encapsulando una solución de carboxifluoresceína 1mM y 5, 3, 2, 1, 0.5 ó 0.25 M de CICs. Se midió la fluorescencia de la carboxifluoresceína (previo tratamiento con Triton X100 para destruir los liposomas) antes de centrifugar (barras de la izquierda), después de centrifugar a 15000 g x 20 min (barras centrales) y después de centrifugar a 85 g x 15 min (barras de la derecha). Los datos se expresan como medias \pm SEM de triplicados (* $p < 0,05$ 15000 g vs.85 g).

Mediante la nueva técnica de las suspensiones de liposomas encapsulando CICs 1M, se consiguió finalmente caracterizar los lipopoliplexos por centrifugación a baja fuerza de campo centrífugo (ver figura 40). Que evitaba que los poliplexos ADN/PEI sedimentaran, tal como ocurría en las experiencias preliminares.

La nueva técnica rindió, además, un resultado inesperado. Las experiencias con CICs mostraban un descenso brusco en la fluorescencia cuando la cantidad de liposomas añadida superaba cierto umbral, mientras que para cantidades

menores de liposomas añadido no se evidenciaba un descenso en la fluorescencia.

Afinando más el rango de variación de concentraciones del experimento, incrementando más finamente las cantidades de liposomas añadidas, se comprobó que el lipopoliplexo se formaba bruscamente a partir de cierto umbral de concentración de liposomas (figura 41). Es decir, la formación del complejo parece ser un fenómeno tipo “todo o nada”, en el que antes de cierta relación umbral de concentración, el lipopoliplexo no se forma, pero a partir de este umbral el poliplexo reacciona en su totalidad con los liposomas para formar el complejo.

Este resultado apunta hacia la existencia de un fenómeno de cooperatividad en la formación del complejo entre liposomas y poliplexos.

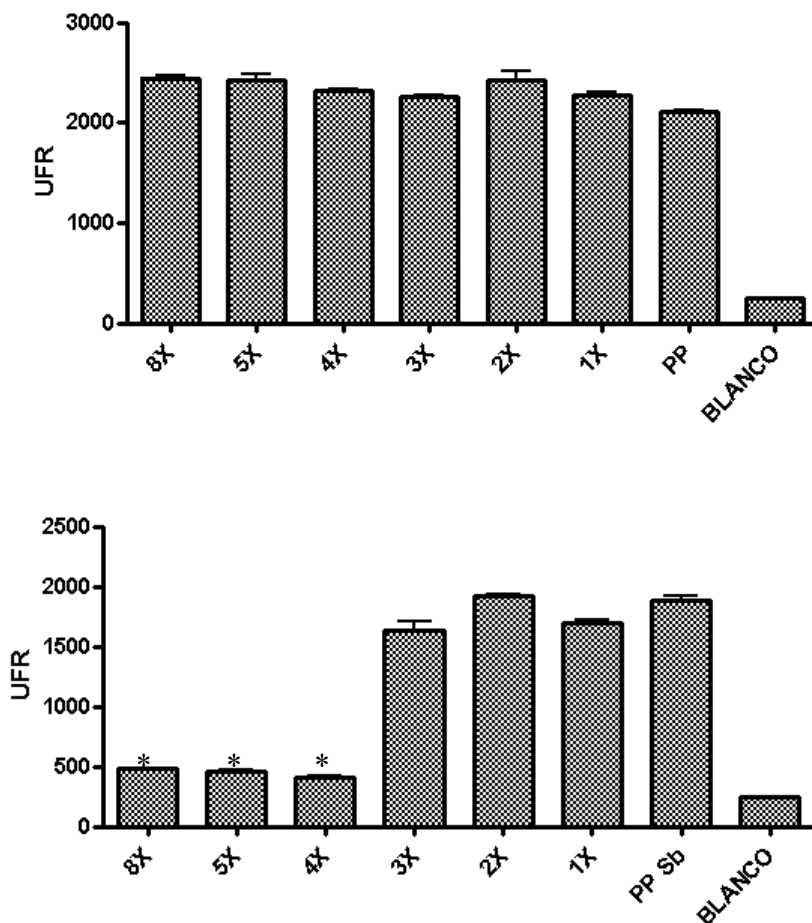


Figura 40. Caracterización de la formación del lipopoliplejo con liposomas cargados con CICs. El lipopoliplejo se formó a partir de una cantidad constante de poliplejos ADN/PEI a los que se adicionó una cantidad variable (1, 2, 3, 4, 5 y 8 veces superior) de una suspensión de liposomas 0,1M $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ SUV SM:CH:DP encapsulando CICs. Los gráficos muestran la fluorescencia de alícuotas tratada con heparina y triton X-100 para deshacer el lipopoliplejo, y adicionada de bromuro de etidio para cuantificar la fluorescencia procedente del ADN liberado. El gráfico superior muestra la fluorescencia del ADN presente en la muestra, antes de centrifugar. El gráfico inferior muestra la fluorescencia del ADN presente en el sobrenadante tras centrifugar la muestra a baja fuerza de campo (100 rpm x 15 min). Existe un salto brusco entre los lipopoliplejos preparados con 3x y 4x volúmenes de la suspensión de liposomas madre 1x, indicativo del rango en el que tiene lugar la

formación del lipopoliplejo. Los datos se expresan como medias \pm SEM de triplicados (* $p < 0,05$ 3x vs. 4x, 5x, 8x).

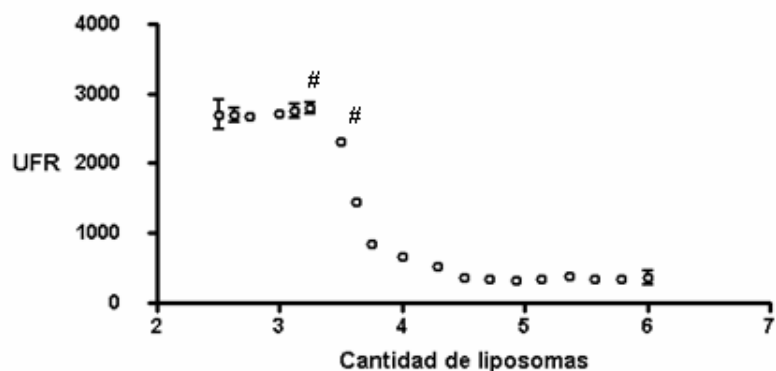


Figura 41. Determinación de la formación de lipopoliplejo con liposomas MLV-FT cargados con CICs. Volúmenes iguales de solución de poliplejo (0.5 μ g ADN/ml) se mezclaron con cantidades crecientes de liposomas MLV-FT cargados con CICs 1M para formar el lipopoliplejo a diferentes relaciones de mezcla liposomas/poliplejos. Tras centrifugar la muestra a bajo campo (100 rpm x10 min), se midió la fluorescencia del ADN del sobrenadante (previa adición de heparina y bromuro de etidio). Al aumentar la cantidad de liposomas añadidos, hay una cierta relación de mezcla en la que se forma el lipopoliplejo, que se evidencia en un salto brusco en la fluorescencia del sobrenadante. Los datos se expresan como medias \pm SEM de triplicados (# $p < 0,05$ 6 vs. 3,25 y 3,50).

Caracterización de lipopoliplejo con CICs y carboxifluoresceína. La siguiente técnica fue diseñada a objeto medir las relaciones de formación liposomas/poliplejos del LPP inicial y final, en una técnica completa de caracterización válida para cualquier tipo de liposoma y cualquier tipo de poliplejo ADN/polificación. Por ejemplo, los lipopoliplejos formados con poliplejos preparados con otros polímeros catiónicos en uso en transferencia génica no viral, como polilisina o protamina, o con cualquier otro tipo de liposoma o elemento vesicular

(como exosomas, o preparados liposomales procedentes de procesados de membranas celulares, etc.) podrían en principio ser caracterizados mediante este mismo procedimiento.

Se prepararon lipopoliplos a diferentes relaciones liposomas/poliplos (figura 42) utilizando un volumen fijo de poliplo de concentración 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN al que se adicionaban diferentes cantidades de una suspensión de liposomas “mixta” compuesta por liposomas que encapsulaban CF y liposomas que encapsulaban CICs. La mezcla estaba constituida por un 98% de liposomas FT-MLV encapsulando CF 50 mM; y un 2% de liposomas FT-MLV encapsulando CICs 1M. La composición de los liposomas era SM:CH:DP (5:4:1) y la mezcla final estaba a una concentración de 0,1 μM lípidos.

Se midió la fluorescencia en placa de la CF de alícuotas de los lipopoliplos antes y después de centrifugar a 15000 g x15min (tomándose en este caso las alícuotas de 2 μl de los sobrenadantes).

Las muestras trataron con el detergente triton X-100 para destruir los liposomas y liberar la CF encapsulada, comparándose las medidas de fluorescencia de la CF de los sobrenadantes antes y después de centrifugar. Como control, se utilizaron muestras de liposomas solos, preparadas igual que las anteriores pero sustituyendo el poliplo por un volumen igual de glucosa al 5%.

Las curvas de la fluorescencia de la CF en el sobrenadante de los LPP (rojo) y los liposomas control (azul) discurren superpuestas cuando la relación liposomas/poliplos es baja, sin embargo hay un descenso acusado de la fluorescencia a partir de la relación 0,01 $\mu\text{moles lípido}/\mu\text{g ADN}$, que se recupera de nuevo a partir de aproximadamente 0,03 $\mu\text{moles}/\mu\text{g}$ (el punto exacto no sale definido con precisión en las relaciones usadas en el experimento). A partir de este punto, las curvas de LPP y liposomas solos control discurren

de nuevo de forma paralela. La interpretación de la curva obtenida se encuentra en la figura 43. A relaciones bajas liposomas/poliplejos, ambos componentes no reaccionan entre sí, hasta que se llega a una relación umbral en que se produce la formación completa del lipopolipolejo. A partir de cierto punto, la relación liposomas/polipolejo es la máxima posible, y comienzan a aparecer liposomas en exceso libres que no forman parte del lipopolipolejo.

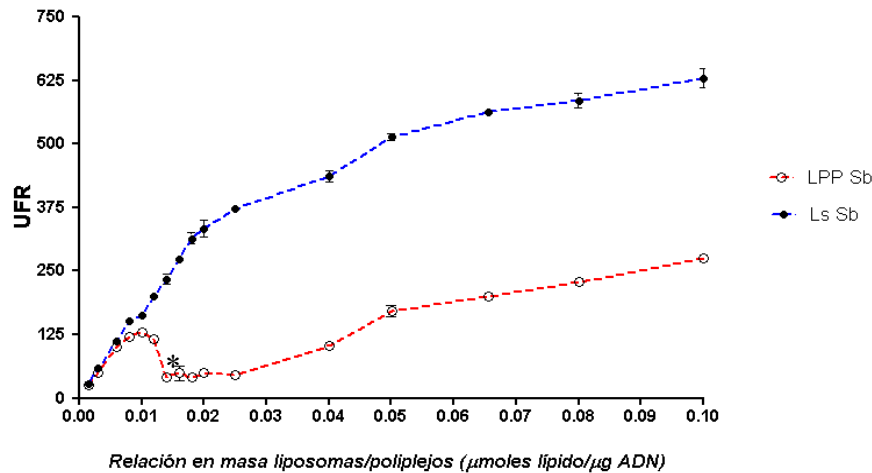


Figura 42. Relación de formación del lipopolipolejo, técnica de medida por fluorescencia. A partir de una solución madre de liposomas (Ls) compuesta por un 98% de liposomas encapsulando carboxifluoresceína y un 2% de liposomas encapsulando CICs 1M (98% de MLV-FT(CF) y 2% de MLV-FT (CICs)), se prepararon una serie de diluciones decrecientes que fueron mezcladas con volúmenes iguales de solución de polipolejo (0.5 mg ADN/ml) para formar el lipopolipolejo (LPP) a diferentes relaciones en masa liposomas/poliplejos (línea roja); o bien con volúmenes iguales de solución de glucosa al 5% como control negativo (línea azul). Después de centrifugar a baja fuerza de campo (100 rpm x10 min), se mide la fluorescencia del sobrenadante (Sb) previa adición de TX100 y heparina para liberar la carboxifluoresceína encapsulada. Los datos se expresan como medias \pm SEM de triplicados. (* $p < 0,05$ 0.010 vs 0.0125, 0.015, 0.018, 0.02, 0.025 μ moles lípido/ μ g ADN).

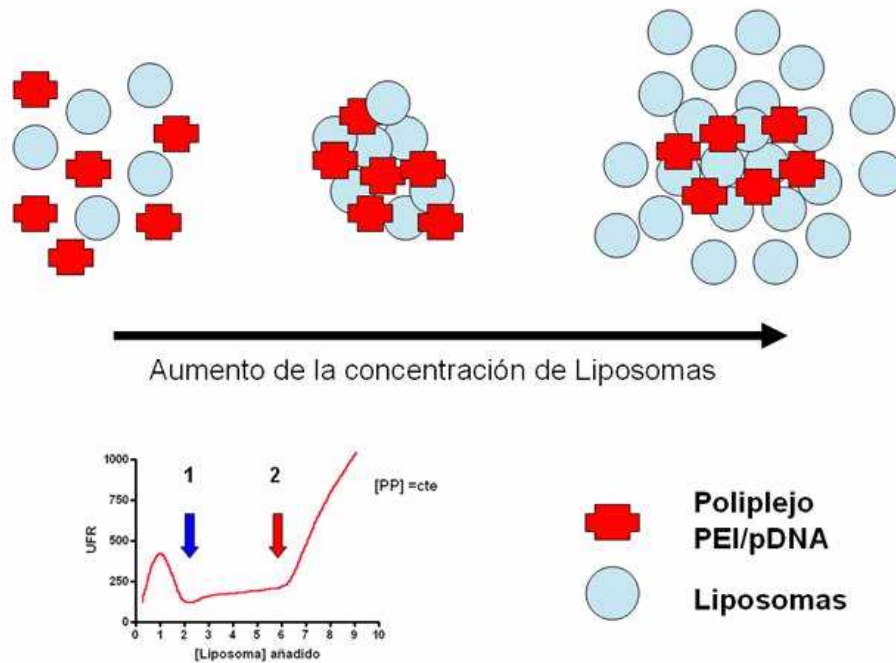


Figura 43. Experiencias de caracterización de los lipopoliplexos por fluorescencia: interpretación de la curva de fluorescencia. Existe una relación umbral mínima entre los liposomas y el polipéptido para que se forme el lipopoliplexo (1). Según va aumentando la concentración de liposomas, a partir del punto (2) se encuentran en exceso, y vuelve a aumentar la fluorescencia.

3.2.7 El LPP como vector tricompartmental

Entrega de antígenos hidrosolubles situados en el core liposomal: biodistribución en bazo. Las imágenes de microscopía de fluorescencia confocal (figura 44) muestran un acumulo de la fluorescencia del yoduro de propicio (IP) en las zonas de los senos marginales de los nódulos del bazo. Esta fluorescencia aparece con una distribución similar, pero algo menos intensa, en el caso de los animales inyectados con liposomas MLV; y no aparece en los animales inyectados con la solución de IP en glucosa control. El IP es una molécula hidrosoluble, que no atraviesa

membranas celulares *per se*. Esta molécula emite luz roja visible bajo iluminación UV cuando está unida al ADN. La aparición de zonas de fluorescencia roja se interpreta como el acceso del colorante IP al ADN del núcleo de células mediado por un transportador (liposomas o lipopoliplexos, en nuestro caso). La distribución de la fluorescencia en la zona marginal de los nódulos del bazo coincide con la localización anatómica de poblaciones de macrófagos, y es indicio de que el lipopoliplexo o los liposomas han sido incorporados por estas células presentadoras de antígeno (Aliño *et als*, 1989).

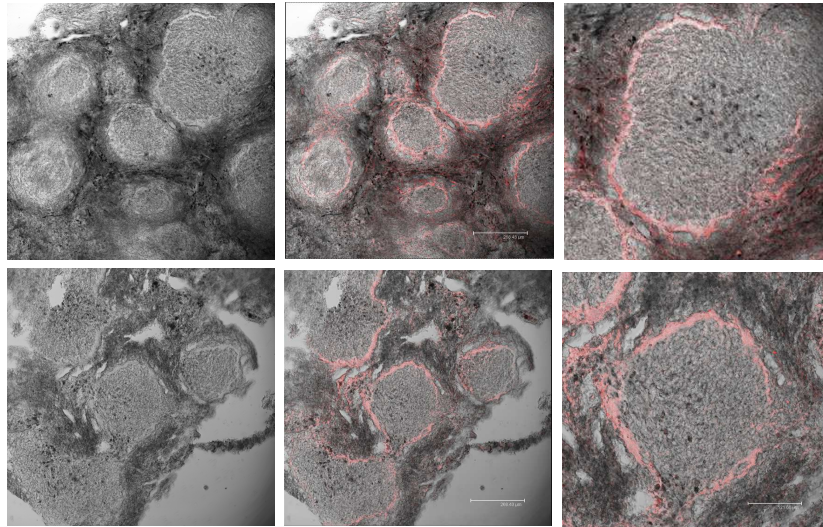


Figura 44. Distribución intraesplénica del lipopoliplexo administrado por vía IV. Se administró a los animales por la vena de cola Ioduro de propidio (IP) encapsulado en liposomas MLV (fotografías superiores) o bien en liposomas SUV formando parte del lipopoliplexo SUV/pMOK/PEI (fotografías inferiores), examinándose cortes histológicos por criosección de los bazos de los animales sacrificados una hora y media después de la administración de la dosis. Las fotografías centrales muestran la fluorescencia del IP acumulada en la zona de los senos marginales de los nódulos esplénicos; a la derecha se muestra un detalle ampliado. La composición en ambos tipos de liposoma fue SM:CH:DP en relación molar 5:4:1. La barra de escala de las fotografías centrales indica 268,4 μ m.

En estas experiencias, se puso de manifiesto que el LPP tiene cierta toxicidad sistémica. La inyección directa por vena de la cola en ratón causa en algunos casos convulsiones en el animal y, más raramente, pérdida de conciencia, segundos después de la administración. Pero estos efectos remiten espontáneamente en un tiempo muy breve, aparentemente sin secuelas.

Entrega de antígenos liposolubles por el LPP

Para comprobar la entrega de antígenos lipídicos situados en la membrana liposomal, se prepararon dos tipos de lipopoliplos (SUV(SM:CH:DP o PC:CH):PEI/p3CEGFP) con un lípido fluorescente marcado con FITC en su cabeza polar que intervenía en baja proporción (10%) en la formulación, formando parte de la membrana del liposoma. Los lipopoliplos se ensayaron adicionándolos sobre células B16 cultivadas en placa de 24 pocillos. Tras una hora y media, se lavaban las células y se medía la fluorescencia de las células en un fluorímetro equipado con lector de placas, comparándolas respecto a los controles de lipopoliplo constituido con liposomas sin el lípido fluorescente (datos no mostrados). Sin embargo las diferencias de fluorescencia entre los tratados y controles resultaron mínimas, sin significación estadística, debido a la poca intensidad de emisión de la sonda fluorescente, adecuada para la detección en un sistema de citometría de flujo (el uso común de este reactivo) pero no suficiente para un lector de fluorescencia de placas.

Entrega de genes: transfección tisular del gen de la citoquina GM-CSF con el lipopoliplo. La siguiente experiencia tuvo como objetivo comprobar la capacidad para transferir *in vivo* el material genético del componente plasmídico del lipopoliplo. Los animales se dispusieron en grupos de dos por jaula, con un total de veinte repartidos en diez grupos (jaulas). Se inyectó en la pata derecha de cada animal en el área inguinal por vía subcutánea una dosis de LPP, sacrificándose a las 48 horas o 7 días para extraer el

ARNm del tejido (piel y músculo inmediatamente subyacente al lugar de inyección) y cuantificar el ARNm específico del gen del GM-CSF en el extracto de ARN total.

En la siguiente tabla se muestran los grupos experimentales distribuidos en dosis y formulación de lipopolíplejos utilizado:

GRUPOS DE TRANSFECCIÓN TISULAR

1	LPP SM:CH:DP/ pMOK GM-CSF	50µg
2	LPP SM:CH:DP/ pMOK GM-CSF	10µg
3	LPP SM:CH/ p2F GM-CSF	50µg
4	LPP SM:CH/ p2F GM-CSF	10µg
5	CONTROL NEGATIVO	5% Glc

Los procedimientos de preparación de los lipopolíplejos fueron los siguientes:

Dosis de 50 µg de ADN

1) 250 µl de pMOK o P2F (1 µg/µl) en 5%Glc + 250 µl de PEI(1,4 µg/µl) en 5%Glc = 500 µl de solución de PP ---> 15' incubación

2) adición de 110 µl de liposomas SM:CH:DP 5:4:1 (cantidad necesaria previamente calculada para esa cantidad de PP, mediante la técnica de centrifugación con CICs, a partir de una suspensión de liposomas de 0,1 µmoles lípido/ml)

3) se obtiene un volumen final de 610 µl de LPP; incubar durante 90 min a T^a ambiente antes de administrar (122 µl/ratón)

Dosis de 10 µg de ADN

- 1) 50 µl de pMOK o P2F (1 µg/µl) en 5%Glc + 50 µl de PEI (1,4 µg/µl) en 5%Glc = 100 µl de solución de PP ---> 15' incubación
- 2) adición de 22 µl de liposomas SM:CH:DP 5:4:1 (cantidad necesaria previamente calculada para esa cantidad de PP, mediante la técnica de centrifugación con CICs, a partir de una suspensión de liposomas de 0,1 µmoles lípido/ml preparada con 25 µmoles lípidos totales y 250 µl de agua milliQ estéril).
- 3) completar al mismo volumen que el anterior mediante adición de 488 µl de 5%Glc
- 4) se obtiene un volumen de 610 µl de LPP; incubar durante 90 min a T^a ambiente antes de administrar (122 µl/ratón)

El objetivo del experimento consiste en evaluar la eficacia de transfección *in vivo* del lipopoliplexo con el gen de la citoquina GM-CSF incorporado en dos plásmidos distintos (pMOK y p2F). Se comparan las eficacias de transfección por vía subcutánea de dos lipopoliplexos a dos dosis diferentes de ADN:

- 1) SUV(SM:CH:DP):PEI/pMOK-GM-CSF a 50 µg o 10 µg de ADN
- 2) SUV(SM:CH:DP):PEI/p2F-GMCSF a 50 µg o 10 µg de ADN

Se midió la expresión del gen de la citoquina GM-CSF a las 48 horas o 7 días mediante RT-PCR. Como control negativo se utilizó medio de vacunación sólo (5% Glc). Las dosis de lipopoliplexo empleadas contenían 0,3 µmoles de lípido y 50 µg o 10 µg de ADN por ratón. Los animales se distribuyeron en jaulas a razón de 2 ratones/grupo (20 animales en total). Las diferencias en expresión del ARNm de la citoquina GM-CSF con respecto a un gen de referencia (GAPDH) se

evalúan de acuerdo al método de las $\Delta\Delta Ct$ (Botella-Estrada, R., F. Dasí et al 2005).

	$2^{- (\Delta\Delta Ct)}$	
	48 horas	7 días
LPP pMOK GMCSF 50	1	290
LPP pMOK GMCSF 10	3	4
LPP p2F GMCSF 50	53	177
LPP p2F GMCSF 10	1	136
5% Glc	n.d.	0

Tabla 4. Resultados de las experiencias de transfección tisular con el lipopoliplexo constituido con los plásmidos pMOK y p2F. Los valores se muestran como las medias de duplicados.

Los lipopoliplexos constituidos con los dos plásmidos son capaces de transfectar y expresar el ARNm de la citoquina GM-CSF, pero curiosamente en el constituido por pMOK en la dosis de 10 μg la expresión es mucho menor que en el resto. Otro resultado inesperado es la expresión más temprana (a 48 horas) en el p2F a 50 μg que en el pMOK, ya que el promotor de este plásmido es más lento que el del pMOK.

3.3. Ensayos de funcionalidad *in vivo* de los vectores

El LPP es capaz de transportar tanto antígenos liposolubles como hidrosolubles, por lo que una de sus posibles aplicaciones es la de vehículo para inmunización con antígenos. Para probar su uso en inmunización antitumoral, el LPP se cargó con antígenos hidrosolubles (proteínas de

membrana tumoral) y liposolubles (el lípido GD3), utilizándose en ensayos de vacunación contra tumor en modelo de ratón.

3.3.1. Inmunización con antígenos lipídicos situados en la membrana liposomal (gangliósido GD3)

A. Estudio de la respuesta inmunológica humoral inducida por el lipopoliploje con el antígeno GD3.

Los resultados de las técnicas de caracterización anteriores nos permitieron preparar el vector lipopoliploje según una formulación definida que correspondía a una relación óptima liposomas/poliplojes de 0,3 micromoles de liposomas/50 µg de plásmido (pero solo para los liposomas de tipo SUV, debido a la restricción de la técnica electroforética, que solo permite caracterizar este tipo de liposoma).

Para testar la eficacia del LPP como vector de vacunación, se eligió como modelo experimental el melanoma murino, y un antígeno tumoral de membrana, el lipopolisacárido GD3. Este antígeno es un lípido de membrana abundante en células de melanoma, que es un tipo de tumor bastante pobremente inmunogénico *per se*. El objetivo era despertar una respuesta humoral específica contra el antígeno GD3, testando para ello varias formulaciones de lipopoliploje.

Tres dosis de vacuna de 130 µl , conteniendo 0,03 micromoles de GD3 incorporados en la membrana del liposoma del LPP y 50 µg de plásmido pMOK, fueron administrados en el lomo del animal en los días 0, +20 y +40. Controles adicionales de liposomas solos conteniendo GD3, así como GD3 solo (suspensión micelar en 5% Glc) y solución de 5% Glc (como control negativo) fueron igualmente administrados. El componente poliploje se preparó con el plásmido pMOK y el PEI, en relación N:P de 10:1; a concentración final de ADN de 0,5 µg/µl.

El LPP fue preparado con dos formulaciones de liposomas (SM:CH:DP:GD3 en proporción molar 4:4:1:1 o SM:CH:GD en proporción molar 5:4:1) desde 25 micromoles de lípidos totales resuspendidos en 250 µl de

solución de glucosa al 5%, como se describe en el apartado “Material y Métodos”. Las correspondientes soluciones de liposomas MLV y SUV obtenidas fueron cuantificadas por el método colorimétrico de Stewartt; y fueron adecuadamente diluidas para, tras incubación con el poliplejo pMOK/PEI, obtener dosis finales de lipopoliplejo de 130 µl conteniendo 0,03 micromoles de GD3 y 50 µg de ADN. Como control, uno de los grupos fue tratado con una cantidad equivalente de GD3 en liposomas MLV, pero no se dispuso un grupo control con liposomas SUV-GD3 solos, ya que fue comprobado en un trabajo anterior (Masso, O., S. F. Alino, et al. 1996) que los liposomas pequeños SUV no estimulan la respuesta inmune. En la siguiente tabla, se especifican los 7 grupos de vacunación y el tipo de liposoma (MLV o SUV) y formulación utilizada (SM:CH:DP o SM:CH) en la preparación de cada lipopoliplejo.

TABLA DE GRUPOS DE VACUNACIÓN

	MLV	SUV
LIPOPOLIPLEJO SM:CH:DP:GD3/GMCSF	Grupo 1	Grupo 2
LIPOPOLIPLEJO SM:CH:GD3/ GMCSF	Grupo 3	Grupo 4
Liposomas SM:CH:DP:GD3	Grupo 5	---
Liposomas SM:CH:GD3	Grupo 6	---
Solución de glucosa al 5%	Grupo 7	---

Muestras de plasma sanguíneo fueron tomadas de cada grupo (200 µl por animal) antes de cada dosis de vacunación, y reunidas en un “pool” por grupo que fue analizado mediante ELISA, para caracterizar la respuesta inmune generada por la inmunización. Los resultados se reúnen en la siguiente tabla 5. Los datos están expresados como la dilución mínima de la muestra de plasma que produce niveles detectables del anticuerpo.

Como se indica en la tabla 5, el lipopoliplexo con formulación SUV [SM:CH:DP]/pGMCSF/PEI consigue un título elevado (1:800) de inmunoglobulinas, mayor que el que genera el correspondiente liposoma MLV-GD3 (1:200), con lo que el lipopoliplexo se muestra con una superior eficacia frente al liposoma para desarrollar respuestas inmunes como sistema de vacunación.

