

# Formulaciones biofarmacéuticas de ácidos desoxiribonucleicos en liposomas

Elder Pupo,  Eugenio Hardy

Departamento de Desarrollo de Formulaciones. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.  
Ave 31 entre 158 y 190. AP 6162, CP 10600, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.  
Telf.: (53-7) 2718008; Fax: (53-7) 2714764; E-mail: ehardy@cigb.edu.cu

## RESUMEN

En este artículo se evalúa el desarrollo actual de las formulaciones liposomales de ADN como producto biofarmacéutico. La discusión se enfoca específicamente en la potencialidad comercial de estas formulaciones, los resultados de la mayoría de los diferentes ensayos clínicos en que han sido probadas y las características de las tecnologías empleadas para su fabricación. Se discute además, cómo la propiedad intelectual existente en este campo marca los límites del desarrollo comercial de estos productos basados en liposomas. Por último, se analizan las tendencias actuales de las investigaciones encaminadas al mejoramiento de los sistemas de administración de genes basados en liposomas, que incluyen la síntesis química de nuevas estructuras lipídicas de una menor toxicidad y mayor eficiencia de transfección, el desarrollo de nuevas tecnologías de formulación de estos lípidos, así como el desarrollo de la selectividad de la acción de las medicinas de genes formuladas en liposomas.

**Palabras claves:** liposoma, sistema de administración, terapia génica

*Biotecnología Aplicada 2002;19:211-217*

## ABSTRACT

**Biopharmaceutical Formulations of Liposome-associated Desoxyribonucleic Acids.** In this paper the current development of liposome-based DNA formulations as a biopharmaceutical product is evaluated. The discussion is focused on the commercialization potential of these formulations, results of different clinical trials where they have been tested and features of technologies used for their production. It is also discussed how the intellectual property in this field marks the limits of the commercial development of these liposome-based products. Finally, it is analyzed current trends on the research of liposome-based gene delivery systems, including chemical synthesis of new lipid structures with lower toxicity and higher transfection efficiency, development of new formulation technologies of these lipids, as well as development of the selectivity of action of these liposome-based gene medicines.

**Keywords:** delivery system, gene therapy, liposome

## Introducción

Fraley y colaboradores en el año 1980 utilizaron, por primera vez, los liposomas para la administración de genes al interior de las células. En estos experimentos, sin embargo, los liposomas sólo encapsulaban del 30 al 50% de los plásmidos [1]. Posteriormente, Felgner y colaboradores [2] trabajaron en la solución de este problema tecnológico y para ello idearon preparar liposomas en los que algunos de los lípidos estándares fueran reemplazados por otros que llevaran una carga positiva en su extremo hidrofílico. En 1983 había muy pocos ejemplos de lípidos cargados positivamente (catiónicos) que tuvieran la estructura adecuada para formar liposomas, pero ya en 1987 el grupo de Felgner sintetizó variantes de lípidos catiónicos que encapsularon al 100% de los plásmidos de ADN [2].

Estos primeros trabajos y otros que demostraron las potencialidades del uso de los liposomas como sistema de administración de ADN en la terapia génica [3-6] fueron las bases para una investigación intensa en este campo que, en un tiempo relativamente corto, progresó hacia la realización de ensayos clínicos. Al mismo tiempo, sobre la base de la propiedad intelectual generada se formaron varias compañías dedicadas al desarrollo de productos para esta terapia.

En este artículo se evalúa el desarrollo actual de las formulaciones liposomales de ADN como producto

biofarmacéutico. Se discute la potencialidad de estas formulaciones desde el punto de vista comercial, se exponen los resultados de la mayoría de los ensayos clínicos en los que han sido probadas y las características de las tecnologías empleadas para su fabricación. Se muestra cómo la propiedad intelectual existente en este campo marca los límites del desarrollo comercial de los productos basados en liposomas. Por último, se analizan las tendencias actuales de la investigación encaminada al mejoramiento de los sistemas de administración de genes basados en liposomas. Estos sistemas incluyen la síntesis química de nuevas estructuras lipídicas de una menor toxicidad y mayor eficiencia de transfección, el desarrollo de nuevas tecnologías de formulación de estos lípidos, así como el desarrollo de la selectividad de la acción de las medicinas de genes formuladas en liposomas.