En cuanto a los isotipos específicos, destaca la producción de inmunoglobulinas IgG2a (figura 6). De nuevo, el LPP constituido con liposomas de tipo SUV consigue un título de IgG2a superior al resto de lipopoliplexos. Esta inmunoglobulina se relaciona con una posible activación de la respuesta celular, de interés máximo en inmunización antitumoral. Pues la inducción de respuestas humorales, mucho más frecuentes y fáciles de conseguir en el campo de la inmunización antitumoral, no resultan sin embargo suficientes para impedir el desarrollo o eliminar el tumor.

En cuanto a la especificidad de la respuesta, un ensayo de reactividad cruzada de los anticuerpos generados frente a otros antígenos similares (GM1, GM2, GM3, GD1b y GD2) demostró que la respuesta obtenida era muy específica, pues los plasmas no mostraron más que una escasa reactividad frente al gangliósido Gd1b (tabla7).

Dosis	Tipo de Inmuno-globulina	5% Glc	LIPOSOMAS			LIPOPOLIPLEJO			
		Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3	Grupo 2	Grupo 1	
1ª	IgM	0	1:25	1:50	1:25	1:25	0	1:100	
	IgG	0	0	1:100	1:50	1:100	1:50	1:100	
2ª	IgM	0	1:50	1:200	1:25	1:25	1:50	1:200	
	IgG	0	1:50	1:200	1:100	1:100	1:200	1:200	
3ª	IgM	0	1:50	1:100	1:100	1:50	1:50	1:100	
	IgG	0	1:100	1:200	1:100	1:200	1:200	1:800	

Tabla 5. Respuestas serológicas a la inmunización con el antígeno GD3 después de la 1ª, 2ª ó 3ª dosis de vacunación. Se inmunizó a los animales con liposomas que portaban el antígeno GD3 (SM:CH:GD3 o SM:CH:DP:GD3) o con lipopoliplexos que portaban GD3 y el gen de la citoquina GM-CSF incorporado en el plásmido pMOK. La titulación de las inmunoglobulinas anti-GD3 se realizó por ELISA y se expresa como la dilución más pequeña

de muestra que es capaz de proporcionar una señal de absorbancia de 0,100 o mayor. Ver grupos de vacunación en el texto (página 173).

	5% Glc	Liposomas		Lipopoliplejo			
		SM:CH:GD3	SM:CH:DP:GD3	SM:CH:GD3/pMOK		SM:CH:DP:GD3/pMOK	
		MLV	MLV	MLV	SUV	MLV	SUV
IgM	0	1:50	1:100	1:100	1:50	1:50	1:100
IgG total	0	1:100	1:200	1:100	1:200	1:200	1:800
IgG1	0	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25
IgG2a	0	1:25	1:25	1:100	1:100	1:200	1:400
IgG2b	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25
IgG3	0	1:100	1:200	1:50	1:50	1:200	1:200

Tabla 6. Caracterización de los isotipos específicos de inmunoglobulinas anti-GD3 obtenidas después de la 3ª dosis de vacunación. La titulación de las inmunoglobulinas se realizó por ELISA y se expresa como la dilución más pequeña de muestra que es capaz de proporcionar una señal de absorbancia de 0,100 o mayor.

IgG totales	Control negativo (5%Glc)	Liposomas		Lipopoliplejo			
		SM:CH:GD3	SM:CH:DP:GD3	SM:CH:GD3/pMOK		SM:CH:DP:GD3/pMOK	
		MLV	MLV	MLV	SUV	MLV	SUV
GD3	0	1:100	1:200	1:100	1:200	1:200	1:800
GM1	-	-	-	-	-	-	-
GM2	-	-	-	-	-	-	-
GM3	-	-	-	-	-	-	-
GD1b	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-
GD2	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 7. Especificidad de la respuesta inmunológica anti-GD3 en plasma de ratón después de la 3ª dosis de vacunación. La reactividad cruzada contra otros gangliósidos de estructura química similar al GD3 (GM1, GM2, GM3, GD1b y GD2) fue medida por ELISA a partir de diluciones 1:40 de las muestras obtenidas después de la 3ª dosis de vacunación. Las muestras de plasma exhibieron únicamente una ligera reactividad contra el antígeno GD1b, mientras que para el resto de antígenos la reactividad cruzada fue despreciable.

	Control negativo (5% glucosa)	Liposomas		Lipopoliplejo			
		SM:CH:GD3	SM:CH:DP:GD3	SM:CH:GD3/ pMOK		SM:CH:DP:GD3/ pMOK	
		MLV	MLV	MLV	SUV	MLV	SUV
WM-164	n.d.	49	n.d.	26	58	62	85
M21	n.d.	51	n.d.	31	62	68	82
Colo 125	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 8. Ensayo de citotoxicidad mediada por anticuerpo (*CDC assay*) con el plasma obtenido tras la 3ª dosis de vacunación contra células que expresan GD3. Muestras de plasma de los animales inmunizados fueron incubadas con células portadores de antígeno GD3 o una línea celular carente de GD3. Se utilizaron las líneas celulares GD3-expresadoras *WM-164* y *M21*, y la línea celular GD3-no expresadora *Colo 125* (como control negativo). Los resultados se expresan como porcentajes de citotoxicidad.

B. Experiencias de vacunación contra el melanoma con el gangliosido GD3 y el gen de la citoquina GM-CSF.

La experiencia anterior establece una formulación óptima del LPP, en cuanto a la generación de una respuesta inmune potente. En la siguiente experiencia, utilizamos esta formulación (SUV(SM:CH:DP:GD3)/pMOK-GM-CSF/PEI) para evaluar la eficacia del vector en un modelo de inmunización antitumoral de antígeno único (GD3) por medio de la inducción experimental de melanoma murino mediante la inyección de células tumorales que expresan el gangliosido GD3. La inmunización de los animales se realiza mediante la inyección subcutánea en la pata izquierda de tres dosis sucesivas de LPP. Como control se utilizan liposomas de tipo MLV cargados con el antígeno GD3. A diferencia del ensayo anterior, en el que utilizamos GD3 murino comercial (Calbiochem®), el GD3 utilizado en este ensayo fue el gangliósido humano.

1ª Vacunación: con 3 dosis de vacuna

Para comprobar la capacidad de inducir rechazo en tumores de melanoma que expresaban el antígeno GD3, se desarrolló un nuevo modelo experimental en ratón. La línea celular de melanoma modificada B2CF167H (donativo de Merck Farma y Química SA), fue obtenida mediante modificación genética de células de la línea celular de melanoma murino B16 y ulterior selección clonal de un clon alto expresador del gangliósido GD3. A partir de cultivos celulares de esta línea, se extrajo y purificó el antígeno GD3. Estas células y los extractos de GD3 fueron utilizados en el siguiente modelo experimental de inmunización antitumoral con el LPP. El ensayo se realiza a una dosis de antígeno de 0,03 micromoles de GD3 y 50 µg de plásmido conteniendo el gen de la citoquina GM-CSF.

Los ratones fueron inoculados en la pata derecha por vía subcutánea con células B2CF167H para inducir el desarrollo del tumor. Para la preparación de los lipopolisacáridos, se utilizaron los extractos de GD3 obtenidos a partir de cultivos celulares de clones productores del antígeno humano. Previamente a la inoculación del tumor, los animales fueron inmunizados con varias dosis de LPP-GD3, para tratar de inducir una respuesta inmunológica contra el antígeno GD3 que evite o disminuya el desarrollo tumoral.

Los datos medidos para evaluar la experiencia de inmunización son la inhibición del crecimiento del tumor implantado y la supervivencia final de los animales.

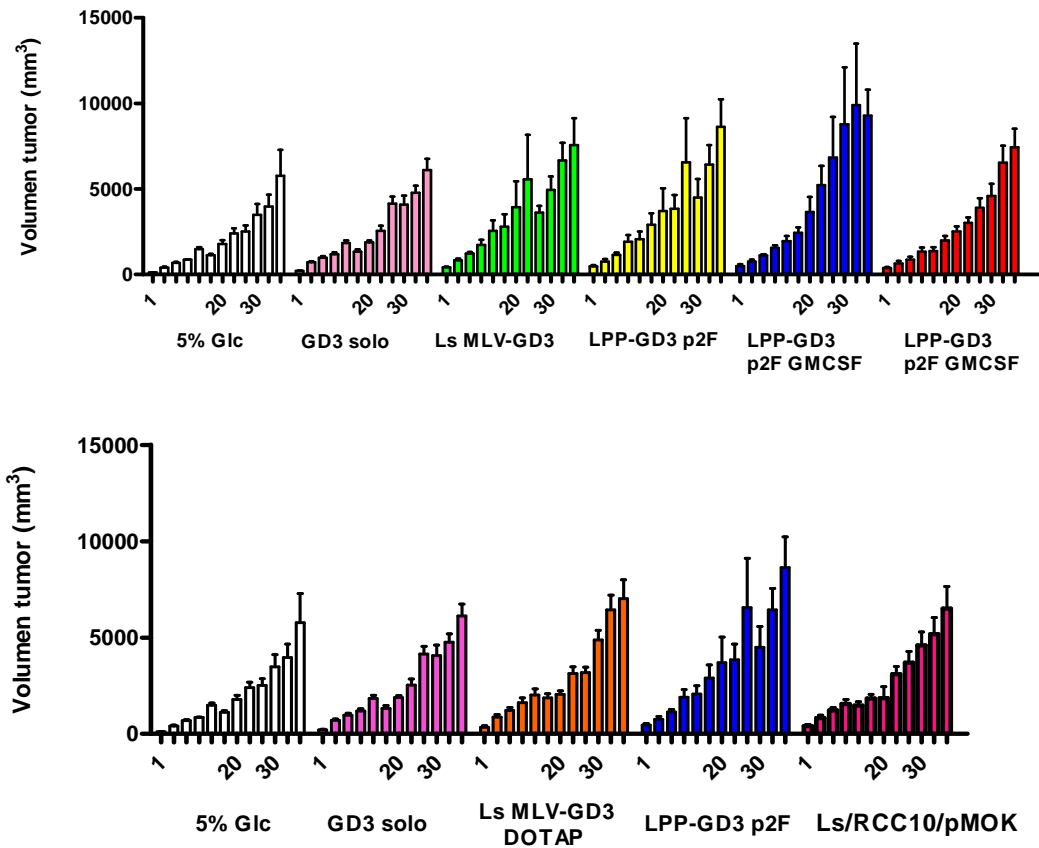


Figura 45. Evolución del volumen de tumor tras inmunización con 3 dosis de lipopolíplejos portando el antígeno GD3 y la citoquina GMCSF. La experiencia de vacunación se realizó administrando 3 dosis de vacunación con 0.003 μ moles antígeno GD3 y 50 μ g de ADN por ratón. Figura superior: inmunización con lipopolíplejo de pMOK-GM-CSF y GD3 (SUV(SM:CH:DP:GD3):PEI/pMOK-GMCSF) y lipopolíplejo de p2F-GM-CSF y GD3 (SUV(SM:CH:DP:GD3):PEI/p2F-GMCSF) y sus correspondientes controles: glucosa 5%, GD3 solo, liposomas MLV(SM:CH:DP:GD3) y lipopolíplejo con p2f sin inserto (SUV(SM:CH:DP:GD3):PEI/p2F). Figura inferior: inmunización con complejos de RCC10 con liposomas portando GD3 (SUV(DOTAP:CH:DP:GD3):RCC10/pMOK-GMCSF) y sus correspondientes controles: glucosa 5%, GD3 solo, liposomas MLV(DOTAP:CH:DP:GD3) y lipopolíplejo con p2F sin inserto (SUV(SM:CH:DP:GD3):PEI/p2F).

2ª Vacunación: con 6 dosis de vacuna

En el ensayo previo se administraron tres dosis de vacunación. Con objeto de intentar lograr una estimulación de la respuesta inmunológica más eficaz, en la siguiente vacunación se administraron seis dosis de LPP a los animales, separadas 14 días entre sí, portando cada dosis del vector 50 µg de GD3 y 10 o 50 µg de plásmido con el gen de la citoquina GM-CSF. Se utilizaron lipopoliplosos preparados con dos plásmidos distintos, pMOK y p2F, que contenían ambos el gen de la citoquina GM-CSF, para comprobar si este nuevo plásmido (p2F, Invitrogen) era capaz de proporcionar una mejor respuesta en cuanto a la capacidad para inducir la producción de anticuerpos y/o el rechazo del tumor.

Se administraron seis dosis subcutáneas de vacuna en la pata derecha trasera del animal conteniendo lipopoliplosos constituidos con liposomas SUV (SM:CH:DP:GD3) a relación molar 4:4:1:1; con totales de 0.03 µmoles lípido/ratón (0.003 µmoles GD3/ratón); y 50 µg ADN/ratón o 10 µg ADN/ratón. En todos los casos se utilizó solución de Glucosa al 5% como solvente para las dosis inyectables.

Los lipopoliplosos estaban constituidos por dos plásmidos vectores distintos, pMOK o p2F, conteniendo el gen de la citoquina GMCSF; y fueron ensayados a dos cantidades de ADN total por dosis de vacunación, 50 o 10 µg.

TABLA DE GRUPOS DE VACUNACIÓN

	50 microgramos ADN	10 microgramos ADN
Lipopoliploso SM:CH:DP:DP:GD3/pMOK	Grupo 2	Grupo 3
Lipopoliploso SM:CH:DP:GD3/ p2FGMCSF	Grupo 1	Grupo 4
Lipopoliploso SM:CH:DP:GD3/ p2Fvacío	Grupo 5	---
Liposomas MLV (SM:CH:DP:GD3)	Grupo 6	---
Solución de glucosa al 5%	Grupo 7	---

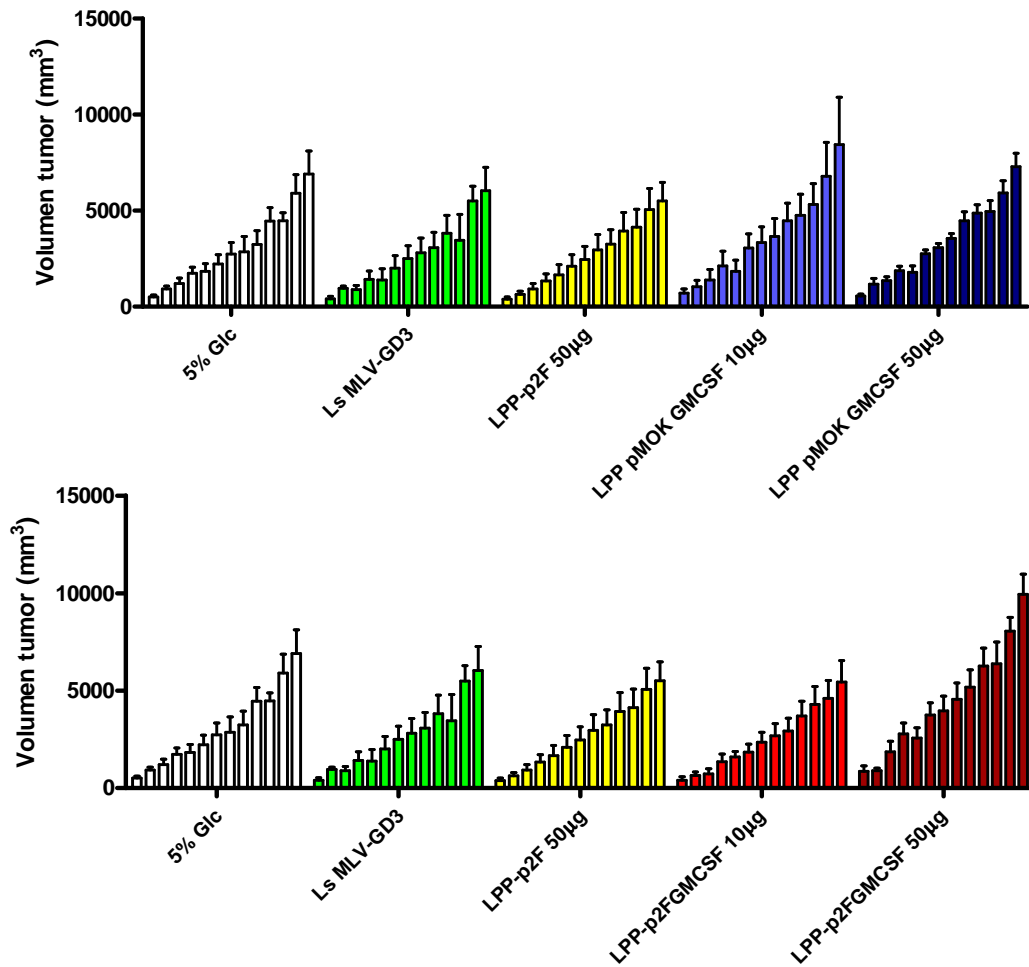


Figura 46. Evolución del volumen de tumor tras inmunización con 6 dosis de lipopolíplejos portando el antígeno GD3 y la citoquina GMCSF. La experiencia de vacunación se realizó administrando 6 dosis de vacunación con lipopolíplejos SUV(SM:CH:DP:GD3):PEI/pADN con 0.003 μ moles antígeno GD3 por ratón; y a 2 dosis de plásmido, de 10 o 50 μ g de ADN por ratón. Figura superior: grupos de inmunización con lipopolíplejos con el plásmido pMOK. Figura inferior: grupos de inmunización con lipopolíplejos constituidos con el plásmido p2F.

Como controles se utilizaron:

- Lipopoliplejo formado con plásmido p2F sin inserto del gen GM-CSF (grupo 5)
- Liposomas MLV con igual formulación que los anteriores (grupo 6)
- Solución de glucosa al 5% (grupo 7).

Los datos medidos para evaluar la experiencia de inmunización son la inhibición del crecimiento del tumor implantado y la supervivencia final de los animales.

Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por two-way ANOVA seguida del test de Bonferroni. Los resultados fueron negativos (no hay diferencias con significación estadística suficiente entre los grupos) excepto para el grupo LPP-p2FGM-CSF 50 μ g. Existe una diferencia muy significativa ($p > 0,001$) entre los grupos de lipopoliplejo con p2F GM-CSF en dosis de 50 μ g y el grupo de 10 μ g o el control sin el GM-CSF (LPP-p2F 50 μ g y LPP-p2FGM-CSF 10 μ g vs LPP-p2FGM-CSF 50 μ g), en la última medida (día +33); así como también para con respecto al grupo control de liposomas solos (Ls MLV-GD3 vs LPP-p2FGM-CSF 50 μ g), aunque con este último las diferencias no son tan acusadas ($p > 0,005$).

3.3.2. Con antígenos hidrosolubles situados en el interior liposomal (proteínas tumorales de membrana-TMP)

El lipopoliplejo es un vehículo capaz de transportar también moléculas hidrosolubles, encapsuladas en el interior del núcleo de los liposomas. Estas moléculas pueden ser entregadas conjuntamente con un gen situado en el plásmido a la misma célula. El objetivo del siguiente ensayo fue determinar la capacidad del lipopoliplejo para inducir una respuesta inmune antitumoral en modelo murino, mediante antígenos proteicos hidrosolubles incorporados en el núcleo

del compartimento liposomal. Como modelo para el ensayo, se eligió el tumor de melanoma murino inducido mediante la línea celular B16. Como antígenos se utilizaron extractos de proteínas de membrana de estas mismas células, que fueron aisladas y encapsuladas en el interior de los liposomas utilizados para formar el lipopoliplexo.

El ensayo se realiza para dos diferentes dosis de antígenos proteicos (20 y 2 μg de TMP) y de gen de la citoquina GM-CSF (50 y 10 μg de plásmido conteniendo el gen de la citoquina GM-CSF). Asimismo, utilizamos dos plásmidos diferentes, pMOK y p2F, en la constitución de los lipopoliplexos. El liposoma utilizado fue de tipo MLV-FT y de composición PC:CH:DP o SM:CH:DP en relación molar 5:4:1. La combinatoria de las diferentes dosis utilizadas resulta en las siguientes 8 preparaciones diferentes de lipopoliplexo:

- MLV-FT PC:CH:DP(20 μg TMP)/PEI/pMOK(50 μg)
- MLV-FT PC:CH:DP(2 μg TMP)/PEI/pMOK(50 μg)
- MLV-FT PC:CH:DP(20 μg TMP)/PEI/pMOK(10 μg)
- MLV-FT PC:CH:DP(2 μg TMP)/PEI/pMOK(10 μg)
- MLV-FT SM:CH:DP(20 μg TMP)/PEI/p2FGM-CSF(50 μg)
- MLV-FT SM:CH:DP(2 μg TMP)/PEI/p2FGM-CSF(50 μg)
- MLV-FT SM:CH:DP(20 μg TMP)/PEI/p2FGM-CSF(10 μg)
- MLV-FT SM:CH:DP(2 μg TMP)/PEI/p2FGM-CSF(10 μg)

Como controles, se utilizaron lipopoliplexo con 20 μg de TMP y 50 μg de plásmido p2F (que no contenía el inserto del gen del GM-CSF); liposomas solos MLV-FT PC:CH:DP (cargados con 20 μg TMP) y 5% Glucosa.

Desarrollo de un protocolo de vacunación con antígenos hidrosolubles para el lipopoliplexo. Parte del trabajo desarrollado en la presente tesis doctoral ha consistido en el desarrollo de un protocolo válido y confiable para la inmunización con vectores de asociación ternarios liposomas-ADN-PEI. Por lo que describimos en cierto detalle los preparativos, técnicas aplicadas y desarrollo de la siguiente experiencia de inmunización, como modelo de protocolo específico para inmunización antitumoral mediante antígenos, utilizando las técnicas y métodos desarrollados en la presente tesis. Se expone asimismo el laborioso proceso de preparación de los lipopoliplexos con proteínas tumorales de membrana, que es imprescindible de realizar antes de cada dosis de vacuna aplicada, ya que es requisito preparar el lipopoliplexo *de novo* antes de cada administración. La refrigeración, liofilización u otras técnicas de conservación que aseguren la estabilidad y el mantenimiento de las propiedades del lipopoliplexo podrían ser opciones válidas en un futuro, pero actualmente no disponemos de datos que garanticen la fiabilidad del producto preparado y almacenado con antelación.

Aislamiento de proteínas de membrana de células tumorales. A partir de cultivos celulares de células de melanoma de la línea B16 y mediante la técnica de extracción de Bordier descrita en Materiales y Métodos, se aíslan y purifican proteínas de membrana de la célula de tumor. El extracto de proteínas es cuantificado, congelado y almacenado a -20°C hasta el momento de su utilización. Los rendimientos de extracción fueron excelentes, los máximos que permite este sistema, ya que el extracto no se podía concentrar por evaporación mediante el rotavapor: las muestras mostraban la misma concentración de proteínas tras reducir a $\frac{3}{4}$ partes o a la mitad su volumen por evaporación, apareciendo además un precipitado fino en suspensión de color amarillo-marrón, que interpretamos como la precipitación de las proteína en solución al reducirse el

volumen de solvente, por encontrarse el extracto primario ya saturado en proteínas. Por este motivo, el extracto fue diluido desde 2,35 mg/ml a 2 mg/ml previamente a su encapsulación en el liposoma (ya que al encontrarse en el límite de saturación, la modificación del medio de disolución al que es sometida durante la preparación del liposoma hubiese podido provocar una disminución de solubilidad y subsiguiente precipitación de una fracción de las proteínas, que no hubiese sido posible detectar y que podría interferir tanto en la preparación de los lipopoliplos como en la carga antigénica de los complejos).

Cuantificación de las proteínas aisladas. Las proteínas se cuantificaron mediante el reactivo fluorescente CBQCA (MolecularProbes®); mediante determinación de la emisión fluorescente de la muestra e interpolación frente a una recta patrón preparada con una solución estándar de BSA. La sonda fluorescente comercial CBQCA, desarrollada por Molecular Probes®, es capaz de cuantificar con precisión muestras de proteína en presencia de diversas sustancias tales como detergentes (Triton X-100), sales como el Cloruro de Cesio, sucrosa, glicerol, etc., incluso cuando tales sustancias están a concentración muy elevada. De hecho la medida es incluso más precisa en presencia de concentraciones muy altas de detergente. Las medidas de la concentración de proteína de los extractos de TMP fueron realizadas con CBQCA.

Preparación del liposoma y encapsulación de los antígenos proteicos. La solución de proteínas de membrana tumoral se utilizó para la redispersión mecánica de los lípidos desecados sobre un matraz de vidrio de fondo redondo, obteniéndose una suspensión de liposomas de tipo MLV. A continuación, se sometió esta suspensión liposomal a cinco ciclos sucesivos de congelación-descongelación (mediante inmersión del matraz en Nitrógeno líquido y en baño caliente a 37°C, respectivamente) para obtener los liposomas de tipo MLV-FT que se utilizan en la preparación del LPP.

Cuantificación del lípido. La suspensión liposomal de tipo MLV-FT obtenida fue cuantificada mediante la técnica colorimétrica de valoración de fosfolípidos con ferrocianato; para determinar el rendimiento y la concentración de lípidos de los liposomas obtenidos.

Cuantificación del rendimiento de encapsulación de proteínas de membrana tumoral. La concentración de proteínas en el interior del liposoma se determinó mediante el reactivo fluorescente CBQCA. La cuantificación se realizó mediante la incubación de una alícuota de la suspensión de liposoma encapsulando proteína con el detergente Triton X-100, que destruye el liposoma liberando la proteína del interior. Asimismo se determinó la concentración de proteína en una alícuota de la suspensión liposomal sin tratar con Triton X-100; en estas condiciones el CBQCA sólo puede reaccionar con la proteína no encapsulada, al no poder acceder al interior del liposoma. Mediante sendas curvas patrón con BSA se determinó la concentración de proteína total (muestras tratadas con Triton X-100; recta patrón 1) y proteína libre no encapsulada (muestras sin Triton X-100; recta patrón 2); la sustracción de ambas cantidades determina la concentración de proteína encapsulada en el interior del liposoma. Dado que el detergente Triton X-100 aumenta significativamente la emisión fluorescente del reactivo CBQCA, la recta patrón 1 fue realizada con una cantidad equivalente de Triton X-100 a la utilizada para destruir el liposoma. La presencia de liposomas no modifica la emisión fluorescente del reactivo (comprobado en nuestro laboratorio mediante un experimento independiente; datos no mostrados), por lo que no fue necesario adicionar liposomas vacíos para elaborar la recta patrón 2.

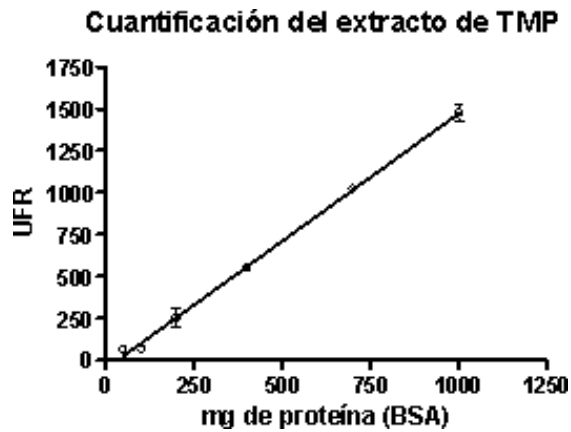
Determinación del umbral de formación del lipopoliplojejo. Se determinó para cada uno de los extractos proteicos de TMP utilizados para preparar el LPP; mediante la técnica de centrifugación con cloruro de cesio. A cada extracto de TMP

se agregó la cantidad necesaria de la sal de Cesio para lograr una concentración de 1M en CICs. Con este extracto de TMP+Cs se preparó una suspensión de liposomas MLV-FT que se utilizó para determinar la concentración mínima necesaria para formar el LPP, según la técnica ya descrita.

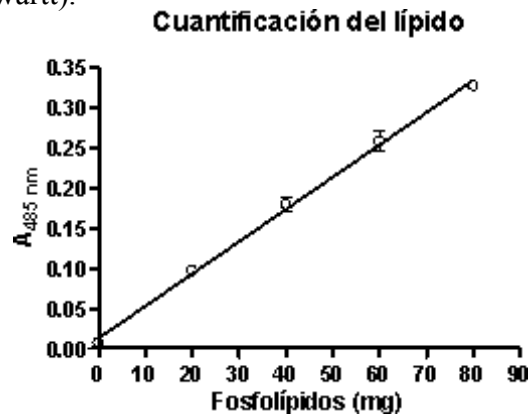
Preparación del vector lipopolipélico. EL LPP se prepara mediante el procedimiento descrito en Material y Métodos. El fenómeno de la existencia de una relación umbral para formación del vector limita el diseño del LPP. Por un lado, la cantidad de liposomas a utilizar en su preparación debe situarse en el umbral de formación del LPP, sin excederlo (sobre todo, para asegurarnos de que el LPP se ha formado, pero también para asegurarnos que todos los liposomas se encuentran formando parte del complejo, sin que haya liposoma libre). Esto limita la cantidad de antígeno que es posible incorporar por dosis de LPP, en función de la concentración del antígeno que podamos lograr en el extracto de proteínas a encapsular en el compartimento liposomal. En nuestro ensayo, la concentración máxima obtenida fue de 2,35 mg/ml de proteína, que fue posteriormente diluida a 2 mg/ml previamente a su uso en la preparación del vector (para evitar problemas derivados de la posible precipitación del extracto de proteínas).

Procedimiento de preparación de los lipopolipélicos. Se refieren a continuación las determinaciones analíticas empleadas en la preparación de los lipopolipélicos antes de la administración de cada dosis de vacunación (nota: los gráficos que aparecen se muestran solo a efectos ilustrativos)

1) Extracción y cuantificación de las proteínas de membrana tumoral. Las células se recogen de sus frascos de cultivo y se extraen según el protocolo de Bordier (Bordier, C 1981) cuantificándose seguidamente en placa mediante interpolación en una recta patrón de BSA con el reactivo fluorescente CBQCA.

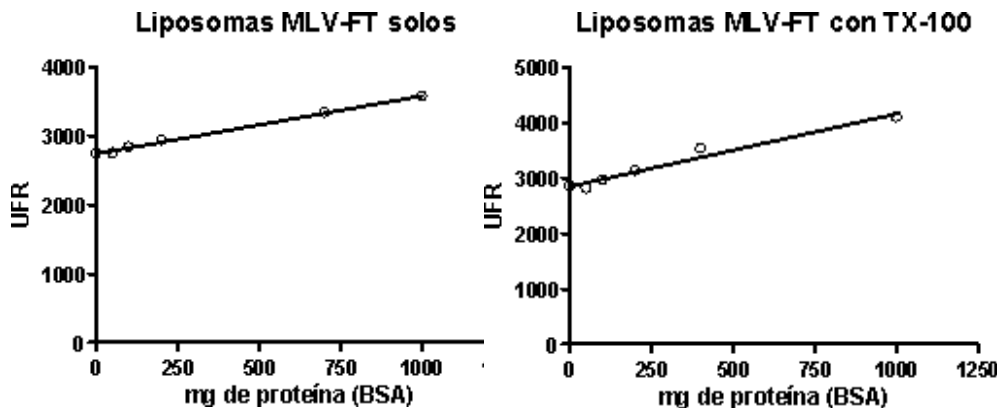


2) Preparación de liposomas MLV-FT con TMP y cuantificación del rendimiento de encapsulación. Las dos clases de liposomas MLV-FT (2 y de 20 microgramos de TMP) se preparan de acuerdo al protocolo descrito en material y métodos, con 6 ciclos de congelación-descongelación, encapsulando el extracto de TMP. Las suspensiones de liposomas obtenidas se cuantifican por colorimetría (técnica de valoración con ferrotiocianato de Stewart).



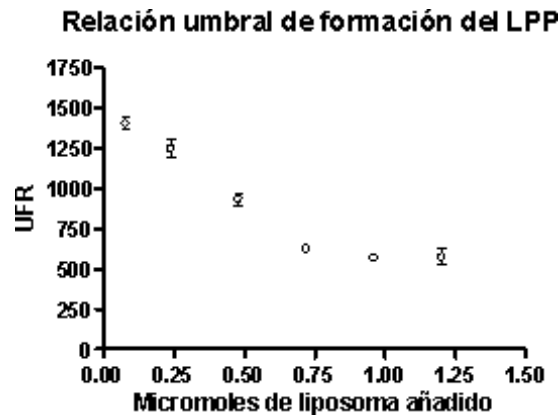
3) Cuantificación del contenido en proteína de los liposomas MLV-FT. Dado que la eficiencia de encapsulación en liposomas nunca es total, hay que

recuantificar el contenido en proteína de los extractos, pues una parte de la proteína se pierde quedando fuera del liposoma.



El triton X114 residual procedente de la preparación de los liposomas (TMP) puede influir en la valoración, por lo que es conveniente hacer dos rectas patrón, una con BSA solo y otra con BSA + Triton X114.

4) Determinación de la relación umbral de formación del LPP. Por último, hay que realizar una experiencia de caracterización de la relación umbral para la formación del LPP con la técnica de los liposomas de CICs (lo que exige preparar nuevamente liposomas MLV-FT de TMP+CICs 1M).



5) Formación de los lipopoliplos. A partir de estos datos, pueden realizarse los cálculos pertinentes para obtener las soluciones de lipopoliplos con las dosis de proteína necesaria por animal y el volumen del preparado a inyectar. Se preparan primero las soluciones de plásmidos y PEI para formar los poliplos y, tras 15 minutos de incubación, se mezclan con las cantidades de las correspondientes soluciones de liposomas de TMP según lo calculado anteriormente. Se reajustan los volúmenes añadiendo 5% Glc a cada dosis según sea necesario para obtener volúmenes de inyección iguales para todos los animales. Los LPP (TMP) se dejan incubar a T^a ambiente 90 min antes de su administración a los animales.

Cálculos de las proporciones necesarias de reactivos para constituir el lipopoliplo para cada grupo de vacunación.

Mediante los procedimientos anteriores, se han determinado los siguientes datos, que serán utilizados para calcular las dosis adecuadas para la formación de cada tipo de lipopoliplo propuesto.

- 1) Cuantificación de la solución de liposomas MLV-FT:
0,0956 μmol lípido/ μl
- 2) Cuantificación de la eficiencia de encapsulación de TMP:
1,28 μg TMP/ μl de liposomas MLV-FT (TMP)
- 3) Umbral de formación de lipopoliplo:
1 μg de ADN (en el PP) *arrastra* a 0,3 μmol de lípido = 0,32 μl lípido

Grupo 1: MLV-FT PC:CH:DP(20 µgTMP)/PEI/pMOK (50 µg)

20µg de TMP están contenidos en 15,6 µl de liposomas
15,6 µl de liposomas = 1,49 µmol de lípidos--> lo
aproximamos a 15,7 µl para que sean 1,5 µmoles
50 µg de ADN requieren *al menos* 1,5 µmol de lípidos para
formar el LPP

Preparación:

- 1) se mezclan y agitan en vortex 50 µl de plásmido pMOK a 1 µg/µl con 50 µl de PEI 25 KDa 1,4 µg/µl
- 2) se incuba la solución de poliplejos 15 min exactos a T^a ambiente
- 3) se añaden 15,7 µl de liposomas MLV-FT(TMP)
- 4) se completa a 120 µl con 5% Glc, agitando suavemente
- 5) se incuba la solución de LPP 90 min a T^a ambiente antes de usarlos

Nota: este LPP **no plantea problemas** en su preparación.

Grupo 2: MLV-FT PC:CH:DP (2 µg TMP)/PEI/pMOK (50 µg)

2µg de TMP están contenidos en 1,56 µl de liposomas
1,56 µl de liposomas = 0,149 µmol de lípidos--> lo
aproximamos a 1,57 µl para que sean 0,15 µmoles
50 µg de ADN requieren *al menos* 1,5 µmol de lípidos para
formar LPP, es decir, 15,7µl de liposomas
15,7µl - 1,57µl = 14,13 µl de liposomas "vacíos"

Preparación:

- 1) se mezclan y agitan en vortex 50 µl de plásmido pMOK a 1 µg/µl con 50 µl de PEI 25 KDa 1,4 µg/µl
- 2) se incuba la solución de poliplejos 15 min exactos a T^a ambiente
- 3) se añaden 1,57 µl de liposomas MLV-FT(TMP) mezclados previamente con 14,1 µl de liposomas MLV-FT vacíos
- 4) se completa a 120 µl con 5% Glc, agitando suavemente

5) se incubaba la solución de LPP 90 min a T^a ambiente antes de usarlos

Nota: este LPP **requiere más liposomas** para complejar los 50 µg de PP que los necesarios para su carga de antígeno, por lo que se prepara otra suspensión de liposomas "vacíos" (que encapsulan 5%Glc) con la misma concentración de lípido, para mezclarlos en la proporción adecuada con los liposomas MLV-FT(TMP), de manera que haya suficientes liposomas para formar el LPP pero la carga de TMP no exceda la que se pretende administrar en esta dosis.

Grupo 3: MLV-FT PC:CH:DP (20 µg TMP)/PEI/pMOK (10 µg)

20µg de TMP están contenidos en 15,6 µl de liposomas
15,6 µl de liposomas = 1,49 µmol de lípidos--> lo aproximamos a 15,7 µl para que sean 1,5 µmoles
10 µg de ADN requieren *al menos* 0,3 µmol de lípidos para formar el LPP

Preparación:

- 1) se mezclan y agitan en vortex 50 µl de plásmido pMOK a 1 µg/µl con 50 µl de PEI 25 KDa 1,4 µg/µl
- 2) se incubaba la solución de poliplejos 15 min exactos a T^a ambiente
- 3) se añaden 15,7 µl de liposomas MLV-FT(TMP)
- 4) se completa a 120 µl con 5% Glc, agitando suavemente
- 5) se incubaba la solución de LPP 90 min a T^a ambiente antes de usarlos

Nota: esta preparación del LPP lleva una carga de antígeno grande pero poco ADN, y para aportar esa dosis de antígeno **necesita 5 veces la cantidad mínima de liposomas necesaria que forma el LPP** a esa dosis de PP, por lo tanto no podemos asegurar que todos los liposomas estén formando parte del LPP y es posible que una parte de ellos queden "libres".

Grupo 4: MLV-FT PC:CH:DP (2 µg TMP)/PEI/pMOK (10 µg)

2µg de TMP están contenidos en 1,56 µl de liposomas
1,56 µl de liposomas = 0,149 µmol de lípidos--> lo
aproximamos a 1,57 µl para que sean 0,15 µmoles
10 µg de ADN requieren *al menos* 0,3 µmol de lípidos (3,14
µl) para formar el LPP
3,14 µl - 1,57µl = 1,57 µl de liposomas "vacíos"

Preparación:

- 1) se mezclan y agitan en vortex 50 µl de plásmido pMOK a 1 µg/µl con 50 µl de PEI 25 KDa 1,4 µg/µl
- 2) se incuba la solución de poliplejos 15 min exactos a T^a ambiente
- 3) se añaden 1,57 µl de liposomas MLV-FT(TMP) mezclados previamente con 1,57 µl de liposomas MLV-FT vacíos
- 4) se completa a 120 µl con 5% Glc, agitando suavemente
- 5) se incuba la solución de LPP 90 min a T^a ambiente antes de usarlos

Nota: este LPP, como el del grupo 2, también **requiere más liposomas** para complejar los 10 µg de PP que los que necesita para su carga de solo 2µg de antígeno; para formarlo, como en el caso anterior, se utiliza una suspensión de liposomas "vacíos" que se mezclan con los que contienen TMP en proporción adecuada antes de adicionarlos al PP para formar el LPP

La siguiente serie de lipopoliplejos con el plásmido p2FGM-CSF se prepara de la misma manera. Todas estas cantidades se preparan en lotes por grupo de animales, incrementadas en un exceso del 15% para asegurar la disponibilidad del producto.

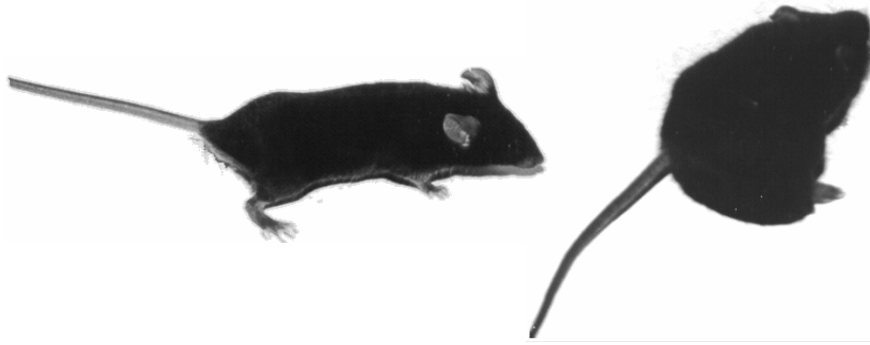


Figura 47. Aspecto de los animales con el tumor desarrollado. A la derecha, ratón inoculado por vía subdérmica en la pata derecha en el día +20 respecto del desafío tumoral (derecha), y ratón no inoculado (izquierda).

Estudios de supervivencia y volumen del tumor.

El tumor desarrollado en la pata del animal se midió en dos dimensiones perpendiculares (A y B) para calcular su volumen en mm^3 según la fórmula $V = (A \times B^2) / 2$. Los test estadísticos utilizados para la comparación entre los grupos fueron two-way ANOVA y Bonferroni. En la figura 48 se muestran los resultados de supervivencia de los animales para todos los grupos de vacunación, pero para mayor claridad, en la figura 49 se han separado en dos gráficos los grupos de vacunación respecto al plásmido utilizado para preparar el lipopolisacárido (pMOK o p2F). Las supervivencias muestran diferencias entre los grupos vacunados con lipopolisacáridos constituidos por un plásmido u otro.

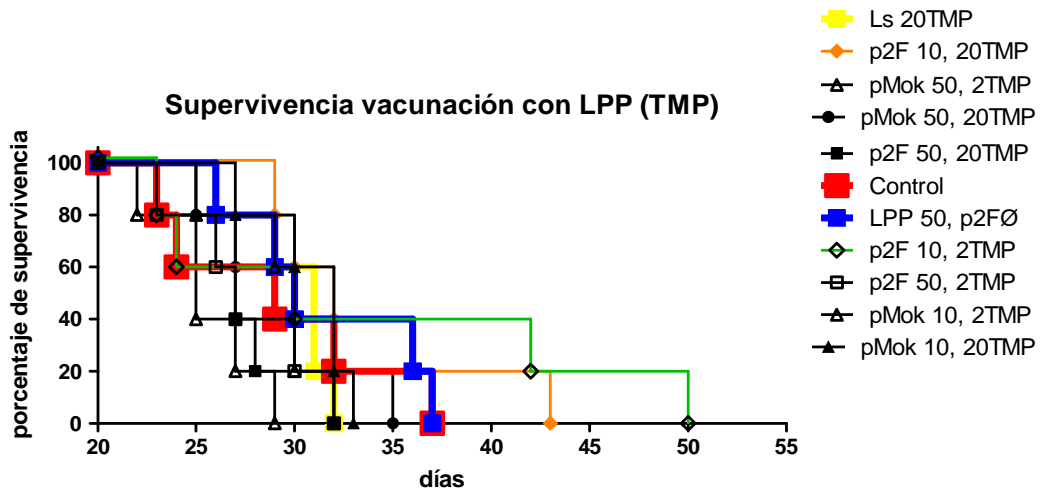
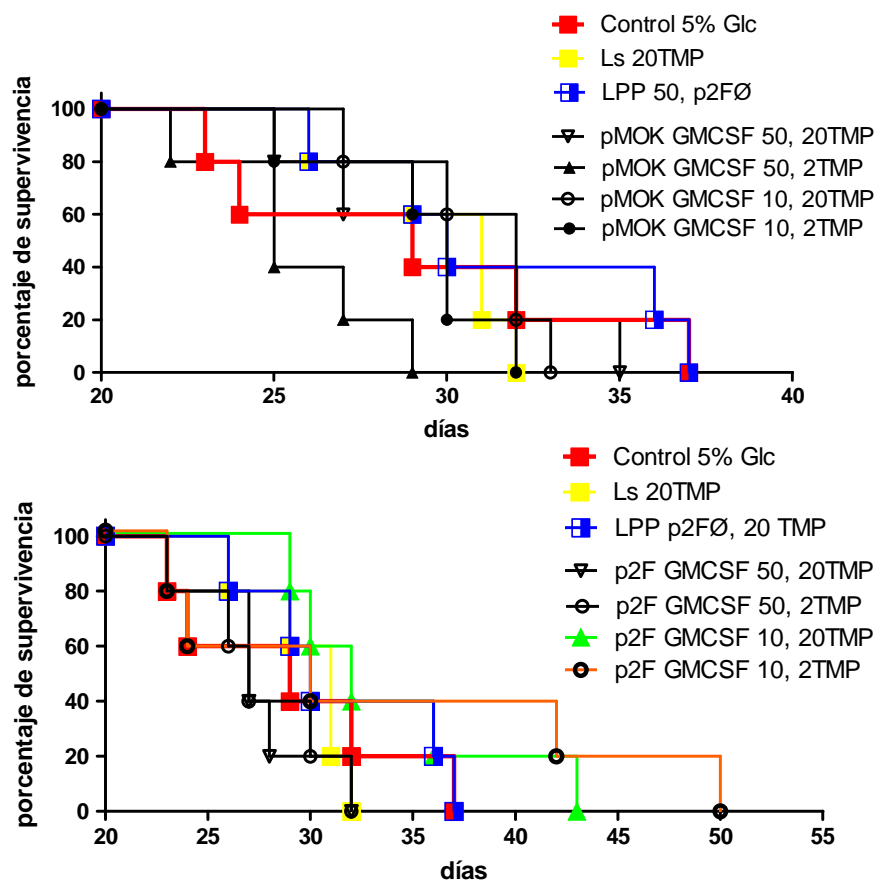


Figura 48. Supervivencia en el ensayo de inmunización con el lipopoliplexo con GM-CSF y TMP. Grupos de vacunación totales. Se desglosa en dos gráficos independientes en la figura 49, para su mayor claridad.

Figura 49 (página siguiente). Supervivencia en el ensayo de inmunización con proteínas de membrana de célula tumoral (TMP) por grupos separados para cada tipo de plásmido ensayado. Figura superior: inmunización con lipopoliplexos con el plásmido pMOK y los correspondientes controles. Figura inferior: inmunización con lipopoliplexo con el plásmido p2F-GM-CSF y los correspondientes controles. Grupos control: Control glucosa 5%, Ls 20 TMP (liposomas MLV(SM:CH:DP:GD3) con 20 mg de TMP) y LPP50 p2FØ (lipopoliplexos SUV(SM:CH:DP:GD3):PEI/p2FØ a 50 µg de pADN y 20 mg de TMP).



Para los grupos con pMOK las supervivencias de los grupos con el control negativo puro (5% Glc) son mejores que las de los grupos inmunizados con el lipopoliplexo, de entre los cuales el lipopoliplexo de alta carga de gen de la citoquina y baja carga de antígeno (pMOK 10, 2 TMP) es el grupo que presenta la supervivencia más baja.

Para los grupos con el lipopoliplexo constituido con el plásmido p2F en cambio, los dos grupos con baja carga del gen de la citoquina GM-CSF presentan una mejor supervivencia que los controles, aunque las diferencias no presentan una suficiente significación estadística (test de Kaplan-Meier y logrank con $p=0.3498$ para el control 5% Glc vs. p2F GMCSF 10, 2 TMP y $p=$

0.338 para el control 5% Glc vs. p2F GMCSF 10, 20 TMP). Las curvas de supervivencia para los grupos con alta carga de GMCSF se presentan similares o algo inferiores a las de los controles, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

En cuanto a la evolución del volumen tumoral, en la figura 50 se representan los resultados para cada composición de lipopoliplejo. Para ambos lipopoliplejos, el grupo de tratamiento con baja carga del gen de la citoquina GM-CSF y alta carga de antígenos presenta una inhibición del volumen tumoral significativa (30%, $p < 0,001$) a partir del día + 23 respecto a los grupos control negativo Glc 5% y Lp 20 TMP (liposomas solos con antígeno). De lo que se infiere que el lipopoliplejo funciona mejor a alta dosis de antígeno y baja dosis de GMCSF, lo cual es coincidente para el caso del lipopoliplejo con p2F con los grupos que presentaban la mejor supervivencia (p2F GMCSF 10, 20 TMP y p2F GMCSF 10, 2 TMP).

El estudio se complementó con muestras de sangre de los animales, analizadas por grupo de tratamiento y tomadas a 3 tiempos diferentes: el día -22 (previo a la inmunización de los animales, sirviendo como nivel basal o control de cada grupo), el día -1 (el anterior a la implantación de las células tumorales) y el día +15 respecto al de la implantación del tumor. Las muestras de sangre recogidas se utilizaron para realizar determinaciones analíticas de inmunoglobulinas por ELISA.

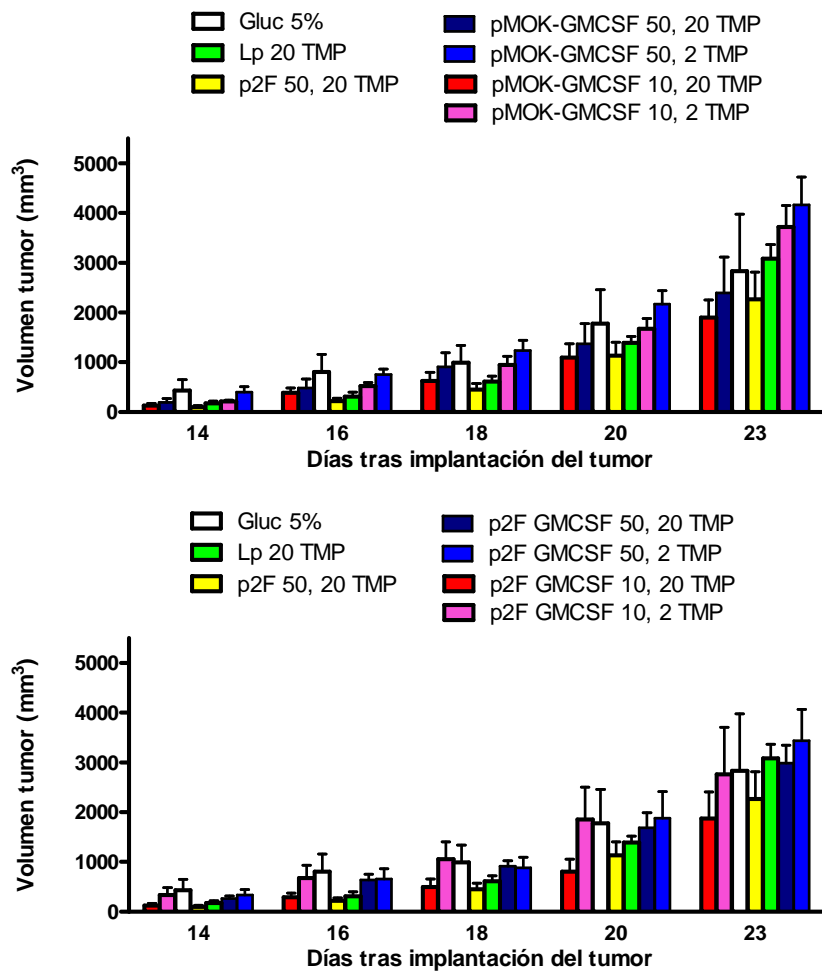


Figura 50. Evolución del volumen de tumor tras inmunización con el lipopoliplejo transportando la citoquina GM-CSF y proteínas de membrana de célula tumoral (TMP). Los ratones fueron inmunizados con dos dosis diferentes de antígenos, 2 y 20 mg de TMP; y a dos dosis de plásmido con el gen del GMCSF, 50 y 10 μ g.

Figura superior: lipopoliplejos SUV(SM:CH:DP:GD3):PEI/pMOK-GMCSF) y los correspondientes controles. El grupo de lipopoliplejo pMOK-GMCSF 10, 20 TMP muestra una diferencia significativa (30%, $P < 0.001$) a partir del día 23 respecto al resto de grupos, excepto el con el grupo p2F 50, 20 TMP y el pMOK 50, 20 TMP. Figura inferior: lipopoliplejos (SUV(SM:CH:DP:GD3):PEI/p2F-GMCSF) y los correspondientes controles. El grupo de lipopoliplejo p2F GMCSF

10, 20 TMP muestra una diferencia significativa ($P < 0.001$) a partir del día 23 respecto a los controles Gluc 5% y Lp 20 TMP. Grupos control: Control (glucosa 5%), Ls 20 TMP (liposomas MLV(SM:CH:DP:GD3) con 20 mg de TMP) y LPP50 p2FØ (lipopolíplejos SUV(SM:CH:DP:GD3):PEI/p2FØ a 50 µg de pADN y 20 mg de TMP).

Respuesta inmunológica humoral.

Los grupos tratados con alta dosis de antígeno (20 µg TMP) muestran la máxima respuesta de IgG totales en la 3ª medida (día +15), mientras que los dos grupos con la dosis más baja de TMP (2 µg), muestran sus máximos con anterioridad, en la 2ª medida (día -1), siendo estos niveles siempre inferiores a los máximos alcanzados por los otros dos grupos, y similares a los alcanzados por los grupos control, incluido el control negativo “puro” (5% Glc). Lo cual indica que la respuesta humoral observada procede de la inducida por el propio tumor, y los lipopolíplejos de baja carga antigénica no son capaces de activar una respuesta inmune “*per se*”.

Los subtipos específicos de IgG anti-TMP (IgG₁ e IgG_{2a}) se muestran en la figura 52. Los resultados para las IgG₁ son similares a los observados en las IgG totales, el patrón se vuelve a repetir en los subtipos, pero acentuándose las diferencias: los grupos de alta carga antigénica (20 µg TMP) consiguen títulos elevados de IgG₁ respecto de los controles a partir de la 3ª dosis de vacuna (muestras de plasma tomadas en el día +15, en la 3ª medida).

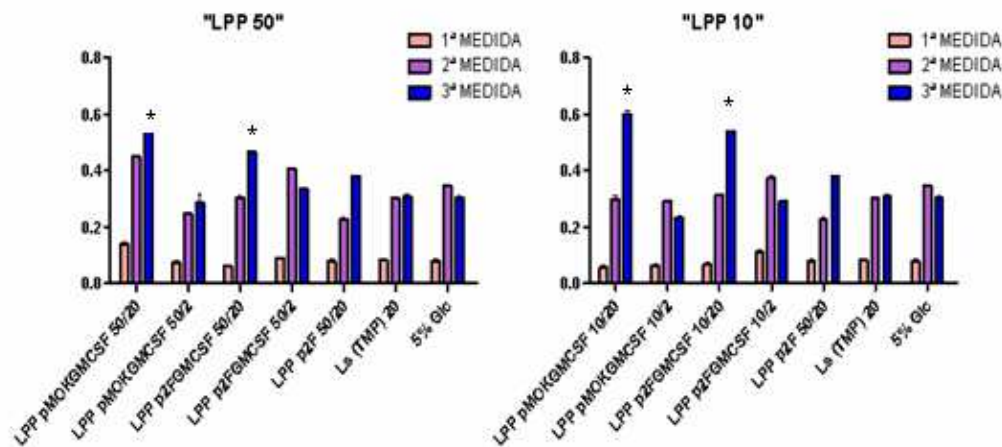


Figura 51. Respuesta humoral (inmunoglobulinas totales) obtenida después de cada dosis de inmunización con el lipopoliplojo transportando la citoquina GM-CSF y proteínas de membrana de célula tumoral (TMP). Se muestran las titulaciones obtenidas (ELISA) tras cada una de las 3 dosis de inmunización. En el eje de ordenadas se representa la densidad óptica a 492 nm. Figura superior: grupos de vacunación totales ensayados. Figura inferior: grupos de vacunación separados en función de la dosis de plásmido utilizado para preparar el lipopoliplojo. Se compara la respuesta humoral obtenida para las dosis de 50 μ g (izquierda, LPP 50) y 10 μ g (derecha, LPP 10) de plásmidos pMOK-GMCSF y p2FGMCSF (** representa un p valor < 0.001 respecto al control y * p valor < 0.01).

Los títulos son aún mayores que los del grupo control sin citoquina (LPP p2F 50/20), el cual se encuentra al nivel del grupo control con liposomas solos (Ls (TMP) 20), indicando un papel del GM-CSF en la generación de la respuesta humoral obtenida (y por tanto, del lipopoliplojo completo tal como se ha formulado, con los antígenos y con la citoquina coadyuvante para reforzar la respuesta inmune generada).

Los grupos de baja dosis de antígeno (2 μ g TMP) no logran aumentar la producción de IgG₁.

En el caso de las inmunoglobulinas IgG_{2a}, las respuestas obtenidas muestran una regularidad casi idéntica a la observada en las IgG₁, pero en este caso parece que el papel del GM-CSF es más determinante: los grupos de alta carga de antígeno (20 μ g TMP) tienen los mejores títulos de IgG_{2a} a partir de la 3^a dosis de vacuna (como en el caso anterior), y ligeramente superiores a los del lipopolisacárido sin GM-CSF control (LPP p2F 50/20).

Además los liposomas solos (Ls (TMP) 20) aparecen con valores iguales a los del control negativo puro (5%Glc), indicando que el lipopolisacárido es determinante para producir una respuesta IgG_{2a}.

Los grupos de baja dosis de antígeno (2 μ g TMP) no tienen actividad inmunoestimulante, ya que se muestran con valores similares a los del control 5% Glc, pero hay un grupo que, sorprendentemente, muestra valores altos desde la 2^a dosis de vacuna (LPP p2F GMCSF 50/2).

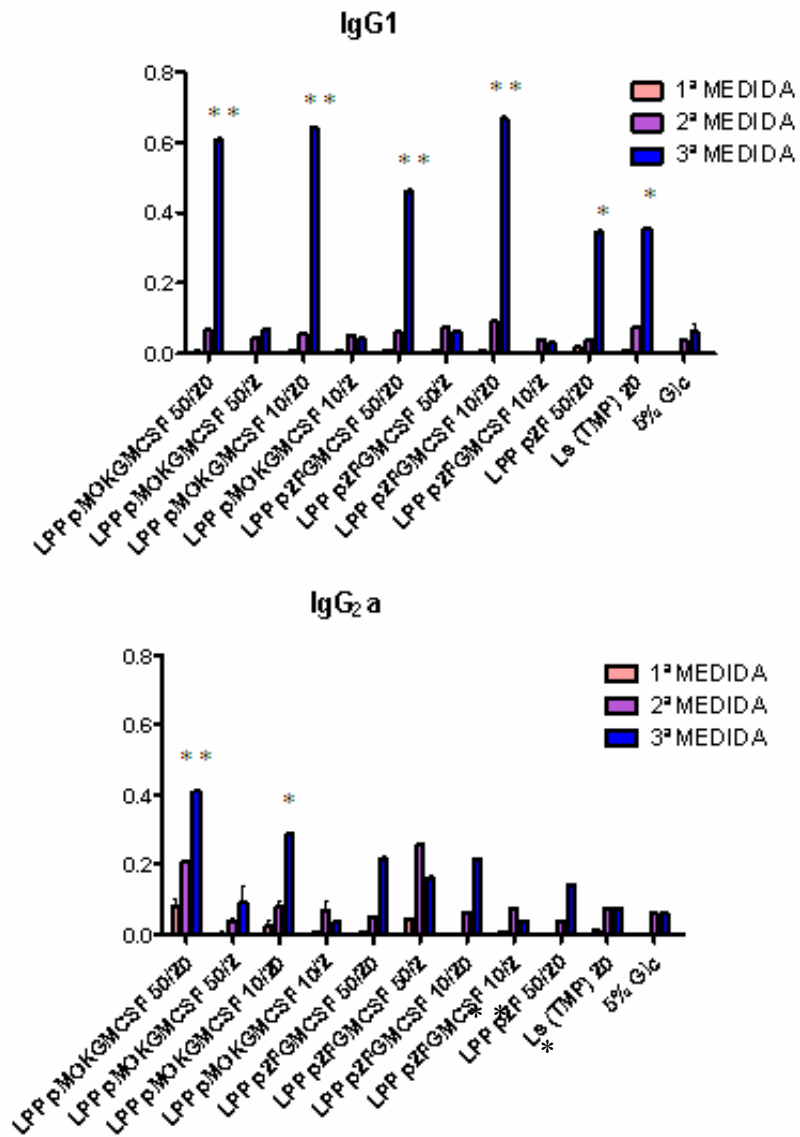


Figura 52. Respuestas humorales de los isotipos de inmunoglobulinas específicos IgG₁ e IgG₂a después de cada dosis de inmunización con el lipopolíplejo transportando la citoquina GM-CSF y proteínas de membrana de célula tumoral (TMP). Se muestran las titulaciones obtenidas (ELISA) tras cada una de las 3 dosis de inmunización. (derecha, LPP 10) de plásmidos pMOK-GMCSF y p2FGMCSF. En el eje de ordenadas se representa la densidad óptica a 492nm; ** representa un p valor<0.001 respecto al control y * p valor<0.01.

DISCUSIÓN

4. Discusión

La presente tesis doctoral tiene por objeto el desarrollo de dos nuevos vectores de transferencia génica no viral, concebidos bajo dos principios de diseño fundamentalmente distintos. En el primero, los complejos con los agentes RCC10 o HCC10 se dirigen hacia a la construcción de una partícula de pequeño tamaño, para la transfección celular por vía sistémica. El objetivo es la compactación de un ácido nucleico a transferir, reduciendo su tamaño molecular hasta una partícula del orden de nanómetros, que es el primer paso hacia la constitución de un vector artificial cuya estructura y propiedades de difusibilidad por los tejidos sean semejantes a las de los virus. Su pequeño tamaño es un requisito para que el vector escape del torrente sanguíneo a través de los poros capilares y difunda adecuadamente por los espacios intercelulares para alcanzar sus células diana. El otro diseño, el lipopoliplojejo, parte de una concepción totalmente distinta. Se trata del desarrollo de un vehículo cuya ventaja fundamental es su capacidad de entrega de grandes cantidades de moléculas (antígenos o genes) conjuntamente a una misma célula. Por lo que el tamaño de estas partículas, al contrario que las anteriores, es necesariamente mucho mayor, del orden de micras. Por tanto, estos vehículos no se diseñan para un uso sistémico, sino que se dirigen a aplicaciones que requieran la vía SC o IM. Por ejemplo, el campo de las vacunas antitumorales, que es el terreno utilizado para testar su uso *in vivo* en el presente trabajo.

Desarrollo de vectores de transferencia génica no virales con los agentes RCC10 y HCC10. Los virus, aunque muy eficaces como sistemas de entrega y expresión de genes terapéuticos, han sido recientemente cuestionados en su uso en terapia génica, por los riesgos que conlleva su utilización. El genoma viral, evolucionado a través de un sinfín de procesos de mutación-selección, es el sistema de transfección más eficaz, pero ocasionalmente los ensayos clínicos con virus han producido efectos adversos inesperados (Hacein-

Bey-Abina S et al. 2003). La formación de complejos monomoleculares con los agentes RCC10 y HCC10 y plásmidos desarrollada en la presente tesis, constituye el primer paso, el más esencial, hacia la construcción de un vector no viral con estructura semejante al de un virus, cuyo reducido tamaño permita el escape y diseminación a los tejidos a través de la barrera capilar (Kostarelos et al. 2005). Ulteriores desarrollos encaminados a revestir con una bicapa lipídica la pequeña partícula generada, así como a encapsular en su interior sustancias coadyuvantes, y disponer en su superficie sistemas de direccionamiento tales como anticuerpos monoclonales contra receptores celulares específicos, pueden hacer estos sistemas verdaderamente eficaces en cuanto a la llegada de la partícula a sus dianas celulares desde la vía sistémica.

Determinación de la concentración micelar crítica del agente RCC10. A vista del mecanismo de complejación monomolecular con el ADN comentado en la introducción, resulta evidente una característica fundamental de la química de estos agentes: es esencial que la cmc (concentración micelar crítica) del monómero sea superior a la concentración necesaria del vector para neutralizar el plásmido. Si por el contrario, el agente se encontrase a una concentración superior a su cmc, el monómero en solución se reorganizaría espontáneamente en micelas, porque es la forma energéticamente favorable a concentraciones superiores a la cmc. Teniendo en cuenta que, para que dos grupos tiol reaccionen entre sí, han de estar lo suficientemente próximos, el resultado de la presencia de micelas en la solución tiene la consecuencia de que el agente RCC10 no funcione según el mecanismo previsto: es esencial que se encuentre como moléculas individuales en solución. Dos moléculas contiguas del RCC10 en una micela reaccionarían entre sí por la proximidad de sus grupos tiol, formándose el dímero en la propia micela, y como resultado se obtendría un agregado electrostático de múltiples unidades del plásmido con múltiples micelas, no lográndose el colapso monomolecular buscado. Por tanto, la determinación de la cmc resulta una

característica crucial del trabajo con el agente RCC10, ya que para una reacción con el ADN “limpia” resulta esencial que el monómero se encuentre en solución como moléculas independientes, sin formar micelas.

La medida de la cmc con la sonda fluorescente NPN dio un valor de 1100 μM para el RCC10. Este resultado resultó ser perfectamente compatible con la utilización de este agente, ya que a lo largo de las experiencias no fueron necesarias en ningún caso concentraciones de trabajo mayores de 100 μM . Sin embargo, numerosos intentos de medir la cmc del RCC12 mediante fluorescencia con NPN no consiguieron mostrar un “salto” en la fluorescencia similar al obtenido para el RCC10. La concentración de la molécula se varió en un rango muy amplio, llegando hasta 4 μM , pero la señal fluorescente medida se incrementaba suavemente con la concentración a lo largo de todo el rango de concentraciones ensayadas. Más aún, en las placas de las muestras de RCC12 utilizadas en las experiencias, guardadas o/n a 4°C, aparecía un precipitado blanquecino muy fino, poco aparente, aunque perfectamente visible. Esta observación, unida a la no aparición del incremento o salto brusco en la fluorescencia, hizo concluir lo siguiente: el RCC12 es una molécula de escasa solubilidad acuosa, y las moléculas de RCC12 precipitan antes de llegar a la concentración suficiente para formar micelas. Y el incremento suave en la señal de fluorescencia con la concentración se debe seguramente a un efecto de absorción de la sonda NPN sobre las partículas precipitadas o a algún fenómeno similar. De hecho, como se describe en Material y Métodos, el aspecto macroscópico del RCC12 es el de una sustancia cérea translúcida, mientras que el RCC10 y el HCC10 tienen el aspecto de un polvo blanco, típico de sustancias iónicas. Este resultado explica también el por qué no encontramos en ninguna de las múltiples experiencias con este agente resultados similares a los del análisis por electroforesis del RCC10, a pesar de que se ensayaron una gran variedad de condiciones. Pese a las múltiples experiencias, no se obtuvo evidencia experimental de la

formación de los complejos de RCC12 con los plásmidos. Concluimos que la insolubilidad en medios acuosos de la molécula de RCC12 impide su utilización como agente de complejación del ADN, según el mecanismo de compactación monomolecular previsto.

Microscopía electrónica de complejos RCC10-plásmido.

Los complejos RCC10-plásmido preparados con el plásmido p3CEGFP fueron examinados por microscopía electrónica de transmisión. Las microfotografías muestran una población homogénea de partículas de pequeño tamaño, de diámetro entre 30 y 50 nm, con un diámetro medio de unos 40 nm, que no aparece en las correspondientes microfotografías del control del plásmido p3cEGFP sólo (no mostradas), y que es coherente en tamaño con el colapso monomolecular esperado del plásmido. Estas partículas constituyen una sólida evidencia de que la compactación monomolecular del ADN ha tenido lugar, de acuerdo con el mecanismo hipotetizado para el vector.

Las imágenes muestran una heterogeneidad grande en el tamaño de la población de partículas del complejo preparado a temperatura ambiente (TA), que no se observa en el complejo preparado en frío, el cual es una población muy homogénea de partículas pequeñas. Otra diferencia importante es que las partículas del complejo a TA son electrodensas, intensamente teñidas, debido a la absorción del agente de tinción (ácido fosfotúngstico), que indica un entorno o ambiente en el interior de la partícula de hidrosolubilidad. Por el contrario, las del complejo en frío excluyen el colorante y aparecen claras, delatando la naturaleza hidrofóbica de su interior. Esto puede enlazarse con los resultados de electroforesis, en los que se observa que el complejo a TA es incapaz de migrar a través del gel, pues son agregados grandes, y las pocas partículas de la población cuyo pequeño tamaño permite el paso a través del poro de la agarosa no son suficientes para que se observe la banda fluorescente en el seno del gel. Por el contrario, los complejos en frío están constituidos por partículas pequeñas,

capaces de migrar a través de gel. Es más, su aspecto claro, es indicativo de la hidrofobicidad de su núcleo interno, lo que concuerda con la hipótesis propuesta de que la preparación en frío permite estructurar los dominios pseudomicelares internos, mientras que las preparadas a TA carecen de esta estructura interna, y las colas hidrofóbicas se sitúan de manera no ordenada, provocando la agregación del complejo en unidades particuladas grandes.

Formación de complejos HCC10/plásmido. La formación de los complejos RCC10/pADN se evidenciaba no solo por las imágenes de microscopía electrónica, que mostraban la presencia de una población de partículas pequeñas de tamaño esperado, sino por la formación de una especie cuya migración electroforética era mayor que la del plásmido libre. Las imágenes de microscopía electrónica no constituyen, en general, una evidencia sólida que asegure que la formación de los complejos ha tenido lugar de forma significativamente cuantitativa. Sin embargo, en las electroforesis aparecía una única banda y de migración electroforética superior a la del plásmido libre, indicando que todo el plásmido se encuentra formando parte del complejo. Además, el tratamiento de los complejos con detergentes como el Triton X-100 o el SDS, que disuelven los lípidos, restituía la movilidad electroforética al plásmido, apareciendo posicionada la banda igual que la del plásmido libre sin tratar. Como prueba adicional y más concluyente, el tratamiento con un agente reductor que específicamente disocia los enlaces disulfuro, el ditioneitol (DTT), restituía una movilidad electroforética igual a la del plásmido libre, indicando un papel de estos enlaces en la formación de las partículas de movilidad electroforética superior. Adicionalmente, *Behr y colaboradores* (Dauty, E., J. S. Remy, et al. 2001) demostraron la presencia de lípidos asociados a las bandas de elevada movilidad electroforética, mediante la tinción del gel con un colorante (Rojo sudan) específico de lípidos. Por último, en un trabajo posterior, mediante la introducción de una pequeña proporción (2%) de un lípido con un grupo marcador fluorescente (rodamina) en la cabeza polar,

demonstraron sin dudas la presencia de lípidos asociados al plásmido en las bandas electroforéticas de alta movilidad que obtenían con sus vectores (Dauty, E., J.-P. Behr, et al. 2002).

En resumen, visto lo anterior, la movilidad electroforética superior observada en presencia del vector consideramos que caracterizaba o probaba la formación del complejo plásmido/vector. Los complejos preparados en frío mostraban una movilidad electroforética superior y muy marcada en el caso de los complejos con RCC10. Sin embargo, el vector HCC10 aparentemente no inducía cambio alguno en la movilidad del plásmido. La banda electroforética del plásmido con el agente HCC10 se situaba en el gel aparentemente igual que la del plásmido libre. Aunque existía un retraso mínimo, casi inaparente, pero visible al ojo entrenado. Este pequeño desplazamiento de la banda de migración sugirió una idea adicional ¿Sería posible que el complejo sí se hubiese formado, pero que la partícula HCC10/pADN tuviese una movilidad electroforética casi idéntica a la del plásmido libre? De ser este el caso, la electroforesis no serviría como técnica para verificar la formación del complejo, aún cuando esta hubiese tenido lugar.

La técnica de medida de la cmc mediante sondas fluorescentes se basa en la incorporación de una sonda liposoluble al ambiente hidrofóbico que representa el interior de una micela. Estas sondas son moderadamente solubles en agua, pero tienen una tendencia mayor a localizarse en un ambiente hidrofóbico, y además su emisión fluorescente es mucho más intensa cuando acceden al núcleo hidrofóbico de la micela que la fluorescencia en solución acuosa. De esta manera, un incremento súbito en la intensidad de fluorescencia al aumentar la concentración de la sustancia de interés revela la concentración a la que comienzan a aparecer las micelas. El complejo plásmido/RCC10 presumiblemente tiene una estructura similar a una micela, en sentido de que las colas hidrofóbicas del RCC10 se orientarían hacia el interior, estructurando un dominio o núcleo interno

hidrofóbico, con las cabezas polares situadas hacia el exterior acuoso y en contacto iónico con los grupos fosfato del plásmido. De esta consideración, surgió la idea de que un ensayo similar al usado para medir la cmc con la sonda NPN podría detectar también la relación de concentración plásmido/RCC10 a la que tiene lugar la formación del complejo. Y sería una prueba indirecta de la formación del vector en el caso del HCC10, en el cual existía la posibilidad de que la electroforesis no sirviese como técnica para detectar la formación del complejo si la movilidad electroforética coincidía con la del plásmido libre. Efectivamente, las experiencias mostraron un aumento brusco de la fluorescencia análogo al de la medida de la cmc del vector, pero a una concentración mucho menor que la cmc del RCC10. Más importante, este aumento en fluorescencia se correlacionaba perfectamente con la relación de concentraciones que la electroforesis mostraba como aquellas a las que se formaba el vector (en el caso del RCC10, ya que en el HCC10 no disponíamos de una medida previa de cmc ni de evidencias de formación por electroforesis). El seguimiento de la formación del complejo con un plásmido pequeño (p3CEGFP) confirmó que la relación N/P a la que se producía el incremento en fluorescencia coincidía con la observada a la que se forman los complejos p3CEGFP/RCC10 en electroforesis.

Por último, reexaminando las electroforesis de los complejos con HCC10, la banda que correspondía al complejo HCC10/ADN se mostraba siempre ligeramente retrasada respecto al plásmido libre. A la vista de los resultados con la sonda fluorescente, cabe concluir que las partículas HCC10/ADN tienen una movilidad electroforética casi coincidente con la del plásmido libre, que no se evidencia en las experiencias electroforéticas.

La última parte del trabajo con los agentes consistió en formar las partículas RCC10/HCC10 con un plásmido de elevado peso molecular, el pTG7101, portador del gen de la enzima alfa-1 antitripsina. En modelos animales, este

plásmido había demostrado conseguir una alta eficacia en la expresión génica, tanto en los niveles de proteína alcanzados como en el mantenimiento de la expresión del transgén (Alino, S. F., A. Crespo, et al. 2003). Sin embargo, la técnica utilizada para lograr estos elevados niveles de expresión (el método de inyección hidrodinámico) no es posible aplicarla fácilmente en el terreno de la terapéutica humana, y las adaptaciones enfocadas a conseguir un modelo de tratamiento aplicable en la clínica (la inyección directa intrahepática mediante catéteres para lograr presiones venosas locales elevadas) han reportado niveles de expresión con gran potencialidad terapéutica pero que no han resultado tan excelentes como los obtenidos con el modelo hidrodinámico (Alino, S. F., et al. 2007). Un vector no viral portador del plásmido pTG7101 podría resultar de utilidad para el tratamiento de la deficiencia en alfa-1-antitripsina, en caso de que el vector consiguiera vehiculizar adecuadamente el plásmido hasta el núcleo celular. El paso esencial en la construcción de tal vector es conseguir una condensación del plásmido en una partícula pequeña. Es, desde este punto de vista, que los complejos conseguidos con el RCC10 con un plásmido de peso molecular grande y a elevada concentración de ADN constituyen un primer paso que posibilita un ulterior desarrollo de vectores no virales proyectados para la corrección la deficiencia humana en alfa-1 antitripsina.

Recientemente, mediante el procedimiento que ha sido dado en llamarse *empaquetamiento programado* ("*programmed packaging*"), se han conseguido niveles de transfección cercanos a los de adenovirus, mediante vectores no virales pero de estructura similar a la de los virus (un ácido nucleico compactado y rodeado de una bicapa lipídica); que poseen un recubrimiento de tres bicapas de lípidos que les facilita la fusión selectiva y sucesiva con las membranas celular, lisosomal y nuclear, llevando el ADN terapéutico al núcleo celular con gran eficacia (Khalil, I. A., K. Kogure, et al. 2007; Akita, H., A. Kudo, et al. 2009). La constitución de partículas *pseudovirales* para terapia génica no viral es un objetivo cada vez más cercano, en el que se enmarcan los

desarrollos de partículas monomoleculares de ADN conseguidos en el presente trabajo.

El lipopoliplojejo. Tal como se describe en la introducción, el proyecto original de nuestro laboratorio consistía en desarrollar un vector para uso en vacunas de ADN basado en liposomas multilamelares (de tipo MLV-FT o DRV) encapsulando en su interior un plásmido, previamente complejoado con polietileneimina para formar un poliplojejo, que constituiría una partícula pequeña susceptible de encapsularse en el interior del liposoma. Desafortunadamente, tal como demostraron los intentos iniciales de encapsulación de los poliplojejos, la alta concentración de plásmido utilizada (500 µg/ml) provocaba que, al mezclar las soluciones de liposomas y poliplojejos, se formaran precipitados grandes, macroscópicamente visibles (del orden de 1-2 mm de diámetro), que impedían el correcto desarrollo del proceso de encapsulación. Esta alta concentración de ADN constituía un requisito esencial, ya que la cantidad de plásmido a administrar por animal prevista era de 50 µg/ratón, lo que implicaba que cada dosis individual de vacuna estaría en un rango entre 100 y 200 microlitros, que es el límite de volumen de inyección aceptable en ratón. Disminuir la concentración de plásmido hubiera supuesto inyectar un volumen de vacuna excesivamente grande, inviable.

En un intento de evitar esta precipitación, se modificó el protocolo de encapsulación de los liposomas MLV-FT y DRV. Se incorporó un paso previo, que consistía en partir de liposomas de tipo SUV en lugar de los MLV, pretendiendo con ello una mezcla más íntima entre poliplojejos y liposomas, que quizás evitase la formación de precipitados durante el proceso de encapsulación.

Sin embargo, al mezclar los liposomas SUV con la solución del poliplojejo, la mezcla adquiría inmediatamente una ligera opacidad blanco-lechosa, mientras que las soluciones de partida, tanto los liposomas como el poliplojejo, eran

translúcidas y casi transparentes. Esta observación casual sugirió inmediatamente que había tenido lugar la constitución de un complejo entre ambos componentes, ya que el aspecto blanquecino de la solución era indicativo de la existencia de partículas en suspensión que dispersaban luz. Se comprobó que la solución no mostraba partículas precipitadas visibles, ni siquiera bajo observación al microscopio óptico (800X). Y que el precipitado se mantenía estable durante un período de al menos 24 horas, tras el cual aparecía un escaso sedimento blanco, pero manteniendo la suspensión su aspecto original.

Mediante dos experimentos sencillos, se verificó la realidad del agregado. Las medidas de turbidimetría de mezclas de liposomas con diferentes diluciones de poliplejos ADN/PEI daban medidas (DO_{660nm}) superiores a las de poliplejos y liposomas por separado. Asimismo, en preparaciones en las que se mezclaban liposomas MLV o SUV y poliplejos, que eran seguidamente centrifugadas, se medía la concentración del ADN del poliplejo en el sobrenadante por fluorescencia, comprobándose que el ADN disminuía mucho más en las mezclas con liposomas que en los controles que contenían poliplejos solos. Ello era indicativo de un “*efecto de arrastre*” del liposoma sobre el poliplejo durante la centrifugación. Unos y otros datos apoyaban (aunque no demostraban) la formación de un complejo entre ambos componentes, liposomas y poliplejos.

Esta observación marcó un punto de inflexión en el desarrollo del proyecto, pues si, como suponíamos, se había formado espontáneamente un complejo liposoma-poliplejo con los poliplejos asociados externamente al liposoma, la nueva estructura suponía una serie de posibles ventajas *a priori* respecto al diseño originalmente proyectado. En primer lugar, la nueva estructura no estaba limitada por las dimensiones del poliplejo en cuanto a su encapsulación en el interior del liposoma, y por tanto permitiría incorporar cantidades más elevadas de plásmido que el diseño anterior (aspecto muy importante en vacunaciones con ADN, puesto que se emplean dosis de plásmido muy altas). También sería posible utilizar

para su preparación cualquier tipo de liposoma, incluso los más pequeño (tipo SUV), que en un principio no habíamos considerado adecuados para nuestros ensayos de inmunización porque la cantidad de ADN que son capaces de incorporar en su interior es muy escasa.

En segundo lugar, cada unidad del nuevo vector estaría constituida por múltiples liposomas y poliplejos asociados, por lo que la dosis de antígeno y plásmido transportada por unidad de vector sería mucho mayor.

En tercer lugar, al no estar situado el poliplejo en su interior, no es necesario el paso previo de desintegración del liposoma una vez ha ingresado en el citoplasma para que pueda verificarse la liberación del plásmido y subsiguiente transfección, con lo que cabe esperar que esta se verifique más tempranamente.

En cuarto lugar, este nuevo vector proporciona un espacio o compartimento adicional, el núcleo o "*core*" liposomal, que queda libre para ocuparlo con antígenos hidrosolubles o con otras moléculas coadyuvantes de la vacunación.

Por último, el nuevo diseño ofrece una enorme versatilidad, ya que pueden emplearse para su preparación combinados de diferentes suspensiones de liposomas encapsulando toda una variedad de antígenos y/o coadyuvantes; así como emplear distintos plásmidos portadores de diversos genes terapéuticos. El vector resultante transferiría simultáneamente y en cantidades importantes todos los antígenos, genes y coadyuvantes a la misma célula.

Sin embargo, a pesar de sus ventajas, existía un problema en cuanto a la caracterización. Aunque la estructura propuesta (liposomas asociados externamente a poliplejos) era muy plausible, las experiencias preliminares de turbidimetría y centrifugación comentadas anteriormente no constituían una verdadera prueba de la realidad de esta estructura, y ni

quiera justificaban con la suficiente solidez la formación del vector.

Y otro aspecto que más adelante, al considerar las experiencias de inmunización *in vivo*, se revelaría como esencial: es necesario disponer de una técnica que establezca cual es la relación cuantitativa entre los dos componentes, liposomas y poliplejos, para que se forme el vector sin que el componente liposomal quede en exceso. Si parte de los liposomas quedan libres por encontrarse en exceso, por sí solos estos tendrían capacidad inmunizadora, ya que transportan el antígeno. Los resultados e interpretación de los experimentos no se podrían atribuir únicamente a la capacidad inmunizadora del lipopoliplejo. Resultaba claro que utilizar cantidades apropiadas de los dos componentes, liposomas y poliplejos, para que no quedasen liposomas libres sin reaccionar, era un aspecto esencial de la preparación de estos complejos.

Un examen de la abundante literatura científica existente en el campo mostró sin embargo que las técnicas apropiadas no habían sido todavía desarrolladas, a pesar de su necesidad evidente. Los escasos métodos publicados para caracterizar complejos de asociación liposomas/policación/ADN no eran adecuados, desde que requerían procedimientos analíticos complejos, tales como cromatografía líquida de alta presión, o no diferenciaban aspectos como qué fracción del componente lipídico estaba unida o libre, etc. (Tsai, Furstoss et al. 2002). Nuestro trabajo quedó focalizado en demostrar la realidad del vector, y en desarrollar técnicas sencillas capaces de caracterizarlo, puesto que este aspecto resultaba clave para posibilitar su uso en los ulteriores estudios de inmunización antitumoral.

Caracterización del lipopoliplejo: arrastre del poliplejo por el liposoma. Nuestra primera aproximación hacia una demostración experimental de la formación del vector fue tratar de demostrar el complejo mediante ultracentrifugación, mediante una serie de experiencias que llamamos "arrastre

del poliplejo por el liposoma". Estos experimentos, similares pero más elaborados que las experiencias iniciales de centrifugación descritas anteriormente, trataban de determinar la cantidad mínima de liposomas necesaria para hacer sedimentar completamente los poliplejos ADN/PEI por centrifugación.

Sin embargo, aunque el método rindió resultados que parecían confirmar la realidad del lipopoliplejo, estos no eran lo suficientemente claros, y resultó también muy problemático a nivel experimental. Y solo moderadamente satisfactorio, puesto que no permitía caracterizar cuantitativamente los dos componentes, liposomas y poliplejos, que intervienen en la formación del lipopoliplejo.

El problema principal era que el poliplejo control (sin adicionar de liposomas) por sí solo sedimentaba parcialmente tras centrifugar, aunque sólo en una fracción, típicamente de un 30-40% (y permaneciendo por tanto un 60 –70 % de la fluorescencia en el sobrenadante, lo que coincidía con lo que se afirma en el protocolo de Goula de preparación de poliplejos ADN/PEI en medios libres de iones, que "*generan por encima de un 60% de partículas pequeñas*"). Además, la preparación del poliplejo no era reproducible. De una a otra preparación, la proporción de poliplejo que sedimentaba por sí solo era muy variable, llegando en algunos casos hasta el 70%.

Por último, se comprobó que la fracción de poliplejo que sedimentaba aumentaba con el tiempo, sugiriendo un fenómeno de agregación. Mediante un experimento adicional, se fijó en 15 minutos el tiempo óptimo para el uso de la solución de poliplejos desde su preparación (datos no mostrados).

Por otro lado, una dificultad más surgió al tratar de centrifugar los liposomas de tipo MLV, DRV o FT-MLV en las soluciones de 5% Glc. Al centrifugar las mezclas de poliplejos y liposomas, en lugar de sedimentar todo el

componente liposomal, una fracción importante aparecía formando una fase flotante superior de color blanco, mientras que también aparecía otra cierta cantidad de material blanquecino sedimentado. Se comprobó que tanto la fase superior como la inferior contenían poliplejos, mediante medida de la fluorescencia de alícuotas de ambas fases con la sonda fluorescente picoGreen®. Se producía un fuerte incremento de la fluorescencia de las muestras tratadas con heparina con respecto a las muestras sin heparina (la heparina que el poliplejo plásmido/PEI, permitiendo la internalización del picoGreen® en el ADN y la subsiguiente emisión de fluorescencia de la sonda).

Este problema afectaba a las medidas, ya que recoger una alícuota de la fase sobrenadante intermedia, para comprobar cuanto poliplejo permanecía sin formar parte del LPP sedimentado y/o flotante, resultó inviable. Al introducir la punta de la pipeta, al atravesar la capa superior, parte del material blanquecino liposomal se mezclaba inevitablemente con el de la fase intermedia, con lo que se obtenían resultados sin sentido, debido al diferente grado de “contaminación” de las muestras con el material de la fase superior. Otras alternativas que ensayamos (perforar el tubo con una jeringa y extraer así directamente la alícuota) fueron descartadas, por resultar poco prácticas.

En cuanto a la cuantificación del lípido del sobrenadante, aunque en principio podría hacerse por el método del ferrotiocianato, esta técnica no es muy sensible y requiere volúmenes de muestra grandes, por encima de los que utilizábamos en nuestros experimentos de medida de la fluorescencia en placa. Una solución también probada para cuantificar el lípido, evitando el inoperativo método del ferrotiocianato, fue la de utilizar liposomas cargados con una sonda fluorescente, la carboxifluoresceína. Esta sonda permite cuantificar de forma muy sensible el contenido en lípidos mediante fluorescencia. La carboxifluoresceína encapsulada a concentraciones muy altas en un liposoma, sufre una autoextinción o *quenching* que desaparece cuando

se rompe el liposoma y se difunde por el medio, aumentando enormemente la fluorescencia, lo que constituye la base de la alta sensibilidad del método. Una alícuota del sobrenadante, tratada con un detergente como SDS o Triton X100 rompe los liposomas y libera la carboxifluoresceína de su interior, y puede medirse su fluorescencia e interpolar el resultado en una curva patrón de liposomas de carboxifluoresceína previamente calculada.

Sin embargo, el uso de liposomas cargados con carboxifluoresceína también resultó ser una vía muerta hacia la técnica de caracterización de lipopolíplejos buscada, ya que nos encontramos con múltiples interferencias (desactivación o *quenching*) entre los distintos reactivos y fluoróforos presentes, que disminuían la emisión fluorescente: los controles mostraron que la fluorescencia del ADN se veía afectada por la presencia de carboxifluoresceína, la de esta por la presencia del detergente y por el ADN o picoGreen (R), etc.

Por otro lado, los experimentos parecían indicar que no era posible encontrar una cantidad mínima definida de liposomas para arrastrar el complejo, ya que obteníamos resultados similares con suspensiones de concentraciones de liposomas pequeñas o grandes, dentro de un rango de variación de un orden de magnitud. Estos resultados sugerían que el complejo se forma solo a partir de una cierta concentración de liposomas, pero si la concentración de liposomas aumenta, a partir de ahí se los complejos se estructuran según el liposoma disponible. No fue posible, debido a los problemas de la técnica ya comentados, demostrarlo en esta serie de experimentos. En estos primeros momentos del desarrollo del proyecto, solo era una tendencia en los datos que nos resultaba evidente tras analizar docenas de experimentos, pero que no se mostraba con claridad en los experimentos individuales. Pero experiencias posteriores con las nuevas técnicas desarrolladas en nuestro laboratorio, confirmaron que la relación liposomas/políplejos a la que se forma

completamente el lipopolipolejo no es única, sino que esta tiene lugar a lo largo de un intervalo de concentraciones, lo cual es explicable si los lipopolipolejos se estructuran de diferente manera a cada concentración de ese intervalo.

En resumen, como conclusiones de esta serie de experimentos, podemos aseverar que:

- es necesario establecer un tiempo fijo de utilización de las soluciones de polipolejos desde su preparación, para estandarizar los experimentos, ya que la población de partículas varía con el tiempo (probablemente se debe a un fenómeno de agregación). Se fijó este tiempo en 15 minutos como el óptimo para la utilización de la solución de polipolejos
- una fracción importante del polipolejo sedimentaba en las condiciones necesarias para centrifugar el liposoma; lo cual dificultaba en gran medida una interpretación clara de los resultados experimentales (aunque más adelante, como se comentó en los resultados, este problema se solucionaría utilizando un plásmido extraído en condiciones que evitasen la presencia de sales en el plásmido purificado)
- dependiendo del tipo de liposomas utilizado, es necesario modificar la densidad del medio de formación del complejo, para evitar la flotabilidad de los liposomas

En conclusión, tras probar muchas vías, quedó claro que esta aproximación experimental no conduciría a una técnica de caracterización de lipopolipolejos adecuada. Por otro lado, aún con sus limitaciones, el análisis y realización de esta larga serie de experimentos nos dejó como legado una confianza en la realidad del lipopolipolejo, aún cuando no se demostrase con claridad en los experimentos individuales y, sobre todo, condujo a una estandarización en el método de preparación de los lipopolipolejos.

Demostración de la formación del lipopolipolejo por electroforesis. A consecuencia de las diversas dificultades comentadas, nos decidimos a abandonar la caracterización

por centrifugación. La sedimentación del poliplexo libre dificultaba en gran medida la interpretación del experimento, y era necesario encontrar otra técnica analítica para la caracterización de los vectores LPP. Sin embargo, hasta la fecha no había desarrollada ninguna técnica de caracterización satisfactoria. En algunos trabajos publicados en la bibliografía, sí aparecían complejos entre liposomas y poliplexos de ADN constituido con polímeros de diversos tipos (protamina, polilisina). Pero en todos los trabajos que revisamos, o bien la técnica que empleaban no era satisfactoria en cuanto a un verdadero y completo análisis de los constituyentes del sistema, o simplemente se obviaba la caracterización del vector (Mustapa, M. F., P. C. Bell, et al. 2007; Brito, L., S. Little, et al. 2008; Matsumoto, M., R. Kishikawa, et al. 2008; Gaedtke, L., J. Pelisek, et al. 2007).

La electroforesis se ha utilizado típicamente para caracterizar la interacción entre el ADN portador del gen a transfectar y el correspondiente vector de transferencia génica. El “*ensayo de retardo en gel*” permite demostrar la formación de un complejo ADN-vector. Sin embargo, en nuestro conocimiento, nunca se ha utilizado o descrito una electroforesis para caracterizar la presencia de liposomas migrando a través del gel ¿Podría funcionar un análogo del ensayo de retardo en gel para lipopoliplexos y liposomas? El rasgo esencial de tal ensayo sería encontrar un modo de detectar los liposomas migrando a través del gel, ya que en caso contrario no sería posible “revelar” el resultado de la electroforesis. A partir de liposomas fluorescentes (que encapsulaban una sonda fluorescente hidrosoluble) desarrollamos en nuestro laboratorio una nueva técnica analítica para caracterización de lipopoliplexos que permitía demostrar la interacción poliplexo-liposoma; así como la relación de concentraciones óptima para formar el lipopoliplexo sin exceso de liposomas.

Las primeras experiencias para el desarrollo del nuevo método fallaron. El tipo de liposoma elegido fue el SUV, por razón de ser el más pequeño, para evitar en lo posible

cualquier restricción de paso por tamaño a través de los poros del gel. La membrana liposomal es un lugar habitual de marcaje de liposomas con sondas fluorescentes, y al preparar la suspensión liposomal con una sonda de membrana (NPN), era perfectamente visible bajo la luz fluorescente del transiluminador UV. Pero después de correr la electroforesis, la fluorescencia desaparecía del pocillo pero no se veía marca o banda alguna en el interior del gel. Cambiando la sonda NPN por otras de emisión más intensa y usadas a saturación, si aparecían unas más que dudosas bandas en el interior del gel, prácticamente inaparentes y casi invisibles. Este resultado, sin embargo, mostró que el sistema podría funcionar si se conseguía una emisión de luz suficientemente intensa. Ahora bien, la membrana liposomal, como lámina bidimensional que es, solo puede acomodar un limitado número de moléculas de fluoróforo ¿Por qué no situar la sonda en el interior, en el core o núcleo, en el que pueden incorporarse un número de moléculas mucho mayor? Para el siguiente ensayo, se eligió una sonda hidrosoluble, la carboxifluoresceína, que se situaba en el interior del liposoma. Una nueva electroforesis de liposomas cargados con carboxifluoresceína mostró una banda ancha de fluorescencia verde-amarillenta de la carboxifluoresceína, de emisión sumamente intensa, y otra en posición más adelantada y perfectamente definida o delimitada, que fueron interpretadas como la correspondiente a la sonda libre (que migraba y difundía más rápidamente) y a la sonda encapsulada en liposomas (de movilidad más restringida, y de color verde debido al fenómeno del autoapantallamiento de la sonda encapsulada a elevada concentración). Este ensayo constituye, en nuestro conocimiento, la primera electroforesis de liposomas descrita en un laboratorio. La electroforesis con carboxifluoresceína (CF) no funcionó con otros tipos de liposoma, ya que estos quedaban retenidos en el pocillo, en virtud seguramente de su mayor tamaño, superior al tamaño medio de poro del gel de agarosa.

Con el liposoma evidenciado mediante la CF, el ensayo de retardo en gel se diseñó utilizando dos reactivos capaces de

disociar específicamente cada uno de los componentes del lipopolipolejo: la heparina, un polímero aniónico, que competía con las cargas negativas del ADN plasmídico de los polipolejos y liberaba el plásmido del PEI; y el Triton X-100, que "disolvía" los liposomas. Para revelar el plásmido liberado, se utilizó bromuro de etidio, que tiñe las bandas de ADN de color rosa-anaranjado bajo iluminación ultravioleta.

La consecución final de la técnica fue bastante laboriosa y requirió un buen número de experiencias, ya que la carboxifluoresceína proporcionaba una emisión fluorescente tan intensa que impregnaba todo el gel, apareciendo en las primeras experiencias un gel de agarosa teñido completamente de fluorescencia verde. Quedó pronto claro que, para evitar este efecto, las suspensiones de liposomas encapsulando CF debían purificarse de la CF libre no encapsulada, que contaminaba visualmente los geles en tal grado que hacía imposible el revelado. Mediante columnas cromatográficas de gel exclusión, las suspensiones de SUV(CF) eran separadas de los restos de sonda libre no encapsulada, previamente a su uso en la preparación del lipopolipolejo. Asimismo, para evitar efectos similares, hubo que optimizar la cantidad de producto cargado por pocillo. Por último, fue necesario ajustar los parámetros de la cámara fotográfica, en un proceso de ensayo y error hasta obtener fotografías en color nítidas que mostrasen los colores de cada banda al revelar el gel.

La electroforesis mostraba el LPP sin tratar retenido en los pocillos, pero que producía una banda de fluorescencia verde correspondiente a los liposomas libres cuando se disociaba el PP tras añadir heparina, o una banda de fluorescencia naranja cuando se destruía el liposoma con el detergente Triton X100. El tratamiento con heparina era el más interesante, desde que la disociación de los polipolejos liberaba el plásmido, pero también desestructuraba los lipopolipolejos apareciendo en total dos bandas, una naranja del plásmido libre y otra verde del liposoma libre. El tratamiento con solo detergente únicamente mostraba una banda intensa de

migración más rápida, correspondiente a la CF que había salido del liposoma. Esta técnica mostraba pues la presencia de un complejo de asociación entre liposomas y poliplejos, constituyendo por fin una sólida demostración de la existencia del nuevo vector.

En un trabajo publicado que contemplaba los geles de agarosa como modelo de difusibilidad de fármacos en el tejido cerebral, los autores estudiaban la distribución de tamaños de poro de los geles de agarosa mediante la infusión de nanopartículas de materiales cerámicos (y por tanto indeformables) que presentan fluorescencia (G T Gillies et al 2002). El estudio concluye que el rango de tamaños de poro presentes en la estructura de geles de agarosa a baja concentración se encuentra entre 10 y 100 nm, lo que concuerda plenamente con nuestros resultados experimentales (el rango de tamaños de las preparaciones de liposomas SUV se sitúa en torno a los 20-80 nm). También explica el hecho de que liposomas de tamaños mayores (MLV, DRV), cuyos diámetros medios exceden ampliamente el límite de 100 nm, no migraran a través del gel, quedando retenidos en el pocillo.

Según nuestro conocimiento, nuestro método de análisis electroforético aplicado a liposomas constituye el primero descrito en la bibliografía.

Visualización del vector por microscopía confocal. La técnica electroforética dio lugar a una nueva idea: la formación del LPP podría visualizarse también directamente, mediante microscopía óptica de fluorescencia. Mediante esta técnica se demuestra la formación del LPP, si bien en forma no cuantitativa. Las imágenes tienen un interés en cuanto a que demuestran sin dudas la complejación de los liposomas mediada por la adición de la solución de poliplejos, reforzando así la interpretación de las electroforesis de liposomas anteriores. Sin embargo, hay que tener en cuenta que no demuestran una formación cuantitativa del LPP, ya que en los agregados observados pudieran estar involucrados

tan solo una mínima fracción de los liposomas y poliplejos presentes en la solución, y encontrarse libres la mayoría del PP y los liposomas. Mediante la observación directa no es posible discriminarlo, y es desde este punto de vista adquiere valor la caracterización electroforética como técnica completa, desde que la electroforesis sí asegura que todo el lípido y poliplejo están interviniendo en la formación de los complejos. Si no hay bandas de liposomas libres o de plásmido libre presentes en el seno del gel de agarosa, el significado de ello es que todos los componentes están formando parte del lipopoliplejo que aparece retenido en el pocillo.

Tras la mezcla de la solución de poliplejos ADN/PEI con diferentes formulaciones de liposomas SUV que encapsulaban carboxifluoresceína, se sometieron a observación bajo microscopía confocal alícuotas de estas preparaciones. En todos los casos se observaba una población de partículas que mostraban intensa fluorescencia verde, en un rango de tamaños de micrómetros. Las muestras control, que contenían una concentración idéntica de liposomas SUV(CF), no mostraban partículas fluorescentes, tan sólo un campo oscuro (los liposomas SUV son demasiado pequeños para ser visualizados, encontrándose por bajo del límite de resolución del aparato). Por lo que podemos aseverar que se han formado agregados de liposomas SUV(CF) debido a la presencia de la solución de poliplejos; y considerándolos en conjunto con los experimentos de centrifugación (en los que el poliplejo no sedimentaba por sí sólo, pero sí cuando se mezclaba con liposomas) y los experimentos electroforéticos anteriores (en los que los liposomas quedan retenidos en el pocillo tras mezclarlos con el PP), resulta razonable concluir que estos agregados son debidos a la formación de un complejo entre liposomas y poliplejos, el lipopoliplejo (LPP).

La comparación de la imagen de las muestras de LPP respecto a muestras que contienen solo una cantidad equivalente de liposomas SUV revela una población de partículas fluorescentes, en las muestras de SUV(CF) + PP

pero que no aparece en las muestras con liposomas SUV (CF) solos (estos liposomas son demasiado pequeños para ser visualizados, y el campo aparece oscuro). El tamaño, homogeneidad de la población y aspecto de los agregados depende de la composición del liposoma. Los liposomas de SM:CH:DP que utilizamos en la vacunación con antígenos lipídicos son complejos de tamaños más pequeños y de fluorescencia más intensa, sugiriendo que son más compactos. Otras formulaciones rinden agregados de lipopolíplejos de aspecto menos denso, pero mayores en tamaño.

Para el uso de vectores tipo lipopolíplejo como vehículos de vacunas basadas en antígenos, es esencial conocer la relación óptima entre liposomas y políplejos para formar el vector. El vector LPP se planteaba como un vehículo especializado en el cotransporte simultáneo de moléculas y ADN. Como posible partícula a fagocitar por las células del sistema de defensa retículo-endotelial tras ser administrado por vía subcutánea, el LPP sugería excelentes cualidades *a priori*: la posibilidad del cotransporte de antígenos en compartimientos independientes y, sobre todo, que la entrega de las sustancias vehiculadas se realizaría simultáneamente *a la misma célula*. Bien sea encapsulando antígenos en el interior o bien con antígenos situados en la membrana liposomal, el LPP puede incorporar moléculas en cantidades elevadas y genes de, por ejemplo, citoquinas coadyuvantes para estimular el sistema inmune en una vacunación. Su estructura sugería que el LPP podría ser especialmente adecuado como vehículo de antígenos en ensayos de vacunación.

Sin embargo, para poder interpretar correctamente la relación entre el antígeno aportado y la respuesta inmunológica observada, pronto quedó claro que *era un requisito esencial el que no hubiese liposomas libres en exceso una vez preparado el vector LPP*. Si esto ocurriera, en lugar de inmunizar con un único producto (el LPP), estaríamos inmunizando con dos sistemas simultáneamente, el LPP y con los liposomas libres, que también contienen los

antígenos. Por lo que sería imposible atribuir la respuesta inmune únicamente al LPP, lo cual conllevaría seguramente incoherencias experimentales entre los diferentes ensayos de inmunización que realizásemos con nuestros antígenos. Resulta pues esencial un método que nos permita medir la cantidad óptima de liposoma a aportar en el proceso de formación del LPP para asegurarnos que este componente no entra en exceso, pues en caso contrario conduciría a la presencia de una cierta cantidad (desconocida) de liposomas libres con capacidad inmunogénica.

A pesar del evidente interés de ello, no existía en la bibliografía ninguna técnica publicada que permita medir la relación óptima liposoma/polipepto en complejos ternarios de asociación liposomas/polipeptos, como hemos comentado anteriormente. Las escasas publicaciones relacionadas con la caracterización de vectores de asociación liposomas/polipeptos, describían métodos que únicamente cuantifican la cantidad total de lípido y/o ADN, pero que no permitían determinar si el lípido se encuentra formando parte del complejo vector o en forma libre; ni tan siquiera comprobar si el lípido permanece en forma de liposoma o bien ha precipitado o formado micelas, etc. Por lo que nos planteamos aplicar la técnica anterior desarrollada de la electroforesis de liposomas fluorescentes como método experimental para medir esta relación.

La relación óptima entre liposomas y polipeptos puede ser determinada mediante una nueva técnica experimental basada en la electroforesis en gel de liposomas fluorescentes. El ratio entre liposomas y polipeptos que vamos a utilizar en la preparación del vector debería ser tal que se produzca una reacción completa entre los dos componentes del lipopolipepto. Sin que haya un exceso de liposomas no unidos que queden libres, no formando parte del LPP. Es esencial que esta relación esté bien establecida, porque en caso contrario obtendríamos un producto de vacunación "mixto", que contiene tanto LPP como liposomas libres (que también portarán el antígeno utilizado en la vacunación); y no será

posible atribuir la respuesta inmune observada únicamente al LPP.

Preparando el LPP a partir de una cantidad constante de poliplexo ADN/PEI, y variando la cantidad de liposoma SUV(CF) añadida, se prepararon una serie de ocho diferentes soluciones de LPP en las que se variaban las relaciones entre liposomas y poliplexos utilizadas en la formación del vector. Esta serie de soluciones se sometió a un ensayo electroforético de retardo en gel, para determinar cuáles de estas preparaciones mostraban un exceso de liposomas que, por no formar parte del LPP, migrarían a través de la agarosa apareciendo como liposoma libre que se visualiza en el gel como una banda de fluorescencia verde bajo iluminación ultravioleta. La figura 33 muestra los resultados e interpretación de este experimento.

La preparación de las diferentes soluciones de LPP se realizó mediante dos procedimientos distintos. En el primero, se utilizaron diluciones sucesivamente menores de una solución madre de liposomas, de las que se añadía un mismo volumen al poliplexo para formar el LPP. En el segundo procedimiento, se añadieron volúmenes decrecientes desde una solución madre de liposomas al poliplexo, completándose luego todas las soluciones a un mismo volumen final con 5% Glc. Esta experiencia fue realizada preparando el LPP mediante dos protocolos diferentes para apoyar que nuestra interpretación (los liposomas libres migrarían a través del gel delatando su intervención en exceso) era correcta. En efecto, ambos métodos de preparación rindieron resultados similares: las relaciones más elevadas entre liposomas/poliplexos mostraban bandas verdes de migración de liposomas libres, que disminuían hasta desaparecer a una cierta *relación óptima*, para los dos métodos de preparación.

Mediante esta técnica, pudimos establecer una relación óptima para preparar los lipopoliplexos de formulación SM:CH:DP:GD3 con liposomas SUV y poliplexos pMOK/PEI N:P 1:1,4, siendo las dosis decididas para la

inmunización eran de 3.3 nmoles de antígeno GD3 y 50 µg de plásmido conteniendo el gen de la citoquina inmunoestimulante GM-CSF por animal. La relación de formación del LPP obtenida fue que una dosis de 50 µg de ADN complejaba aproximadamente 0,3µmoles de liposomas, por lo que se constituyeron los liposomas con un 10% de GD3 para que en el LPP resultante se encontrasen 3.3 nmoles de antígeno GD3 por cada 50 µg de ADN. Este dato fue esencial en nuestra primera experiencia de inmunización con antígenos lipídicos vehiculados en el lipopoliplexo, como veremos en los apartados posteriores.

Sin embargo, la técnica seguía adoleciendo de una limitación importante: no servía para caracterizar liposomas grandes, pues estos no migraban a través del gel, como comprobamos en multitud de experiencias, en las que utilizamos diferentes agarosas comerciales, distintos tipos de liposoma (MLV, FT, DRV) y geles de muy bajo tanto por cien de agarosa (de entre 1-4% de agarosa, datos no mostrados). Los liposomas grandes quedaban en todos los casos retenidos en los pocillos. Y de hecho, el estudio de Gillies antes citado (G T Gillies et al 2002) establecía un límite de 100nm para el paso de partículas a través del gel. Una técnica completa para caracterización de lipopoliplexos estaba aún por desarrollar.

Una segunda limitación se puso de manifiesto al tratar de caracterizar los lipopoliplexos de RCC10/DOTAP:CH utilizados en la vacunación contra tumor con GD3. La técnica no funcionaba para los liposomas SUV preparados con DOTAP. Tras descartar, mediante una serie de experiencias, que fuese un efecto relacionado con un tamaño excesivamente grande de los liposomas SUV de DOTAP (datos no mostrados), descubrimos que lo que sucedía en realidad era una interacción entre el liposoma de DOTAP y la agarosa, que impedía la migración electroforética. De hecho, esto explicaba un curioso aspecto de las electroforesis de los liposomas de DOTAP: las paredes del pocillo aparecían "curvadas" en el lateral del polo negativo del campo eléctrico después de correr el gel. Se debía pues a que la pared del

pocillo con los liposomas absorbidos era deformada por la fuerza de campo eléctrico que atraía los liposomas, generando estos una presión en la pared del pocillo. Probando varias agarosas de distintos proveedores (ya que las agarosas comerciales varían bastante en su composición en cuanto a residuos de cenizas y características químicas del polímero, según el procedimiento de extracción y material de partida utilizados por los diferentes fabricantes), se descartó que se tratase de un problema relacionado con la agarosa particular que utilizábamos rutinariamente en nuestros ensayos. Se comprobó que en todos los casos se producía esta interacción, con lo que concluimos que *la técnica no es aplicable a liposomas de DOTAP*. Por esta razón, la formación del complejo RCC10/ADN/liposomas no se pudo comprobar previamente a la vacunación, limitándonos a preparar los hipotéticos complejos sin caracterizarlos previamente. Los resultados que obtuvimos en la vacunación mostraron una correspondencia casi idéntica entre los resultados de evolución del volumen del tumor del grupo vacunado con RCC10/liposomas de DOTAP y el grupo control tratado con solo liposomas de DOTAP, evidenciando que el complejo probablemente no se formó, y el producto utilizado para inmunizar a los animales era en realidad una mezcla de liposomas de DOTAP y complejos de RCC10/pMOK independientes. El resultado es interesante, desde que ilustra la importancia de las técnicas desarrolladas en el presente trabajo para la caracterización de los lipopoliplexos, previa a su uso en ensayos de inmunización.

Desarrollo de una técnica de caracterización de lipopoliplexos constituidos con liposomas grandes basada en liposomas cargados con Cloruro de Cesio. Las técnicas electroforéticas desarrolladas en nuestro laboratorio hasta el momento, estaban limitadas a liposomas de menos de 100nm. No servían para caracterizar otros liposomas interesantes, como los de tipo DRV, que resultan más apropiados que los SUV para la encapsulación de antígenos proteicos hidrosolubles. La técnica inicial con la que habíamos

comenzado el estudio de los lipopoliplos, basada en una centrifugación, había fallado debido a que la centrifugación a gran fuerza de campo, necesaria para lograr sedimentar los liposomas grandes, también hacía sedimentar en parte a los poliplos. Sin embargo, el interior liposomal ofrecía una posibilidad no explorada. Este es el lugar en el que se introducen o encapsulan los antígenos, plásmidos o fármacos cuando se usan los liposomas como transportadores en terapia génica, vacunas antitumorales o farmacología clásica. ¿Por qué no cargar los liposomas con una sustancia que aportase una densidad extra al liposoma, permitiendo su centrifugación a baja fuerza de campo? Tras considerar qué características serían deseables en una sustancia apropiada para proporcionar este "lastre" o densidad extra al liposoma, quedó claro que debiera ser una sustancia iónica (para asegurar su solubilidad y que no tendiera a escapar del liposoma una vez internalizada), de gran densidad, de pequeño tamaño y finalmente, de fácil manejo, económica y asequible en el laboratorio. El Cloruro de Cesio reunía todos estos requisitos, siendo quizás una de las sustancias de uso común más densas que puedan encontrarse en el laboratorio de biotecnología. Esta sal de un metal pesado tiene además una excelente solubilidad, y el coste del producto es sumamente barato. *A priori* era una sustancia muy apropiada para encapsular en liposomas, y la eliminación de los restos de CICs no encapsulados se planteaba muy sencilla, mediante una diálisis o incluso una simple centrifugación de los liposomas "densificados" y posterior eliminación del sobrenadante.

¿Qué cantidades de CICs debiéramos encapsular y qué fuerza de campo centrífugo utilizar? Sin llegar a realizar una medida precisa, comprobamos que el límite de solubilidad del CICs estaba en torno a 7M, ya que a concentraciones mayores la sal no se disolvía en su totalidad, aún aportando calor y agitación mecánica. La concentración de la solución de CICs determina su densidad. ¿Que concentración de CICs usar? En principio, dado que su propósito es tan sólo aportar densidad al liposoma, la suficiente para que pueda ser centrifugado a

baja fuerza de campo, parece razonable utilizar la menos concentrada que consiga el efecto buscado. Como el método debe poder aplicarse a cualquier tipo de liposoma, para desarrollarlo escogimos el tipo de liposoma con menor tendencia a sedimentar, el SUV. Tras probar varias soluciones de CICs bajo el criterio de "lograr la sedimentación total del liposoma SUV a baja fuerza centrífuga en 15 min", se escogió una concentración 1M.

Para asegurarnos de que el liposoma era totalmente sedimentado en estas condiciones, se cargaron estos con una mezcla de CICs 1M y CF. Tras la centrifugación, el sobrenadante se trataba con triton X-100, para romper cualquier posible liposoma no arrastrado y liberar su contenido en CF, midiéndose a continuación la fluorescencia de la sonda. Los resultados indicaron que los liposomas cargados con CICs eran totalmente sedimentados en estas condiciones de fuerza de campo tan baja. Los experimentos de formación de lipopoliplos con liposomas cargados con CICs funcionaron ahora muy bien: el poliplo se quedaba en el sobrenadante, excepto la fracción que era arrastrada por interacción con el liposoma durante la centrifugación. Disponíamos de una nueva técnica para caracterizar cualquier tipo de lipopoliplo, independientemente de su tamaño.

La figura 40 muestra una de las experiencias iniciales, en la que se prepara una solución stock de liposomas de concentración 1x, y se añaden volúmenes variables de esta (entre 1 y 8 volúmenes) a una cantidad constante de solución de poliplo ADN/PEI. Se mide la fluorescencia del ADN del poliplo con bromuro de etidio del sobrenadante, antes y después de centrifugar a bajo campo. Si el lipopoliplo se ha formado, la fluorescencia del ADN del sobrenadante tras centrifugar debe desaparecer, pues los PP son arrastrados por los liposomas de Cesio; en caso contrario la fluorescencia permanece.

Así pues, la técnica mostraba un "salto" en la fluorescencia al aumentar la concentración de liposomas, indicativo de la

formación del LPP. En estos experimentos iniciales, se variaba de forma un tanto brusca las adiciones de liposomas sucesivas. Quisimos afinar o definir más la variación a nivel del "salto", esperando encontrar un descenso progresivo y suave de la fluorescencia. Sin embargo, al acotar más finamente el rango de concentraciones de liposomas, con objeto de definir mejor la curva experimental, obtuvimos un resultado completamente inesperado. En lugar de obtener una disminución suave y progresiva, lo que realmente aparecía era una caída muy acusada de la fluorescencia a partir de cierta concentración de liposomas.

Lo que esperábamos era que, a baja concentración de liposomas, se produjera el arrastre de tan sólo una pequeña fracción del poliplejo. Según aumentásemos la concentración de liposoma, se arrastraría una proporción mayor del poliplejo, coexistiendo simultáneamente en esos puntos experimentales los lipopoliplejos, liposomas libres y poliplejos libres. Hasta que se alcanzase una concentración de liposoma suficientemente grande para arrastrar totalmente el poliplejo, cayendo por fin la fluorescencia a cero. Esperábamos obtener pues una disminución paulatina de la fluorescencia hasta caer a la línea basal.

En lugar de eso, nos encontramos una curva con un primer tramo horizontal, indicativa de que, a bajas concentraciones de liposoma, no se forma el LPP; mientras que en un intervalo de concentración muy corto, la fluorescencia caía de forma abrupta a los valores del blanco, indicando *que existe un umbral de concentración de liposomas a partir del cual se forma completamente el LPP*. El resultado es sorprendente, ya que en el tramo inicial se encuentran dos tipos de partículas con cargas opuestas, liposomas negativos y poliplejos positivos, y sin embargo al parecer no forman un complejo sedimentable hasta que se alcanza una relación de concentración umbral mínima entre ambos componentes.

Al probar formar el complejo con liposomas de tipos diferentes, como FT-MLV o DRV, o distintas composiciones

lipídicas, los resultados fueron idénticos. La formación del LPP resulta ser un proceso de tipo "todo o nada": si no se alcanza una concentración adecuada de liposomas, el complejo no se forma.

Este resultado es de gran trascendencia, puesto que explica los resultados inconsistentes observados a veces en experiencias de inmunización con antígenos. Por ejemplo, en una experiencia anterior realizada en nuestro laboratorio, consistente en la inmunización contra el melanoma en ratones mediante extractos de proteínas tumorales encapsulada en liposomas, la respuesta experimental observada en el grupo inmunizado con lipopoliplejo (que portaba el gen de una citoquina inmunoestimulante) no mostraba diferencias con respecto al grupo inmunizado con liposomas solos utilizado como control. El análisis mediante la técnica del CICs (no desarrollada en el momento en que se realizó este ensayo) mostró que, el producto con que se inmunizó a los ratones, estaba por debajo del umbral necesario para la formación del LPP, con lo que realmente se inmunizó con una mezcla de liposomas libres y poliplejos. Lo cual explica que los resultados fueran idénticos que los del grupo de liposomas solos control.

Según nuestro conocimiento, el requisito de una relación de concentraciones necesaria para la formación de complejos entre liposomas y complejos poliméricos de cargas opuestas es un fenómeno no descrito (al menos en la literatura afín a la terapia génica y al campo de la biomedicina/biotecnología). De hecho, el resultado es bastante sorprendente, dada la naturaleza de las sustancias participantes (poliplejos catiónicos y liposomas aniónicos). Cabría esperar es que la interacción iónica se verificase a cualquier relación de concentraciones entre ambos componentes ¿Por qué se requiere una cierta concentración de liposomas para que interaccionen con los poliplejos? Posiblemente la razón es que se trata de un fenómeno cooperativo. A baja concentración de liposoma, seguramente también se verifica la interacción con el poliplejo, pero de forma reversible. Y

solo a partir de un umbral de concentración es cuando tiene lugar el proceso de precipitación del LPP, en el que se unen cooperativamente un número elevado de unidades de liposoma y poliplejo, estructurándose en un complejo de forma irreversible. La hipótesis de que la interacción inicial entre liposoma y poliplejos es reversible explicaría el por qué no se arrastra (o no de manera significativa) el poliplejo al centrifugar en el rango de concentraciones iniciales (antes del umbral de formación).

Otro mecanismo alternativo o quizás concurrente, es suponer que el PEI libre juegue un papel en la formación del LPP. Los poliplejos se constituyen a una relación N/P =10. Habiendo diez veces más concentración de grupos amino positivos de PEI respecto a la de los grupos fosfato negativos del ADN, probablemente haya una cantidad importante de PEI libre en la solución que no intervenga en la constitución del poliplejo. A relaciones liposoma/poliplejo bajas, este PEI libre presenta probablemente una mayor afinidad que el poliplejo para la unión a los liposomas, por tener una mayor flexibilidad estructural, difusibilidad y densidad de carga que el PEI unido al ADN en el poliplejo. Con lo que se une al liposoma, neutralizando todas las cargas negativas presentes en su superficie, por lo que no se verifica la interacción liposomas-poliplejos. Conforme vamos aumentando la cantidad de liposomas añadida sobre la solución constante de poliplejos, llega un momento en que el PEI libre es insuficiente para neutralizar todo el liposoma, y esa la relación umbral en la cual tiene lugar la interacción cooperativa liposomas-poliplejos. Existe un estudio en el que se muestra que, efectivamente, hay una cantidad muy importante de PEI libre (hasta un 60% de la dosis inicial) después de formarse el poliplejo a relaciones N/P altas (Erbacher P, Bettinger T 2004).

En resumen, el método de centrifugación con CICs permite determinar el umbral de concentración en el que se forma el lipopoliplejo. Sin embargo, no nos informa acerca del límite en el que la concentración de liposomas es excesiva y

empiezan a aparecer liposomas libres que no forman parte del lipopoliplexo. Puede parecer un dato innecesario ya que, en principio, siempre podríamos formar el lipopoliplexo a la relación umbral definida por el experimento de centrifugación con Cesio, asegurándonos así de que no hay exceso de liposomas. Pero en la práctica esta restricción puede plantear problemas. Pensemos por ejemplo que en nuestro ensayo pretendemos utilizar una solución de antígenos proteicos extraídos de células tumorales, que hemos encapsulado en el liposoma. Si el rendimiento de la extracción y/o encapsulación es bajo (como suele suceder), nos interesará formar el LPP con una cantidad elevada de liposomas, para alcanzar una dosis suficiente de antígeno en el complejo. Si estamos restringidos por el umbral de formación, podemos encontrarnos con que no podemos aportar la dosis de antígeno deseada con nuestro vector. Se hace necesario pues el desarrollo de una técnica que permita establecer el límite de "aceptación" por parte de una cantidad dada de poliplexos, a partir del cual el liposoma empieza a quedar libre y ya no entra en su totalidad a formar parte del lipopoliplexo.

Estas limitaciones resultaron muy patentes en nuestras experiencias de inmunización cuando ensayamos el LPP cargado con proteínas de membrana (TMP) en los experimentos de inmunización antitumoral. La técnica del CICs nos permitió definir las relaciones en las que el LPP se formaba con la cantidad mínima de liposomas posible, pero hubiésemos querido aumentar esa cantidad para conseguir un vector lipopoliplexo con mayor carga de antígeno. Pero dado que la técnica del Cesio no permitía más que conocer la relación mínima en la que se formaba el LPP, tuvimos que preparar los vectores con estas cantidades mínimas. Hubiese sido deseable poder aumentarlas, pero a riesgo de que parte del liposoma quedase libre, invalidando o dificultando la interpretación de los resultados de la experiencia (ya que la inmunización hubiese sido "mixta", con LPP y con liposomas libres, ambos productos con capacidad antigénica). Una técnica verdaderamente definitiva de caracterización de

lipopoliplos debiera ser capaz de medir no solo la cantidad de liposomas a la que el complejo se forma para una cantidad de poliplo dado, sino también la relación a la que el poliplo no admite más liposomas para complejarse y estos comienzan a quedar "libres" en la solución.

Estudio de la Biodistribución del lipopoliplo en bazo.

La biodistribución del vector en un tejido linfático organizado, como el bazo, donde tiene lugar la presentación de antígenos, es una característica importante de un vector que sea utilizable en ensayos de inmunización. El bazo es un órgano linfoide secundario donde tiene lugar el reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos, que son presentados por las células presentadoras de antígenos que han fagocitado la partícula antigénica contra la que se desarrollará la inmunidad. El lipopoliplo, por sus características, es un vector dirigido fundamentalmente a células con capacidad fagocítica. Se ha comprobado además que los poliplos de protamina tienen una capacidad de transfección mejorada de macrófagos respecto de su contrapartida de sólo lipoplo (Dokka, S., D. Toledo, et al. 2000)

Por esta razón, procedimos a la realización de un ensayo fluorescente que permitiera comprobar la distribución del contenido del vector en bazo, en particular si se localizaba la marca fluorescente con la localización anatómica de las células presentadoras de antígeno en el bazo (zona marginal de los nódulos linfoides).

Una técnica sencilla para verificar si efectivamente tiene lugar la internalización y subsiguiente presentación a los linfocitos del vector de vacunación, por parte de las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas, etc.) es el marcaje con yoduro de propidio del vector. Esta molécula presenta dos propiedades adecuadas para este tipo de ensayo. En primer lugar, debido a su carga iónica y a la ausencia de un transportador de membrana, no puede atravesar las membranas plasmáticas celulares, de forma que

solo puede incorporarse a la célula mediante su encapsulación en un vehículo adecuado, tal como liposomas o lipopoliplos. Y en segundo lugar, una vez internalizada en la célula puede acceder al núcleo e interactuar con el ADN, intercalándose entre las bases apiladas y aumentando en gran medida su emisión fluorescente. Las células marcadas con IP aparecen rojas bajo iluminación con luz verde, en particular sus núcleos aparecen intensamente teñidos.

Aprovechando la capacidad de incorporación de sustancias hidrosolubles en el compartimento interno liposomal del complejo, el lipopoliplo fue preparado con liposomas que encapsulaban IP, administrándose a los ratones 10 µg de IP por vía intravenosa, a través de la vena de la cola. Una cantidad equivalente fue administrada en forma de liposoma de tipo MLV libre. Una hora más tarde los animales fueron sacrificados; se extrajo el bazo y previa fijación y crioprotección, se observaron al microscopio de fluorescencia secciones transversales montadas bajo técnicas estándar de microscopía. Las imágenes de microscopía muestran que la marca fluorescente roja se presenta en las zonas marginales de los nódulos linfoides, coincidiendo con la zona anatómica donde se localizan y acumulan los macrófagos para verificar la presentación de antígenos a los linfocitos del bazo, y que no aparece en los animales inyectados con la solución de IP 10 mM en glucosa. Aunque la técnica no es cuantitativa, parece apreciarse que la marca fluorescente roja es ligeramente más intensa en el caso del lipopoliplo, sugiriendo una mayor eficacia en la entrega de moléculas hidrosolubles de este vector frente al liposoma.

Formación del LPP: rango de relaciones óptimas de sus componentes.

En la búsqueda de una técnica completa, capaz de determinar también la relación en la que los liposomas se encuentran en exceso (frente a una cantidad de poliplo constante), pensamos en utilizar el fenómeno de apantallamiento de la fluorescencia ("*autoquenching*"). La hipótesis de trabajo era

la siguiente: el autoapantallamiento de moléculas fluorescentes se verifica a concentraciones elevadas, debido a la competencia entre moléculas próximas por "capturar" los fotones de energía adecuada para que se verifique la promoción de electrones a un nivel energético superior (excitación) y subsiguiente desexcitación electrónica con liberación de energía lumínica (emisión fluorescente). Es decir, si las moléculas están muy próximas, existe un fenómeno de competencia por el cual baja el rendimiento cuántico, y la emisión fluorescente es menor (autoapantallamiento). Pensamos que ese fenómeno se podría manifestar al formarse el LPP, ya que el complejo aglutina los liposomas antes libres, y si estuviesen marcados con una sonda fluorescente, los liposomas complejados emitirían menos fluorescencia por el autoapantallamiento. Cuando estuviesen en exceso porque el LPP no admitiese más liposoma, habría de nuevo un aumento de fluorescencia procedente de liposomas libres no apantallados.

Múltiples experiencias de "autoapantallamiento" se desarrollaron a lo largo de un año, pero no rindieron el resultado esperado. La curva teórica buscada nunca se observó. En su lugar, obtuvimos en todos los casos una curva hiperbólica de aumento de la fluorescencia con la concentración de liposomas, cuya interpretación no está clara pero que quizás esté relacionada con un fenómeno de dispersión de la radiación electromagnética debido a la alta concentración liposomal. Omitiremos los detalles experimentales y en su lugar realizaremos una breve reseña de las experiencias de apantallamiento realizadas (datos no mostrados):

1) Experimentos con sondas fluorescentes localizadas en la membrana del liposoma (pireno); la sonda se incorporaba en la membrana del liposoma antes de preparar el LPP, esperándose detectar el autoapantallamiento por comparación con una suspensión liposomal control marcada con pireno pero sin poliplejos presentes.

2) Experimentos con la sonda (CF) en el interior del liposomas; similares a los anteriores, pero con la sonda fluorescente en el interior liposomal y con una intensidad de fluorescencia muy superior respecto de las anteriores.

3) Experimentos de diferencias cinéticas en cuanto a la incorporación de una sonda fluorescente desde el exterior; al lipopoliplejo formado con liposomas no marcados se agrega desde el medio una sonda (NPN) que se introduce en la membrana liposomal aumentando la emisión fluorescente, esperándose detectar diferencias comparando con una solución conteniendo solo liposomas, pues la cinética de absorción en el liposoma se vería disminuida en los lipopoliplejos por las dificultades de difusión de la sonda hasta los liposomas más internos del LPP

Combinación de las técnicas de fluorescencia y centrifugación. Dado que la búsqueda de una técnica mediante el apantallamiento de la emisión fluorescente o las diferencias cinéticas no había rendido los resultados esperados, fue necesario idear otro enfoque distinto. Una nueva estrategia combinaría el uso de liposomas fluorescentes y la técnica de centrifugación con Cloruro de Cesio. El planteamiento era el siguiente. Se utilizaría una suspensión de liposomas rellenos de la sonda fluorescente carboxifluoresceína, pero “contaminados” con una pequeña proporción de liposomas cargados con CICs. Por ejemplo, una solución madre de liposomas para preparar el LPP consistiría en una mezcla al 98 % de liposomas FT-MLV encapsulando carboxifluoresceína y un 2 % de liposomas FT-MLV encapsulando CICs. Al formarse el LPP, una cierta proporción de este estaría constituida por liposomas cargados con CICs, que aportaría suficiente densidad como para permitir sedimentar los LPP a baja fuerza de campo. Los liposomas que quedaran en el sobrenadante tras la centrifugación serían los liposomas libres que contienen carboxifluoresceína, por lo que podemos cuantificarlos mediante fluorescencia, tras liberar la carboxifluoresceína mediante tratamiento con Triton X-100.

Este experimento por fin rindió el resultado esperado, de hecho la curva experimental hallada resultó ser análoga a la propuesta teóricamente para los experimentos de apantallamiento (figura 53). Se realizó con una mezcla de liposomas FT-MLV cargados con carboxifluoresceína, “contaminados” al 2% con liposomas FT-MLV idénticos, pero que encapsulaban CICs 1M.

La curva describía un aumento acusado de fluorescencia inicial, hasta el punto en que se forma el LPP, en que la fluorescencia cae bruscamente, para seguir con una fase de meseta que se prolonga hasta que comienza a aparecer liposomas libres en exceso, lo que provoca un nuevo aumento de la fluorescencia de la carboxifluoresceína. Una curva similar fue obtenida con lipopoliplos de la misma composición, pero preparados con liposomas SUV (datos no mostrados). El punto en el que se forma el lipopoliplo, así como el momento en que aparece el exceso de liposomas, y el rango de concentraciones entre ambos puntos que define las distintas relaciones poliplo/ADN adecuadas para formar el LPP, quedan perfectamente definidos en la curva, que se constituye así en una técnica completa para la caracterización de complejos de asociación liposomas-poliplos.

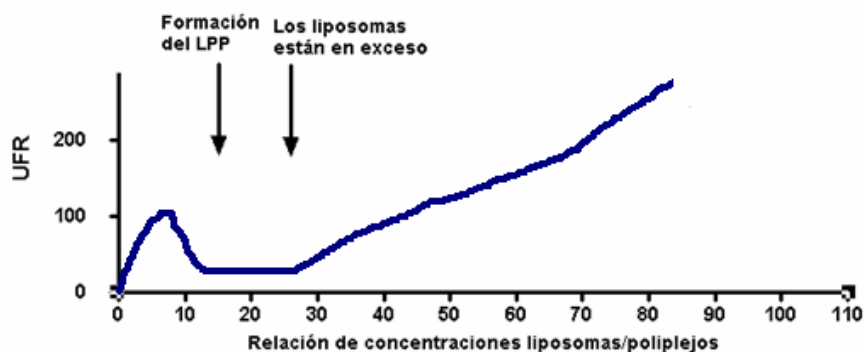


Figura 53. Interpretación de la gráfica experimental de las experiencias de centrifugación de LPP con liposomas cargados con carboxifluoresceína y con CICs. El LPP fue preparado con una cantidad constante de poliplojo y con diferentes cantidades

añadidas de una mezcla al 98% de liposomas con carboxifluoresceína y al 2% de liposomas con CICs. Los puntos experimentales representa distinta relación de concentración entre liposomas y poliplejos para formar el LPP (las unidades son arbitrarias). A partir de esta gráfica puede calcularse tanto el umbral mínimo necesario para la formación del LPP como el rango de concentraciones en que pueden formarse lipopoliplejos sin que aparezca un exceso de liposomas.

Las técnicas desarrolladas en el presente trabajo podrían igualmente utilizarse para caracterizar otros vectores similares al LPP, son técnicas generales de caracterización de complejos ternarios liposomas/ADN/polímero catiónico. Otros posibles sistemas preparados con otras moléculas serían en principio analizables, como los complejos ternarios generados con protamina u oligonucleótidos (en lugar de plásmidos y PEI), o incluso adaptarse al uso con otro tipo de vesículas lipídicas, como las procedentes de procesados o productos celulares (exosomas, vesículas tipo liposoma generadas por sonicación de membranas celulares, etc.).

El lipopoliplejo como vehículo de antígenos y ácidos nucleicos en vacunas antitumorales. El LPP es un dispositivo general de dispensación de moléculas y ácidos nucleicos, válido en principio para muchos usos posibles en biotecnología, pero sus características lo hacen especialmente apropiado *a priori* como vehículo para transporte de antígenos en ensayos de inmunización.

Para testar el LPP en ensayos de inmunización antitumoral, realizamos las siguientes experiencias de vacunación en modelo murino, cuyo objetivo era comprobar la capacidad del vector para despertar la respuesta inmune cuando se cargaba de antígenos inmunoestimulantes antitumorales, tanto de tipo hidrosoluble (transportados en el interior del liposoma) como liposoluble (incorporados en la membrana liposomal).

En el primer ensayo, utilizamos un antígeno lipídico que se encuentra sobreexpresado en células tumorales de melanoma, el gangliosido GD3. En este primer ensayo y, a partir del análisis de la respuesta humoral inducida, decidimos que la formulación más adecuada en este sistema para el LPP era con liposomas de tipo SUV.

En un segundo ensayo, utilizamos la formulación anterior para realizar una vacunación preventiva frente al tumor con 3 dosis de lipopoliplexo, inoculando los animales con células de melanoma murino modificadas genéticamente para expresar el antígeno GD3 humano. El siguiente ensayo aumentaba el número de dosis de vacuna a seis dosis, probando además dos dosis distintas de la citoquina GM-CSF, de 10 y 50 microgramos, en un intento de conseguir una vacunación eficaz.

Las vacunas celulares, como muestra el trabajo previo en nuestro laboratorio, acompañadas del gen que codifica una citoquina coadyuvante que actúa como inmunoestimulador, son una estrategia de vacunación antitumoral sumamente exitosa en ciertos tipos de cánceres, como el melanoma. Sin embargo, a pesar de su gran eficacia, tales vacunas celulares son difíciles de preparar a gran escala, costosas de producir, y no constituyen una aproximación realista a un tratamiento clínico desde que no es probable que tales vacunas lleguen alguna vez a ser una realidad en cuanto a la producción industrial por parte de la industria biotecnológica. Inmunizar a los pacientes con células vivas requiere de un tratamiento costoso y elaborado, debido a las inevitables manipulaciones especiales que necesitan las líneas de cultivos celulares mantenidas en laboratorio para proteger la integridad y viabilidad celular, y al requisito de personal especializado adiestrado en el manejo de células, que necesariamente debiera participar en cada inmunización individual a un paciente. A pesar de la excelencia demostrada en los modelos animales, desde un punto de vista industrial las vacunas celulares no parecen ser una opción fácil.

Sin embargo, no resulta en principio necesario que los antígenos de superficie de las células que se emplean para inmunizar, se suministren al sujeto experimental mediante las propias células. Un extracto purificado de las proteínas de membrana de células tumorales, acompañado de genes de citoquinas inmunoestimulantes, podría en teoría funcionar igualmente que las propias células-vacuna, siempre que fuesen vehiculados en forma adecuada a las células presentadoras de antígenos. En particular, debiera asegurarse que llegue a estas una carga de proteínas antigénicas similar a la que obtienen al fagocitar una célula-vacuna. Tales vacunas, basadas en antígenos celulares, podrían constituir una alternativa viable a las vacunas celulares, desde que su producción y almacenamiento son mucho más sencillas. Una suspensión en un vehículo adecuado, o un liofilizado en solución de hidróxido de aluminio, etc., constituirían una forma farmacéutica adecuada para estos preparados, que podrían ser conservados mediante simple refrigeración y administrados por personal sanitario no especializado como en cualquier vacuna "clásica". El uso del LPP como vehiculador de antígenos tumorales proteicos resulta pues una alternativa muy interesante al uso de células enteras para inmunización antitumoral. Por ello, para probar la capacidad del LPP para transportar antígenos hidrosolubles, realizamos un último ensayo de vacunación en modelo de melanoma murino mediante proteínas tumorales de membrana. Estas proteínas se encuentran solubilizadas como extracto acuoso, y se incorporan por tanto en el compartimento interno liposomal del lipopoliplojejo.

A lo largo de las siguientes experiencias, se analizaron datos de respuesta humoral, evolución del tamaño del tumor y supervivencia de los animales, según procediera, para evaluar la eficacia de la vacunación. Los resultados mostraron que, si bien se había logrado una respuesta humoral de cierta entidad, no fue suficiente para conducir a la eliminación del tumor, seguramente por no ir acompañada de una adecuada respuesta inmune celular.

Estudio de la respuesta inmunológica humoral inducida por el lipopoliplo en modelo murino con antígenos lipídicos (GD3). Una de las características propuestas para el nuevo vector, el LPP, era su capacidad de transporte de moléculas hidrofóbicas, útil en vacunas con antígenos lipídicos. Sin embargo, resultaba necesario demostrar que un antígeno lipídico incorporado en el lipopoliplo era efectivamente capaz de inducir una respuesta inmune suficientemente elevada, así como caracterizar el tipo de respuesta humoral obtenida (comprobar si la respuesta inmune era específica contra el antígeno usado; si se obtenía una respuesta predominantemente celular o humoral; si existía reactividad cruzada frente a otros antígenos; etc.). Por otra parte, el lipopoliplo se podía preparar con toda una variedad de formulaciones liposómicas, en cuanto a tipo de liposoma y composición particular. Había que decidir qué formulación era la más adecuada para el propósito de uso del lipopoliplo en experiencias de inmunización. Experiencias previas del laboratorio habían mostrado que las formulaciones liposómicas SM:CH:DP, SM:CH, PC:CH:DP y PC:CH eran particularmente efectivas en el uso de liposomas como vehículos de entrega de fármacos (Masso, O., S. F. Alino, et al. 1996). Para decidir una formulación adecuada del LPP, se ensayaron dos composiciones distintas de liposoma:

- liposomas aniónicos (SM:CH:DP), con una proporción del 10% de dicetilfosfato (DP) que proporciona carga eléctrica negativa al liposoma
- liposomas neutros (SM:CH), cuya carga eléctrica neta es nula.

Y de cada una de estas formulaciones, se preparó el vector con dos tipos distintos de liposomas, MLV y SUV. Como controles se utilizaron solamente liposomas de tipo MLV, ya que en un ensayo anterior de nuestro laboratorio se había comprobado que los liposomas de tipo SUV no generan respuesta inmunológica ninguna (probablemente por ser

demasiado pequeños para ser fagocitados por las células del sistema inmune) (Masso, O., S. F. Alino, et al. 1996).

Los gangliósidos, como el GD2, GD3, etc.; son glicosfingolípidos de ceramida de la superficie celular. Se encuentran en cantidades mínimas en la membrana de algunos tipos celulares normales, pero están sobreexpresados en tumores de origen neuroectodérmico, como el melanoma o neuroblastoma. En las células de melanoma, GD3 es el más abundante gangliósido de superficie de la membrana celular.

Como coadyuvante, se escogió la citoquina inmunoestimulante GM-CSF, en forma de gen codificado en la secuencia del plásmido pMOK constituyente del componente poliplejo.

El objetivo del ensayo era desarrollar una vacuna antígeno específica frente al melanoma que permitiera optimizar la respuesta antitumoral alcanzada con las vacunas clásicas. Para ello nos proponíamos preparar una vacuna basada en la entrega simultánea de un antígeno específico del melanoma (gangliósido GD3) y genes de citocinas tales como las que codifican para GM-CSF.

El ensayo consistía en la aplicación de tres dosis de vacuna, conteniendo cada dosis 50 μg de plásmido por ratón y 50 μg (0,3 μmoles) del gangliósido GD3 murino (incorporado como lípido constituyente del liposoma). Esta formulación se decidió en base a las experiencias de determinación de la relación óptima liposomas/poliplejos por electroforesis, en las que se obtuvo un valor de 0,3 micromoles de liposomas/50 μg de plásmido. La vacuna se aplicó por vía subcutánea en la pata trasera del animal, con un intervalo de 14 días entre dosis sucesivas, recogiendo muestras de plasma sanguíneo que fueron analizadas en cuanto en su contenido en inmunoglobulinas. Los resultados mostraron diferencias en cuanto a la capacidad para producir anticuerpos específicos por las diferentes formulaciones, siendo el lipopoliplejo

constituido con liposomas de tipo SUV de formulación SM:CH:DP:GD3 (4:4:1:1) capaz de generar la mayor respuesta inmunológica. La especificidad de la respuesta se comprobó mediante un ensayo de reactividad cruzada frente a otros antígenos, resultando que el subtipo de inmunoglobulinas IgG2a tenía un título elevado, sugiriendo la instauración de una memoria celular.

En resumen, el lipopoliploje de formulación SUV (SM:CH:DP:GD3):PEI/pMOK-GM-CSF mostraba una activación inmune humoral efectiva y específica contra el gangliósido GD3, tras las administración de 3 dosis de vacunación.

El ensayo anterior demostraba que el nuevo vector LPP, formulado a partir de liposomas de tipo SUV de composición SM:CH:DP y portando un 10% del gangliósido era capaz de inducir una respuesta antigénica aceptablemente elevada y específica contra el antígeno de melanoma GD3 de ratón. El paso siguiente hacia un sistema de vacunación antitumoral, con visos de aplicación en medicina humana, era comprobar si esta respuesta podría lograr el rechazo inmunológico del tumor con el antígeno humano. Para responder esta cuestión, se desarrolló otro modelo experimental, en el que se utilizó antígeno GD3 humano. La línea celular B2CF167H, generosamente donada por Merck Farma y Química SA, posibilitó el desarrollo de las experiencias con el antígeno humano. Esta línea celular había sido obtenida por selección clonal a partir de células de melanoma B16 modificadas para producir y sobreexpresar el gangliósido hGD3. Sin embargo los resultados mostraron que la inmunización no fue capaz de inhibir el desarrollo del tumor.

Vacunación utilizando extractos de proteínas de membrana de células tumorales (TMP). En los anteriores ensayos de inmunización se utilizó el LPP como vehículo de transporte de un antígeno lipídico, el GD3, que como tal se situaba en el “compartimento hidrofóbico” del lipopoliploje, la membrana liposomal. Sin embargo, en el presente se

trataba de aprovechar la capacidad de transporte de sustancias hidrosolubles del LPP en el otro compartimento, el núcleo liposomal, para utilizar proteínas tumorales hidrosolubles con capacidad inmunogénica desarrollando inmunidad antitumoral en los animales vacunados. Los antígenos utilizados para la vacuna se obtuvieron a partir de las propias células con las que se inducía posteriormente el tumor (células de la línea celular de melanoma B16). Para ello, utilizamos una modificación del protocolo de extracción descrito por Bordier (Bordier, C ,1981). En la vacunación se emplearon lipopoliplosos conteniendo el gen de la citoquina *m-GM-CSF* y extractos de TMP, preparados a dos dosis de plásmido y a dos dosis de antígenos TMP diferentes. Obteniéndose 4 tipos de combinaciones de lipopoliplosos en cuanto a su carga de proteínas (20 µg o 2 µg) y de ADN (50 µg o 10 µg).

La técnica de centrifugación de liposomas cargados con CICs permite determinar la relación de concentraciones liposoma/poliploso mínima necesaria para la formación del LPP. Pero en el momento de realizar este ensayo, no disponíamos de la técnica de centrifugación-espectrofotometría combinada, que permite la determinación del rango efectivo de relación de concentraciones para la formación del LPP. Por lo que utilizamos la relación umbral para preparar nuestros vectores, ya que superar el umbral hubiese implicado el riesgo de utilizar una cantidad demasiado grande de liposomas, por encima de la que el poliploso es capaz de unir, que aparecerían como liposomas libres cargados con la proteína y que actuarían como “contaminantes” de nuestra preparación (posiblemente inducirían una respuesta inmune “*per se*” en los animales, que no podríamos dissociar de la producida por el lipopoliploso). Las experiencias de electroforesis con lipopoliplosos preparados con liposomas de tipo SUV mostraban que, efectivamente, existía un límite en la cantidad de liposomas que una cantidad dada de poliploso puede unir (figura 33). Por lo tanto, la relación óptima mínima necesaria

para la formación del lipopoliplexo fue la utilizada en la vacunación.

Este ensayo planteó cuestiones muy interesantes en cuanto a la construcción de los lipopoliplexos. En particular, los lipopoliplexos preparados a 20 µg TMP y 10 µg de ADN no podían construirse con garantías, desde que la cantidad de liposomas necesaria para reunir esa dosis de proteínas presumiblemente era mucho mayor que la que la dosis de PP de solo 10 µg de ADN podía complejar. La solución obvia de aumentar la concentración del extracto de proteínas que se encapsulaba en los liposomas, para que fuesen necesarios en menor cantidad, tampoco era viable, desde que el extracto de TMP se encontraba ya a saturación, como se ha comentado anteriormente. Por otro lado, otros dos lipopoliplexos reunían la dosis de TMP requerida en menos liposomas de los necesarios para formar el LPP (lo que se solventó aportando liposomas vacíos para compensarlo). Es decir, de los cuatro lipopoliplexos previstos para la experiencia de inmunización, tres de ellos hubiesen "fallado" en caso de desconocer el dato del umbral mínimo de formación aportado por la técnica de centrifugación de liposomas de CICs.

Aspectos a desarrollar en un futuro estudio de los lipopoliplexos. Uno de los aspectos clave a considerar en futuros trabajos debiera ser, indudablemente, el conseguir establecer una población de tamaños de los LPP pequeña y homogénea. El tamaño de partícula es una característica esencial en cuanto a la posibilidad de fagocitosis por parte de las células con capacidad fagocítica del sistema inmune. Partículas demasiado grandes pueden no ser susceptibles de fagocitosis, mientras que partículas muy pequeñas también presentar dificultad para ser fagocitadas por una célula APC. El LPP, como agregado multiliposomal, presumiblemente puede rendir, en un proceso de preparación optimizado, un tamaño óptimo adecuado (seguramente del orden de 1-5 micras) como para que estos tipos celulares, evolutivamente adaptados a la fagocitosis de bacterias, puedan incorporarlo

con facilidad. Con lo que sería esperable una eficacia superior en cuanto a su uso en ensayos de inmunización, frente a otros sistemas más pequeños, como liposomas individuales o complejos de polímeros. Esta puede constituir una importante ventaja, desde que una limitación muy frecuente en inmunización, tanto en el campo de la medicina humana como en el de las vacunas animales, es la obtención de cantidades suficientes de antígenos para que sea viable un procedimiento de fabricación comercial. Los antígenos aislados y purificados, tanto para proteger de infecciones por agentes microbianos como en inmunidad tumoral, suelen ser costosos de producir. Un lipopoliplexo cargado con antígenos pudiera sin embargo conseguir una inmunización efectiva con una dosis total mucho menor que, por ejemplo, una vacuna liposomal, ya que la carga antigénica que suministra un único LPP a una célula fagocitaria es muy superior a la de un liposoma. Un macrófago debería fagocitar un número suficientemente elevado de liposomas para incorporar una carga antigénica que, sin embargo, el LPP podría aportar en tan solo una única partícula fagocitada.

Adicionalmente, estudios de la toxicidad celular de los lipopoliplexos, de la estabilidad de las suspensiones de lipopoliplexos en el tiempo y su posible pérdida de efectividad, el desarrollo de métodos de conservación farmacogalénicos adecuados, y el probar su efectividad en otros campos de la biomedicina, como las vacunas contra microorganismos y parásitos, junto con la utilización de otros coadyuvantes y genes inmunoestimulantes, son aspectos de interés para un futuro desarrollo de estos vectores.

Por otro lado, las técnicas desarrolladas en el presente trabajo abren un campo nuevo en cuanto al estudio de vectores ternarios de asociación ADN/polímero/liposomas. Existen una gran variedad de posibilidades en cuanto a futuros desarrollos de este tipo de complejos: el uso de polímeros catiónicos alternativos (poliamina, protamina, etc.) u otros tipos de asociaciones entre los componentes (plásmido asociado simultáneamente a liposomas y polímero); el

encapsulamiento de sustancias en el interior de los liposomas que pudieran favorecer la liberación del plásmido una vez fagocitado el complejo, la utilización de otro tipo de vesículas lipídicas con capacidad antigénica en lugar de liposomas (como los exosomas, o las vesículas obtenidas por sonicación o tratamiento con detergentes de membranas celulares de células tumorales, etc.) son algunas de las posibilidades abiertas para un futuro desarrollo del campo.

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

La presente tesis doctoral describe el desarrollo de un nuevo vector de transferencia génica, el lipopoliplejo (LPP), y la compactación monomolecular del ADN.

1. Se ha conseguido la compactación monomolecular del ADN con los vectores RCC10 y HCC10, de diseño propio. En este sentido se ha conseguido:

- un método nuevo que permite la formación de los complejos monomoleculares con agentes de cola hidrofóbica corta como el RCC10
- se han desarrollado procedimientos propios que han permitido la caracterización de los complejos con el agente HCC10

2. Se ha diseñado un nuevo vector, el LPP, para el transporte simultáneo de antígenos y genes. En concreto:

- Se han desarrollado técnicas propias para caracterizar la asociación de complejos liposomas/policación/ADN, y su adaptación en ensayos de inmunización
- Se describe por primera vez, según nuestro conocimiento, un método de caracterización de liposomas por electroforesis

3. El lipopoliplejo consigue inducir, en los modelos de vacunación antitumoral probados, una respuesta inmunológica significativa caracterizada por:

- una respuesta humoral específica y selectiva frente a antígenos lipídicos (GD3) y proteicos (TMP)
- una insuficiente respuesta inmune celular antitumoral, según se deduce de su incapacidad para limitar el

desarrollo del tumor; sin embargo las respuestas humorales obtenidas pudieran ser de utilidad en otros campos de la biomedicina, tales como la inmunización frente a virus y a agentes microbianos

- una instauración de memoria celular, según se desprende del *switch* de inmunoglobulinas (IgG2a)

BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografía

Abdallah, B., A. Hassan, et al. (1996). "A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine.PG - 1947-54." Hum Gene Ther 7(16).

Akita H, Kudo A, et al. (2009). "Multi-layered nanoparticles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process" Biomaterials. May;30(15):2940-9. Epub 2009 Mar 4.

Alino, S. F. (1997). "Long-term expression of the human alpha-1-antitrypsin gene in mice employing anionic and cationic liposome vector." Biochem Pharmacol 54(1): 9-13.

Alino, S. F., A. Crespo, et al. (2003). "Long-term therapeutic levels of human alpha-1 antitrypsin in plasma after hydrodynamic injection of nonviral DNA." Gene Ther 10(19): 1672-9.

Alino, S. F., M. Bobadilla, et al. (1993). "In vivo delivery of human alpha 1-antitrypsin gene to mouse hepatocytes by liposomes." Biochem Biophys Res Commun 192(1): 174-81.

Alino, S., J. Crespo, et al. (1999). "Oligonucleotide-entrapped immunoliposome delivered by mini-osmotic pump improves the survival of SCID mice bearing human leukemia ." Tumor Targeting 4: 1-9.

Almarza E. et al. Characteristics of lentiviral vectors harboring the proximal promoter of the vav proto-oncogen: a weak and efficient promoter for gene therapy. Mol. Ther., 2007 15:1487-94.

Al-Moslih, M. I. and G. R. Dubes (1973). "The kinetics of DEAE-dextran-induced cell sensitization to transfection." J Gen Virol 18(2): 189-93.

Aoki, K., S. Furuhashi, et al. (2001). "Polyethylenimine-mediated gene transfer into pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity.PG - 508-14." Gene Ther 8(7).

Arango, M. A., N. Duzgunes, et al. (2003). "Increased receptor-mediated gene delivery to the liver by protamine-enhanced-asialofetuin-lipoplexes." Gene Ther 10(1): 5-14.

- Athanasopoulos, T., S. Fabb, et al. (2000). "Gene therapy vectors based on adeno-associated virus: characteristics and applications to acquired and inherited diseases (review)." Int J Mol Med 6(4): 363-75.
- Audouy, S. and D. Hoekstra (2001). "Cationic lipid-mediated transfection in vitro and in vivo (review)." Mol Membr Biol 18(2): 129-43.
- Baum C. Insertional mutagenesis in gene therapy and stem cell biology. Curr. Opin. Hematol., 2007 14:337-42
- Behr, J. P. (1986) Tetrahedron Lett. 27, 5861–5864.
- Behr, J. P. (1996). "[Gene transfer with amino lipids and amino polymers]." C R Seances Soc Biol Fil 190(1): 33-8.
- Bettinger, T., J. S. Remy, et al. (1999). "Size reduction of galactosylated PEI/DNA complexes improves lectin-mediated gene transfer into hepatocytes.PG - 558-61." Bioconjug Chem 10(4).
- Bieber, T. and H. P. Elsasser (2001). "Preparation of a low molecular weight polyethylenimine for efficient cell transfection." Biotechniques 30(1): 74-7, 80-1.
- Bieber, T., W. Meissner, et al. (2002). "Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes.PG - 441." J Control Release 82(2-3).
- Blessing, T., J. S. Remy, et al. (1998). "Monomolecular collapse of plasmid DNA into stable virus-like particles." Proceedings- National Academy of Sciences USA 95(4): 1427-1431.
- Boletta, A., A. Benigni, et al. (1997). "Nonviral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine." Hum Gene Ther 8(10): 1243-51.
- Botella-Estrada , R., F. Dasi , D. Ramos , et al. 2005. Cytokine expression and dendritic cell density in melanoma sentinel nodes. Melanoma Res.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, et al. (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." Proc Natl Acad Sci U S A 92(16): 7297-301.
- Boussif, O., M. A. Zanta, et al. (1996). "Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold." Gene Ther 3(12): 1074-80.

- Boussif, O., T. Delair, et al. (1999). "Synthesis of polyallylamine derivatives and their use as gene transfer vectors in vitro." Bioconjug Chem 10(5): 877-83.
- Branden, L. J., A. J. Mohamed, et al. (1999). "A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA." Nat Biotechnol 17(8): 784-7.
- Brito, L., S. Little, et al. (2008). "Poly(beta-amino ester) and cationic phospholipid-based lipopolyplexes for gene delivery and transfection in human aortic endothelial and smooth muscle cells." Biomacromolecules 9(4): 1179-87.
- Brito, L., S. Little, et al. (2008). "Poly(beta-amino ester) and cationic phospholipid-based lipopolyplexes for gene delivery and transfection in human aortic endothelial and smooth muscle cells." Biomacromolecules 9(4): 1179-87.
- Brito, R. M. and W. L. Vaz (1986). Anal Biochem 152(2): 250-5.
- Brostoff, Male, Roitt. *Inmunología*. Capítulo 20: Inmunología tumoral. 4^a ed, 1997, Harcourt Brace
- Brunner, S., T. Sauer, et al. (2000). "Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus." Gene Ther 7(5): 401-7.
- Bunnell, B. A. and R. A. Morgan (1998). "Gene therapy for infectious diseases." Clin Microbiol Rev 11(1): 42-56.
- Burton, E. A., J. B. Wechuck, et al. (2001). "Multiple applications for replication-defective herpes simplex virus vectors." Stem Cells 19(5): 358-77.
- Caplen, N. J., J. N. Higginbotham, et al. (1999). "Adeno-retroviral chimeric viruses as in vivo transducing agents." Gene Ther 6(3): 454-9.
- Cattoglio C. et al. Hotspots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood*, 2007 110:1704
- Cavazzana-Calvo M. et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 2000 288:669-72
- Chen, J., S. Gamou, et al. (1994). "A novel gene delivery system using EGF receptor-mediated endocytosis." FEBS Lett 338(2): 167-9.

- Cherng, J. Y., P. van de Wetering, et al. (1996). "Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles." Pharm Res 13(7): 1038-42.
- Chollet, P., M. C. Favrot, et al. (2002). "Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes." J Gene Med 4(1): 84-91.
- Chong H, Todryk S et al. 1998. Tumor cell expression of B7 costimulatory molecules and interleukin-12 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces a local antitumor response and may generate systemic protective immunity. Gene Therapy, 5: 223-232.
- Chowdhury, N. R., C. H. Wu, et al. (1993). "Fate of DNA targeted to the liver by asialoglycoprotein receptor-mediated endocytosis in vivo. Prolonged persistence in cytoplasmic vesicles after partial hepatectomy. PG - 11265-71." J Biol Chem 268(15).
- Coll, J. L., P. Chollet, et al. (1999). "In vivo delivery to tumors of DNA complexed with linear polyethylenimine." Hum Gene Ther 10(10): 1659-66.
- Compagnon, Moradpour D, et al. (1997). "Enhanced gene delivery and expression in human hepatocellular carcinoma cells by cationic immunoliposomes." J Liposome Res 7: 127-141.
- Cotten, M., E. Wagner, et al. (1993). "Receptor-mediated transport of DNA into eukaryotic cells." Methods Enzymol 217: 618-44.
- Cotten, M., F. Langle-Rouault, et al. (1990). "Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels." Proc Natl Acad Sci U S A 87(11): 4033-7.
- Cristiano, R. J. and J. A. Roth (1996). "Epidermal growth factor mediated DNA delivery into lung cancer cells via the epidermal growth factor receptor. PG - 4-10." Cancer Gene Ther 3(1).
- Crook, K., B. J. Stevenson, et al. (1998). "Inclusion of cholesterol in DOTAP transfection complexes increases the delivery of DNA to cells in vitro in the presence of serum." Gene Ther 5(1): 137-43.

Curiel, D. T., S. Agarwal, et al. (1991). "Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery." Proc Natl Acad Sci U S A 88(19): 8850-4.

Da Cruz, M. T., S. Simoes, et al. (2001). "Kinetic analysis of the initial steps involved in lipoplex--cell interactions: effect of various factors that influence transfection activity." Biochim Biophys Acta 1510(1-2): 136-51.

Das, P. K., G. J. Murray, et al. (1985). "Lectin-specific targeting of beta-glucocerebrosidase to different liver cells via glycosylated liposomes." Biochem Med 33(1): 124-31.

Dash, P. R., M. L. Read, et al. (1999). "Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery." Gene Ther 6(4): 643-50.

Dauty, E., J. P. Behr, et al. (2002). "Development of plasmid and oligonucleotide nanometric particles." Gene Ther 9(11): 743-8.

Dauty, E., J. S. Remy, et al. (2001). "Dimerizable cationic detergents with a low cmc condense plasmid DNA into nanometric particles and transfect cells in culture." Journal of the American Chemical Society 123(38): 9227-9234.

Dauty, E., J. S. Remy, et al. (2001). "Dimerizable cationic detergents with a low cmc condense plasmid DNA into nanometric particles and transfect cells in culture." Journal of the American Chemical Society 123(38): 9227-9234.

Dauty, E., J.-P. Behr, et al. (2002). "Development of plasmid and oligonucleotide nanometric particles." Gene Therapy 9(11): 743-748.

De Smedt, S. C., J. Demeester, et al. (2000). "Cationic polymer based gene delivery systems." Pharm Res 17(2): 113-26.

Delogu, G., A. Howard, et al. (2000). "DNA vaccination against tuberculosis: expression of a ubiquitin-conjugated tuberculosis protein enhances antimycobacterial immunity." Infect Immun 68(6): 3097-102.

Demeneix, B., J. Behr, et al. (1998). "Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines." Adv Drug Deliv Rev 30(1-3): 85-95.

- Densmore, C. L., E. S. Kleinerman, et al. (2001). "Growth suppression of established human osteosarcoma lung metastases in mice by aerosol gene therapy with PEI-p53 complexes." Cancer Gene Ther 8(9): 619-27.
- Dheur, S., N. Dias, et al. (1999). "Polyethylenimine but not cationic lipid improves antisense activity of 3'-capped phosphodiester oligonucleotides.PG - 515-25." Antisense Nucleic Acid Drug Dev 9(6).
- Dokka, S., D. Toledo, et al. (2000). "High-efficiency gene transfection of macrophages by lipoplexes." International Journal of Pharmaceutics 206(1-2): 97-104.
- Dolivet, G., J. L. Merlin, et al. (2002). "In vivo growth inhibitory effect of iterative wild-type p53 gene transfer in human head and neck carcinoma xenografts using glucosylated polyethylenimine nonviral vector." Cancer Gene Ther 9(8): 708-14.
- Dranoff G. (2002) "GM-CSF-based cancer vaccines." Immunol Rev. 2002 Oct;188:147-54.
- Duguid, J. G., C. Li, et al. (1998). "A physicochemical approach for predicting the effectiveness of peptide-based gene delivery systems for use in plasmid-based gene therapy." Biophys J 74(6): 2802-14.
- Dunlap, D. D., A. Maggi, et al. (1997). "Nanoscope structure of DNA condensed for gene delivery." Nucleic Acids Res 25(15): 3095-101.
- Eastman, S. J. and R. K. Scheule (1999). "Cationic lipid:pDNA complexes for the treatment of cystic fibrosis." Curr Opin Mol Ther 1(2): 186-96.
- Elkon, K. B., C. C. Liu, et al. (1997). "Tumor necrosis factor alpha plays a central role in immune-mediated clearance of adenoviral vectors." Proc Natl Acad Sci U S A 94(18): 9814-9.
- Erbacher P, Bettinger T, Brion E, Coll JL, Plank C, Behr JP, Remy JS. Genuine DNA/polyethylenimine (PEI) complexes improve transfection properties and cell survival. J Drug Target. 2004 May;12(4):223-36.
- Erbacher, P., A. C. Roche, et al. (1996). "Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes.PG - 186-94." Exp Cell Res 225(1).

Erbacher, P., J. S. Remy, et al. (1999). "Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway." Gene Ther 6(1): 138-45.

Erbacher, P., S. Zou, et al. (1998). "Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability." Pharm Res 15(9): 1332-9.

Erbacher, P., T. Bettinger, et al. (1999). "Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI).PG - 210-22." J Gene Med 1(3).

Fabio, K., C. Di Giorgio, et al. (2005). "New perfluorinated polycationic dimerizable detergents for the formulation of monomolecular DNA nanoparticles and their in vitro transfection efficiency." Biochim Biophys Acta 1724(1-2): 203-14.

Farhood, H., N. Serbina, et al. (1995). "The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer." Biochim Biophys Acta 1235(2): 289-95.

Felgner, P. L., T. R. Gadek, et al. (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A 84(21): 7413-7.

Felgner, P. L., Y. Barenholz, et al. (1997). "Nomenclature for synthetic gene delivery systems." Hum Gene Ther 8(5): 511-2.

Ferkol, T., J. C. Perales, et al. (1995). "Gene transfer into the airway epithelium of animals by targeting the polymeric immunoglobulin receptor.PG - 493-502." J Clin Invest 95(2).

Ferrari, S., A. Pettenazzo, et al. (1999). "Polyethylenimine shows properties of interest for cystic fibrosis gene therapy.PG - 219-25." Biochim Biophys Acta 1447(2-3).

Ferrari, S., E. Moro, et al. (1997). "ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo." Gene Ther 4(10): 1100-6.

Finsinger, D., J. S. Remy, et al. (2000). "Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery.PG - 1183-92." Gene Ther 7(14).

Fischer, D., T. Bieber, et al. (1999). "A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity." Pharm Res 16(8): 1273-9.

Forestell, S. P., J. S. Dando, et al. (1996). "Improved detection of replication-competent retrovirus." J Virol Methods 60(2): 171-8.

Forrest, M. L. and D. W. Pack (2002). "On the kinetics of polyplex endocytic trafficking: implications for gene delivery vector design." PG - 57-66." Mol Ther 6(1).

Frederiksen, K. S., N. Abrahamsen, et al. (2000). "Gene delivery by an epidermal growth factor/DNA polyplex to small cell lung cancer cell lines expressing low levels of epidermal growth factor receptor." PG - 262-8." Cancer Gene Ther 7(2).

Fritz, J. D., H. Herweijer, et al. (1996). "Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA." Hum Gene Ther 7(12): 1395-404.

G T Gillies et al (2002). "Positive pressure infusion of fluorescent nanoparticles as a probe of the structure of brain phantom gelatins." Nanotechnology, 13: 484-486

Gaedtke, L., J. Pelisek, et al. (2007). "Transcriptionally targeted nonviral gene transfer using a beta-catenin/TCF-dependent promoter in a series of different human low passage colon cancer cells." Mol Pharm 4(1): 129-39.

Gao, X. and L. Huang (1995). "Cationic liposome-mediated gene transfer." Gene Ther 2(10): 710-22.

Garcia, L., M. Bunuales, et al. (2007). "Serum-resistant lipopolyplexes for gene delivery to liver tumour cells." Eur J Pharm Biopharm 67(1): 58-66.

Garnett, M. C. (1999). "Gene-delivery systems using cationic polymers." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 16(2): 147-207.

Gary S. Stein, Janet L. Stein, Lewis J. Kleinsmith 1977 "Chromatin and chromosomal protein research" vol. 2 Academic Press.

- Gautam, A., C. L. Densmore, et al. (2002). "Aerosol delivery of PEI-p53 complexes inhibits B16-F10 lung metastases through regulation of angiogenesis." Cancer Gene Ther 9(1): 28-36.
- Gebhart, C. L. and A. V. Kabanov (2001). "Evaluation of polyplexes as gene transfer agents." J Control Release 73(2-3): 401-16.
- Ginsberg, H. S. (1996). "The ups and downs of adenovirus vectors." Bull N Y Acad Med 73(1): 53-8.
- Godbey, W. T. and A. G. Mikos (2001). "Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes." J Control Release 72(1-3): 115-25.
- Godbey, W. T., K. K. Wu, et al. (1999). "Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency." Gene Ther 6(8): 1380-8.
- Godbey, W. T., K. K. Wu, et al. (1999). "Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery." J Control Release 60(2-3): 149-60.
- Godbey, W. T., K. K. Wu, et al. (1999). "Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle." J Biomed Mater Res 45(3): 268-75.
- Godbey, W. T., K. K. Wu, et al. (1999). "Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery." Proc Natl Acad Sci U S A 96(9): 5177-81.
- Godbey, W. T., M. A. Barry, et al. (2000). "Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery." J Biomed Mater Res 51(3): 321-8.
- Goldman, C. K., L. Soroceanu, et al. (1997). "In vitro and in vivo gene delivery mediated by a synthetic polycationic amino polymer." Nat Biotechnol 15(5): 462-6.
- Gottschalk, S., J. T. Sparrow, et al. (1996). "A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells." Gene Ther 3(5): 48-57.
- Goula, D., C. Benoist, et al. (1998). "Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung." Gene Ther 5(9): 1291-5.

Goula, D., J. S. Remy, et al. (1998). "Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system." Gene Ther 5(5): 712-7.

Goula, D., J. S. Remy, et al. (1998). "Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system." Gene Ther 5(5): 712-7.

Guo, W. and R. J. Lee (2001). "Efficient gene delivery via non-covalent complexes of folic acid and polyethylenimine." J Control Release 77(1-2): 131-8.

Hacein-Bey-Abina S. et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked sever combined immunodeficiency. New England Journal of Medicine, 2003 Jan 16; 348:2

Haensler, J. and F. C. Szoka, Jr. (1993). "Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture." Bioconjug Chem 4(5): 372-9.

Hart, S. L., C. V. Arancibia-Carcamo, et al. (1998). "Lipid-mediated enhancement of transfection by a nonviral integrin-targeting vector." Hum Gene Ther 9(4): 575-85.

Hashida, M., S. Takemura, et al. (1998). "Targeted delivery of plasmid DNA complexed with galactosylated poly(L-lysine).PG - 301-10." J Control Release 53(1-3).

Heister, T., I. Heid, et al. (2002). "Herpes simplex virus type 1/adeno-associated virus hybrid vectors mediate site-specific integration at the adeno-associated virus preintegration site, AAVS1, on human chromosome 19." J Virol 76(14): 7163-73.

Heller, R., M. Jaroszeski, et al. (1996). "In vivo gene electroinjection and expression in rat liver." FEBS Lett 389(3): 225-8.

Herrero MJ, Botella R et al. (2006) "Antigens and cytokine genes in antitumor vaccines: the importance of the temporal delivery sequence in antitumor signals" Ann N Y Acad Sci. 2006 Dec;1091:412-24.

Hill, I. R., M. C. Garnett, et al. (2001). "Determination of protection from serum nuclease activity by DNA-polyelectrolyte complexes using an electrophoretic method." Anal Biochem 291(1): 62-8.

Hwang, S. H., K. Hayashi, et al. (2001). "Liver-targeted gene transfer into a human hepatoblastoma cell line and in vivo by sterylglucoside-containing cationic liposomes." Gene Ther 8(16): 1276-80.

Hyde, S. C., K. W. Southern, et al. (2000). "Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." Gene Ther 7(13): 1156-65.

Iwai, M., Y. Harada, et al. (2002). "Polyethylenimine-mediated suicide gene transfer induces a therapeutic effect for hepatocellular carcinoma in vivo by using an Epstein-Barr virus-based plasmid vector." Biochem Biophys Res Commun 291(1): 48-54.

Jeong, J. H., S. H. Song, et al. (2001). "DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline)." J Control Release 73(2-3): 391-9.

Jia, S. F., L. L. Worth, et al. (2002). "Eradication of osteosarcoma lung metastases following intranasal interleukin-12 gene therapy using a nonviral polyethylenimine vector." Cancer Gene Ther 9(3): 260-6.

Kabanov, A. V. and V. A. Kabanov (1995). "DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells." Bioconjug Chem 6(1): 7-20.

Kabanov, A. V., I. V. Astafieva, et al. (1993). "Efficient transformation of mammalian cells using DNA interpolyelectrolyte complexes with carbon chain polycations." Bioconjug Chem 4(6): 448-54.

Kabanov, A., Szoka FC, Seymour LW (1998). Interpolielectrolyte complexes for gene delivery :polymer aspects of transfection activity. Self-assembling Complexes for Gene Delivery. From Laboratory to Clinical Trial. F. P. Kabanov AV, Seymour LW. Chichester, John Wiley & Sons: 197-218.

Kawakami, S., A. Sato, et al. (2000). "Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes." Gene Ther 7(4): 292-9.

Kawakami, S., F. Yamashita, et al. (1998). "Asialoglycoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated cationic liposomes." Biochem Biophys Res Commun 252(1): 78-83.

Kawakami, S., S. Fumoto, et al. (2000). "In vivo gene delivery to the liver using novel galactosylated cationic liposomes." Pharm Res 17(3): 306-13.

Khalil, I. A., K. Kogure, et al. (2007). "Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nanoparticles for gene delivery." Gene Ther 14(8): 682-9.

Khuri, F. R., J. Nemunaitis, et al. (2000). "a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer." Nat Med 6(8): 879-85.

Kim k-Y, Kang M-A, Nam M-J. 2001. Enhancement of natural killer cell-mediated cytotoxicity by coexpression of GM-CSF/B70 in hepatoma. Cancer Letters, 166: 33-40.

Kim, S. H., S. Kim, et al. (2000). "Retroviral vectors." Adv Virus Res 55: 545-63.

Kirchheis, R. and E. Wagner (2000). "Polycation/DNA complexes for in vivo gene delivery." Gene Ther Regul 11: 95-114.

Kirchheis, R., A. Kichler, et al. (1997). "Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery." Gene Ther 4(5): 409-18.

Kirchheis, R., L. Wightman, et al. (2001). "Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines." Adv Drug Deliv Rev 53(3): 341-58.

Kirchheis, R., L. Wightman, et al. (2001). "Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application." Gene Ther 8(1): 28-40.

Kirchheis, R., S. Schuller, et al. (1999). "Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo." J Gene Med 1(2): 111-20.

Kirchheis, R., T. Blessing, et al. (2001). "Tumor targeting with surface-shielded ligand--polycation DNA complexes." J Control Release 72(1-3): 165-70.

Kjellen, L. and U. Lindahl (1991). "Proteoglycans: structures and interactions." Annu Rev Biochem 60: 443-75.

Klemm, A. R., D. Young, et al. (1998). "Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability." Biochem Pharmacol 56(1): 41-6.

Kohn, D. B., P. W. Kantoff, et al. (1987). "Retroviral-mediated gene transfer into mammalian cells." Blood Cells 13(1-2): 285-98.

Koltover, I., T. Salditt, et al. (1998). "An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery." Science 281(5373): 78-81.

Koping-Hoggard, M., I. Tubulekas, et al. (2001). "Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo." Gene Ther 8(14): 1108-21.

Kostarelos, K. and A. D. Miller (2005). "Synthetic, self-assembly ABCD nanoparticles; a structural paradigm for viable synthetic non-viral vectors." Chem Soc Rev 34(11): 970-94.

Kouraklis, G. (1999). "Progress in cancer gene therapy." Acta Oncol 38(6): 675-83.

Kukowska-Latallo, J. F., A. U. Bielinska, et al. (1996). "Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers." Proc Natl Acad Sci U S A 93(10): 4897-902.

Kurosaki, T., R. Kishikawa, et al. (2009). "Pulmonary gene delivery of hybrid vector, lipopolyplex containing N-lauroylsarcosine, via the systemic route." J Control Release.

Kustikova OS. et al. Retroviral vectors insertion sites associated with dominant hematopoietic clones mark "stemness" pathways. Blood, 2007 109:1897-907

Kwoh, D. Y., C. C. Coffin, et al. (1999). "Stabilization of poly-L-lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver." Biochim Biophys Acta 1444(2): 171-90.

Labat-Moleur, F., A. M. Steffan, et al. (1996). "An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines." Gene Ther 3(11): 1010-7.

Lecocq, M., S. Wattiaux-De Coninck, et al. (2000). "Uptake and intracellular fate of polyethylenimine in vivo." Biochem Biophys Res Commun 278(2): 414-8.

- Ledeen RW, Yu RK. (1982) "Gangliosides: structure, isolation, and analysis". *Methods Enzymol.* 1982;83:139-91.
- Lee, H., J. H. Jeong, et al. (2002). "PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity." *J Control Release* 79(1-3): 283-91.
- Lee, R. J. and L. Huang (1996). "Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer." *J Biol Chem* 271(14): 8481-7.
- Lee, R. J. and L. Huang (1997). "Lipidic vector systems for gene transfer." *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 14(2): 173-206.
- Legendre, J. Y., A. Trzeciak, et al. (1997). "Dioleoylmelittin as a novel serum-insensitive reagent for efficient transfection of mammalian cells." *Bioconjug Chem* 8(1): 57-63.
- Lemkine, G. F. and B. A. Demeneix (2001). "Polyethylenimines for in vivo gene delivery." *Curr Opin Mol Ther* 3(2): 178-82.
- Lemkine, G. F., D. Goula, et al. (1999). "Optimisation of polyethylenimine-based gene delivery to mouse brain." *J Drug Target* 7(4): 305-12.
- Lemkine, G. F., S. Mantero, et al. (2002). "Preferential transfection of adult mouse neural stem cells and their immediate progeny in vivo with polyethylenimine." *Mol Cell Neurosci* 19(2): 165-74.
- Li Z. et al. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science*, 2002 296:497
- Li, S., W. C. Tseng, et al. (1999). "Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection." *Gene Ther* 6(4): 585-94.
- Li, S., Y. Tan, et al. (2000). "Targeted gene delivery to pulmonary endothelium by anti-PECAM antibody." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(3): L504-11.
- Lim, D. W., Y. I. Yeom, et al. (2000). "Poly(DMAEMA-NVP)-b-PEG-galactose as gene delivery vector for hepatocytes." *Bioconjug Chem* 11(5): 688-95.

- Liu, F., Y. Song, et al. (1999). "Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA." Gene Ther 6(7): 1258-66.
- Lleres, D., E. Dauty, et al. (2001). "DNA condensation by an oxidizable cationic detergent. Interactions with lipid vesicles." Chemistry and Physics of Lipids 111(1): 59 - 71.
- Lu, D., R. Benjamin, et al. (1994). "Optimization of methods to achieve mRNA-mediated transfection of tumor cells in vitro and in vivo employing cationic liposome vectors." Cancer Gene Ther 1(4): 245-52.
- Luby-Phelps, K., P. E. Castle, et al. (1987). "Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells.PG - 4910-3." Proc Natl Acad Sci U S A 84(14).
- Ma, D. D. and A. Q. Wei (1996). "Enhanced delivery of synthetic oligonucleotides to human leukaemic cells by liposomes and immunoliposomes." Leuk Res 20(11-12): 925-30.
- Marcusson, E. G., B. Bhat, et al. (1998). "Phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides dissociate from cationic lipids before entering the nucleus.PG - 2016-23." Nucleic Acids Res 26(8).
- Marschall, P., N. Malik, et al. (1999). "Transfer of YACs up to 2.3 Mb intact into human cells with polyethylenimine." Gene Ther 6(9): 1634-7.
- Masso, O., S. F. Alino, et al. (1996). J Pharmacol Exp Ther 278(3): 1114-20.
- Masso, O., S. F. Alino, et al. (1996). "Specific serological response by active immunization with GD3-bearing liposomes." J Pharmacol Exp Ther 278(3): 1114-20.
- Mastrobattista, E., R. H. Kapel, et al. (2001). "Lipid-coated polyplexes for targeted gene delivery to ovarian carcinoma cells.PG - 405-13." Cancer Gene Ther 8(6).
- Matsumoto, M., R. Kishikawa, et al. (2008). "Hybrid vector including polyethylenimine and cationic lipid, DOTMA, for gene delivery." Int J Pharm 363(1-2): 58-65.
- Matsuura, M., Y. Yamazaki, et al. (2003). "Polycation liposome-mediated gene transfer in vivo." Biochim Biophys Acta 1612(2): 136-43.

- Merwin, J. R., G. S. Noell, et al. (1994). "Targeted delivery of DNA using YEE(GalNAcAH)₃, a synthetic glycopeptide ligand for the asialoglycoprotein receptor." Bioconjug Chem 5(6).
- Meyer, B., L. Uyech, et al. (1997). Manipulating the intracellular trafficking of nucleic acids. Gene Therapy for diseases of the Lung. Bringham. New York, Marcel Dekker: 135-180.
- Milman, G. and M. Herzberg (1981). "Efficient DNA transfection and rapid assay for thymidine kinase activity and viral antigenic determinants." Somatic Cell Genet 7(2): 161-70.
- Mir, L. M. (2001). "Therapeutic perspectives of in vivo cell electropermeabilization." Bioelectrochemistry 53(1): 1-10.
- Mislick, K. A. and J. D. Baldeschwieler (1996). "Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer." Proc Natl Acad Sci U S A 93(22): 12349-54.
- Mislick, K. A., J. D. Baldeschwieler, et al. (1995). "Transfection of folate-polylysine DNA complexes: evidence for lysosomal delivery." PG - 512-5." Bioconjug Chem 6(5).
- Mistry, A. R., L. Falciola, et al. (1997). "Recombinant HMG1 protein produced in *Pichia pastoris*: a nonviral gene delivery agent." Biotechniques 22(4): 718-29.
- Moret, I., J. Esteban Peris, et al. (2001). J Control Release 76(1-2): 169-81.
- Mukherjee S, Nelson D, et al. 2001. The immune anti-tumor effects of GM-CSF and B7-1 gene transfection are enhanced by surgical debulking of tumor. Cancer Gene Therapy, 8: 580-588.
- Murray, K. D., C. J. Etheridge, et al. (2001). "Enhanced cationic liposome-mediated transfection using the DNA-binding peptide mu (mu) from the adenovirus core." Gene Ther 8(6): 453-60.
- Mustapa, M. F., P. C. Bell, et al. (2007). "Biophysical characterization of an integrin-targeted lipopolyplex gene delivery vector." Biochemistry 46(45): 12930-44.

Mustapa, M. F., S. M. Grosse, et al. (2009). "Stabilized Integrin-Targeting Ternary LPD (Lipopolyplex) Vectors for Gene Delivery Designed To Disassemble Within the Target Cell." Bioconjug Chem 20(3): 518-532.

Nasz, I. and E. Adam (2001). "Recombinant adenovirus vectors for gene therapy and clinical trials." Acta Microbiol Immunol Hung 48(3-4): 323-48.

Navarro, J., N. Oudrhiri, et al. (1998). "Gene delivery systems: Bridging the gap between recombinant viruses and artificial vectors." Adv Drug Deliv Rev 30(1-3): 5-11.

Nelson, N. (1991). "Structure and pharmacology of the proton-ATPases." Trends Pharmacol Sci 12(2): 71-5.

Newmeyer, D. D. (1993). "The nuclear pore complex and nucleocytoplasmic transport." Curr Opin Cell Biol 5(3): 395-407.

Nicolau, C., A. Le Pape, et al. (1983). "In vivo expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I." Proc Natl Acad Sci U S A 80(4): 1068-72.

Nigg, E. A. (1997). "Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation." Nature 386(6627): 779-87.

Nishikawa, M. and L. Huang (2001). "Nonviral vectors in the new millennium: Delivery barriers in gene transfer." Human Gene Therapy 12(8): 861-870.

Nishikawa, M. and L. Huang (2001). "Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer." Hum Gene Ther 12(8): 861-70.

Nishikawa, M., S. Takemura, et al. (1998). "Targeted delivery of plasmid DNA to hepatocytes in vivo: optimization of the pharmacokinetics of plasmid DNA/galactosylated poly(L-lysine) complexes by controlling their physicochemical properties.PG - 408-15." J Pharmacol Exp Ther 287(1).

Nishikawa, M., S. Takemura, et al. (2000). "Pharmacokinetics and in vivo gene transfer of plasmid DNA complexed with mannosylated poly(L-lysine) in mice.PG - 29-38." J Drug Target 8(1).

Ogris, M. and E. Wagner (2002). "Targeting tumors with non-viral gene delivery systems." Drug Discov Today 7(8): 479-485.

Ogris, M., E. Wagner, et al. (2000). "A versatile assay to study cellular uptake of gene transfer complexes by flow cytometry." PG - 237-43." Biochim Biophys Acta 1474(2).

Ogris, M., P. Steinlein, et al. (1998). "The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells." Gene Ther 5(10): 1425-33.

Ogris, M., P. Steinlein, et al. (2001). "DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression." AAPS PharmSci 3(3): E21.

Ogris, M., R. C. Carlisle, et al. (2001). "Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors." PG - 47550-5." J Biol Chem 276(50).

Ogris, M., S. Brunner, et al. (1999). "PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery." Gene Ther 6(4): 595-605.

O'Neill, M. M., C. A. Kennedy, et al. (2001). "Receptor-mediated gene delivery to human peripheral blood mononuclear cells using anti-CD3 antibody coupled to polyethylenimine." PG - 362-8." Gene Ther 8(5).

Pagnan, G., D. D. Stuart, et al. (2000). "Delivery of c-myc antisense oligodeoxynucleotides to human neuroblastoma cells via disialoganglioside GD(2)-targeted immunoliposomes: antitumor effects." J Natl Cancer Inst 92(3): 253-61.

Papisov, I. M. and A. Litmanovich (1988). "Molecular "recognition" in interpolymer interactions and matrix polymerization." Adv. Polym. Sci. 90: 139-179.

Parks, R. J. (2000). "Improvements in adenoviral vector technology: overcoming barriers for gene therapy." Clin Genet 58(1): 1-11.

Parney IF, Farr-Jones MA et al. 2002. Human autologous in vitro models of glioma immunogene therapy using B7-2, GM-CSF and IL-12. Can J Neurol Sci, 29: 267-275.

- Pelisek, J., L. Gaedtke, et al. (2006). "Optimized lipopolyplex formulations for gene transfer to human colon carcinoma cells under in vitro conditions." J Gene Med 8(2): 186-97.
- Perales, J. C., T. Ferkol, et al. (1994). "Gene transfer in vivo: sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake." PG - 4086-90." Proc Natl Acad Sci U S A 91(9).
- Pitard, B., N. Oudrhiri, et al. (1999). "Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection." Proc Natl Acad Sci U S A 96(6): 2621-6.
- Plank, C., B. Oberhauser, et al. (1994). "The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems." PG - 12918-24." J Biol Chem 269(17).
- Plank, C., K. Mechtler, et al. (1996). "Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery." Hum Gene Ther 7(12): 1437-46.
- Plank, C., K. Zatloukal, et al. (1992). "Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand." PG - 533-9." Bioconjug Chem 3(6).
- Pollard, H., J. S. Remy, et al. (1998). "Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells." PG - 7507-11." J Biol Chem 273(13).
- Porteous, D. J., J. R. Dorin, et al. (1997). "Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." Gene Ther 4(3): 210-8.
- Poulain, L., C. Ziller, et al. (2000). "Ovarian carcinoma cells are effectively transfected by polyethylenimine (PEI) derivatives." Cancer Gene Ther 7(4): 644-52.
- Pouton, C. W., P. Lucas, et al. (1998). "Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids." J Control Release 53(1-3): 289-99.

- Puls, R. and R. Minchin (1999). "Gene transfer and expression of a non-viral polycation-based vector in CD4+ cells.PG - 1774-8." Gene Ther 6(10).
- Qin, L., D. R. Pahud, et al. (1998). "Efficient transfer of genes into murine cardiac grafts by Starburst polyamidoamine dendrimers.PG - 553-60." Hum Gene Ther 9(4).
- R.C. Mulligan, The basic science of gene therapy, Science 260 (1993) 926-932.
- Remy-Kristensen, A., J. P. Clamme, et al. (2001). "Role of endocytosis in the transfection of L929 fibroblasts by polyethylenimine/DNA complexes." Biochim Biophys Acta 1514(1): 21-32.
- Rodriguez, M., V. Noe, et al. (1999). "Effects of anti-sense oligonucleotides directed toward dihydrofolate reductase RNA in mammalian cultured cells." Int J Cancer 81(5): 785-92.
- Romero, E. L., M. J. Morilla, et al. (1999). "On the mechanism of hepatic transendothelial passage of large liposomes." FEBS Lett 448(1): 193-6.
- Rulicke, T. and U. Hubscher (2000). "Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection." Exp Physiol 85(6): 589-601.
- Schenborn, E. T. and V. Goiffon (2000). "Calcium phosphate transfection of mammalian cultured cells." Methods Mol Biol 130: 135-45.
- Schneeberger A, Luhrs P, Kutil R et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-based melanoma cell vaccines immunize syngeneic and allogeneic recipients via host dendritic cells. J Immunol 2003; 171:5180-7
- Semple, S. C., A. Chonn, et al. (1996). "Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes." Biochemistry 35(8): 2521-5.
- Shayakhmetov, D. M., C. A. Carlson, et al. (2002). "A high-capacity, capsid-modified hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector for stable transduction of human hematopoietic cells." J Virol 76(3): 1135-43.
- Shi, N., R. J. Boado, et al. (2001). "Receptor-mediated gene targeting to tissues in vivo following intravenous administration of pegylated immunoliposomes." Pharm Res 18(8): 1091-5.

Simoes, S., V. Slepishkin, et al. (1999). "Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides." Gene Ther 6(11): 1798-807.

Simon J. Hall et al. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy Chapter 10: Gene therapy in the treatment of cancer; Edited by Thomas F. Kresina. 2001 Wiley-Liss, Inc.

Soiffer R, Lynch T, Mihm M et al. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95:13141-6.

Song, Y. K., F. Liu, et al. (1997). "Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration." Hum Gene Ther 8(13): 1585-94.

Sosnowski, B. A., A. M. Gonzalez, et al. (1996). "Targeting DNA to cells with basic fibroblast growth factor (FGF2)." J Biol Chem 271(52): 33647-53.

Stewart, JC (1980). "Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate." Anal Biochem. 1980 May 1;104 (1):10-4.

Suh, J., H. Paik, et al. (1994). "Ionization of polyethylenimine and polyallylamine at various pHs." Bioorg. Chem 22: 318-327.

Suh, W., J. K. Chung, et al. (2001). "Anti-JL1 antibody-conjugated poly(L-lysine) for targeted gene delivery to leukemia T cells." J Control Release 72(1-3): 171-8.

Tal, J. (2000). "Adeno-associated virus-based vectors in gene therapy." J Biomed Sci 7(4): 279-91.

Tang, M. X. and F. C. Szoka (1997). "The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes." Gene Ther 4(8): 823-32.

Tang, M. X., C. T. Redemann, et al. (1996). "In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers." Bioconjug Chem 7(6): 703-14.

Templeton, N. S., D. D. Lasic, et al. (1997). "Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression." Nat Biotechnol 15(7): 647-52.

- Thornhill SI. et al. Self inactivating gammaretroviral vectors for gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Mol. Ther.*, 2008 16:590-8
- Tomalia, D. and G. Killa, Eds. (1985). Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. New York, Wiley.
- Toncheva, V., M. A. Wolfert, et al. (1998). "Novel vectors for gene delivery formed by self-assembly of DNA with poly(L-lysine) grafted with hydrophilic polymers.PG - 354-68." Biochim Biophys Acta 1380(3).
- Tros de Ilarduya, C. and N. Duzgunes (2000). "Efficient gene transfer by transferrin lipoplexes in the presence of serum." Biochim Biophys Acta 1463(2): 333-42.
- Tros de Ilarduya, C., M. A. Arangoa, et al. (2002). "Enhanced gene delivery in vitro and in vivo by improved transferrin-lipoplexes." Biochim Biophys Acta 1561(2): 209-21.
- Tsai, J. T., K. J. Furstoss, et al. (2002). "Quantitative physical characterization of lipid-polycation-DNA lipopolyplexes." *Biotechnol Appl Biochem* 36(Pt 1): 13-20.
- van de Wetering, P., J. Y. Cherng, et al. (1998). "2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents." J Control Release 53(1-3): 145-53.
- Verma, I. M. and N. Somia (1997). "Gene therapy -- promises, problems and prospects." *Nature* 389(6648): 239-42.
- Wagner, E. and e. al. (1994). "Delivery of drugs, proteins and genes into cells using transferrin as a ligand for receptor-mediated endocytosis." Adv. Drug. Deliv. Rev 14: 113-136.
- Wagner, E., M. Cotten, et al. (1991). "DNA-binding transferrin conjugates as functional gene-delivery agents: synthesis by linkage of polylysine or ethidium homodimer to the transferrin carbohydrate moiety." Bioconjug Chem 2(4): 226-31.
- Wagner, E., M. Cotten, et al. (1991). "Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells." Proc Natl Acad Sci U S A 88(10): 4255-9.

Wagner, E., M. Zenke, et al. (1990). "Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells." Proc Natl Acad Sci U S A 87(9): 3410-4.

Walde, P. and S. Ichikawa (2001). "Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications." Biomolecular Engineering 18(4): 143-177.

Wiethoff, C. M., J. G. Smith, et al. (2001). "The potential role of proteoglycans in cationic lipid-mediated gene delivery. Studies of the interaction of cationic lipid-DNA complexes with model glycosaminoglycans." J Biol Chem 276(35): 32806-13.

Wightman, L., R. Kircheis, et al. (2001). "Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo." J Gene Med 3(4): 362-72.

Wojda, U. and J. L. Miller (2000). "Targeted transfer of polyethylenimine-avidin-DNA bioconjugates to hematopoietic cells using biotinylated monoclonal antibodies.PG - 674-81." J Pharm Sci 89(5).

Wolfert, M. A., E. H. Schacht, et al. (1996). "Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers." Hum Gene Ther 7(17): 2123-33.

Wolff, J. A., R. W. Malone, et al. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." Science 247(4949 Pt 1): 1465-8.

Wong, T. K., C. Nicolau, et al. (1980). "Appearance of beta-lactamase activity in animal cells upon liposome-mediated gene transfer." Gene 10(2): 87-94.

Wu, G. Y. and C. H. Wu (1987). "Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system." J Biol Chem 262(10): 4429-32.

Wu, G. Y. and C. H. Wu (1988). "Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo." J Biol Chem 263(29): 14621-4.

Wu, G. Y., J. M. Wilson, et al. (1991). "Receptor-mediated gene delivery in vivo. Partial correction of genetic analbuminemia in Nagase rats.PG - 14338-42." J Biol Chem 266(22).

Wu, J., M. E. Lizarzaburu, et al. (2001). "Cationic lipid polymerization as a novel approach for constructing new DNA delivery agents." Bioconjug Chem 12(2): 251-7.

Xu, B., S. Wiehle, et al. (1998). "The contribution of poly-L-lysine, epidermal growth factor and streptavidin to EGF/PLL/DNA polyplex formation." PG - 1235-43." Gene Ther 5(9).

Xu, L., W. H. Tang, et al. (2001). "Systemic p53 gene therapy of cancer with immunolipoplexes targeted by anti-transferrin receptor scFv." Mol Med 7(10): 723-34.

Xu, Y. and F. C. Szoka, Jr. (1996). "Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection." Biochemistry 35(18): 5616-23.

Yang, N. S., J. Burkholder, et al. (1990). "In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment." Proc Natl Acad Sci U S A 87(24): 9568-72.

Zabner, J., A. J. Fasbender, et al. (1995). "Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid." J Biol Chem 270(32): 18997-9007.

Zanta, M. A., P. Belguise-Valladier, et al. (1999). "Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus." PG - 91-6." Proc Natl Acad Sci U S A 96(1).

Zenke, M., P. Steinlein, et al. (1990). "Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A 87(10): 3655-9.

Zhang, G., Y. K. Song, et al. (2000). "Long-term expression of human alpha1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure." Gene Ther 7(15): 1344-9.

Zhu, N., D. Liggitt, et al. (1993). "Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice." Science 261(5118): 209-11.

ANEXO

ANEXO

Guía-resumen de las principales experiencias y observaciones experimentales

A. Formación del vector

1. Procedimiento de formación del LPP (se describe el método desarrollado de preparación del lipopoliploje).
2. Experimentos iniciales para demostrar su formación mediante centrifugación y turbidimetría: formación de agregados grandes al mezclar liposomas y poliplojes, demostrables por la aparición de un sedimento por centrifugación; o por la aparición de turbidez (aumento de la densidad óptica) al mezclar liposomas y poliplojes.
3. Caracterización de la formación del poliploje por decaimiento de la fluorescencia.
4. Visualización/demostración de la realidad lipopoliploje por microscopía confocal: la mezcla de PEI+liposomas fluorescentes produce agregados fluorescentes muy visibles, pero aunque muestra la formación del complejo, no sirve como demostración de una formación cuantitativa.
5. Preparación de los vectores RCC10: oxidación espontánea, desarrollo del método de preparación “en frío”.
6. Medida de la cmc por fluorimetría con sonda fluorescente (NPN)
 - RCC10 : se consigue medir su cmc
 - RCC12 : probablemente esta molécula no es lo suficientemente soluble, se evidencia en este mismo experimento
7. Caracterización por electroforesis de la formación del vector:

- RCC12 : negativo, ningún resultado tras un gran número de experimentos (como es de esperar si la molécula no se disuelve)
- RCC10 : se demuestra la formación del complejo por la mayor movilidad electroforética frente al plásmido desnudo
- HCC10 : no se obtiene una mayor movilidad electroforética de los complejos aparentemente, pero se demuestra su formación mediante un experimento adicional de fluorescencia

8. Protección del ADN frente a nucleasas séricas, para el RCC10 preparado a temperatura ambiente.

9. Preparación de vectores grandes: desarrollamos un nuevo ensayo de fluorescencia con los agentes RCC10 y HCC10 y un plásmido de alto peso molecular (PTG7101, 18 kB). Permite encontrar la relación adecuada ADN/RCC10 o ADN/HCC10 para formar el vector, que sorprendentemente es menor que la necesaria para formar el vector con los plásmidos de tamaño normal habituales (5 kB).

B. Caracterización del lipopoliplojejo

1. Por centrifugación, experimentos iniciales. Nos aportan la primera demostración de que el complejo se está realmente formado, pero no caracterizan con claridad la formación del LPP, al no ser posible sedimentar por separado liposomas y poliplojejos (estos últimos siempre sedimentan en una fracción importante en lugar de permanecer en solución, lo que impide distinguir el poliplojejo libre del poliplojejo asociado a liposomas formando el complejo).

2. Por electroforesis con liposomas con carboxifluoresceína: técnica analítica novedosa, primera electroforesis de liposomas (no existe referencia anterior en la bibliografía):

a) Demostración mediante electroforesis de la formación del LPP por disociación de los componentes del LPP con heparina o detergentes se demuestra que el vector consiste en la asociación entre liposomas y poliplejos

b) Determinación de la relación óptima entre liposomas y poliplejos: una variante de la electroforesis anterior, variando la cantidad de liposomas frente a una cantidad de lipopoliplexo constante, demuestra que el vector se forma en una relación determinada liposomas/poliplejos sin que haya exceso de liposoma no complejo

3. Por centrifugación usando liposomas cargados con Cloruro de Cesio: demuestra que existe un “umbral de formación” del lipopoliplexo (dato nuevo no reflejado en la bibliografía de otros vectores de asociación para transferencia génica análogos).

4. Por combinación de espectrofotometría (con sonda fluorescente carboxifluoresceína) y centrifugación: permite la caracterización completa del LPP; método analítico completamente nuevo para caracterizar vectores ternarios lípido/policación/ADN.

C. Ensayos de funcionalidad del lipopoliplexo: vacunaciones, entrega de antígenos hidrosolubles y transfección celular.

1. Transfección *in vivo*: entrega de genes por el LPP. Se administra el lipopoliplexo por vía subcutánea en la pata del animal, y se extrae el ARN total del tejido a las 48 horas y a los 7 días. Se transforma en ADNc y se amplifica por PCR con *primers* diseñados contra la secuencia del gen del GM-CSF para cuantificar la expresión del ARNm de la citoquina. Se cuantifica por comparación con un gen de expresión constante (GAPDH) según el método de las $\Delta\Delta Ct$.

2. Entrega de antígenos hidrosolubles por el LPP.

Se administra en ratón por la vena de la cola el LPP cargado con Ioduro de Propidio (IP), el cual solo resulta fluorescente si alcanza el núcleo celular y se une al ADN nuclear. La fluorescencia observada en los cortes histológicos de bazo se colocaliza con la situación anatómica de las células presentadoras de antígeno, que hayan podido incorporar el LPP accediendo el IP al núcleo celular.

3. Estudio de la respuesta inmunológica humoral inducida por el LPP portando un antígeno lipídico (GD3) y el gen de la citoquina GMCSF, en modelo murino. Elegimos la formulación SUV (SM:CH:DP)/PEI:pMOK-GMCSF, por ser la que proporciona la mejor respuesta humoral. Esta resulta además ser específica, y el título elevado de IgG2a sugiere que se ha desarrollado memoria celular.

4. Vacunación antitumoral con antígeno lipídico situado en la membrana liposomal (GD3):

a) Con 3 dosis de vacuna: la formulación elegida en el estudio anterior se ensaya frente a ratones inoculados con células tumorales de melanoma obtenidas por selección clonal que sobreexpresan GD3. Utilizamos tres dosis de vacunación. Se ensaya además el agente RCC10 en lugar del PEI, para formar el complejo.

b) Con 6 dosis de vacuna: utilizamos un mayor número de dosis de vacunación que en el ensayo precedente, y ensayamos dos dosis diferentes del gen de la citoquina (10 y 50 µg de ADN).

5. Vacunación con antígenos proteicos hidrosolubles (TMP) situados en el núcleo liposomal.

Los liposomas utilizados para constituir el LPP se cargan con extractos de proteínas de membrana de células de melanoma murino B16, a objeto de conseguir una inmunización frente a estas células.