## Perspectiva Comercial de las Formulaciones de ADN Basadas en Liposomas

No existen actualmente en el mercado productos farmacéuticos que contengan ADN encapsulado en liposomas, ni hay alguno que haya sido aprobado por las autoridades reguladoras de Estados Unidos (FDA) o de la Unión Europea (EMEA) para su uso en humanos [7-11]. Se pudiera especular que ello está asociado,

fundamentalmente, al poco tiempo que lleva el ADN como producto farmacéutico, y en menor grado, a las dificultades enfrentadas en su desarrollo, tales como la limitada eficiencia o inseguridad de los métodos actuales de administración de genes, y la inmunogenicidad relativamente baja mostrada por el ADN como candidato vacunal en ensayos clínicos [12].

Algunas formulaciones de ADN encapsulado en liposomas se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos. Entre las más adelantadas, la formulación del gen HLA-B7 del sistema principal de histocompatibilidad (MHC) en liposomas catiónicos, que fue desarrollada por la compañía Vical Inc. (EE.UU.) para el tratamiento del melanoma metastático y el cáncer de cabeza y cuello no operable, se encuentra en ensayo clínico fase III. Se prevé por parte de esta compañía que este producto estará disponible comercialmente en el año 2005 [13].

En la Tabla 1 se muestran las formulaciones de ADN encapsulado en liposomas que actualmente se prueban en ensayos clínicos. Como característica común

de las formulaciones usadas se puede indicar que todas incluyen un lípido catiónico en su composición, y que el gen administrado ha sido empleado en la mayoría de los casos con propósitos terapéuticos. Las afecciones tratadas están relacionadas principalmente con el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, y la fibrosis quística. En comparación, la utilización de los liposomas con propósitos vacunales en humanos es mucho más incipiente. Se han obtenido sólo modestos resultados en la inmunización con complejos ADN-lípido catiónico, donde las respuestas inmunes han sido similares [14] o ligeramente superiores [15] a las obtenidas con la inmunización de ADN solo.

Los resultados de los estudios clínicos mostraron que la administración de los genes en liposomas, en cantidades terapéuticamente activas, es segura. Los estudios clínicos con genes de citoquinas mostraron lo atractivo de su empleo como alternativa al uso de citoquinas directamente. La eficacia de la aplicación del gen terapéutico de la interleuquina 2 (IL-2) en un

Tabla 1. Formulaciones de ADN en liposomas evaluadas actualmente en ensayos clínicos.

Compañía	Producto	Resultado del ensayo clínico
Vical Incorporated (EE.UU.)	Leuvectin™. Un vector de ADN que contiene el gen de la IL-2 es formulado con un lípido catiónico (DMRIE/DOPE).	Ensayos clínicos fase II. País: EE.UU., 1999-2001. Resultados: Figlin y colaboradores inyectaron Leuvectin™ a pacientes con cáncer metastático de células renales. Sin efectos adversos. De 14 pacientes evaluables, 2 tuvieron respuestas objetivas parciales (ROP) en el tumor inyectado durante más de 15 meses. En un paciente, un tumor no inyectado se redujo en más del 50% de su masa [17].
	Allovectin-7®. Usa un complejo lípido (DMRIE/DOPE)- gen HLA-B7 para ayudar al sistema inmune a reconocer y atacar las células cancerígenas.	Ensayos clínicos fase II (1998, EE.UU.): Hersh y colaboradores administraron Allovectin® en pacientes con melanoma metastático [18]. Resultado: De 48 pacientes, 4 tuvieron respuestas parciales y 6 tuvieron una regresión de la enfermedad. De 48 pacientes 10 estuvieron estables. No se observaron toxicidades grado III o IV relacionadas con el tratamiento. Se realizan ensayos clínicos fase III (1999-2001, EE.UU.) en el que se aplica el complejo HLA-B7 plásmido/lípido directamente a pacientes con melanoma metastático. También se realizan (2001) estudios fase I/II con Allovectin® en combinación con bajas dosis de IL-2.
Targeted Genetics Corp. (Seattle, EE. UU.)	Complejo gen E1A /lípido catiónico DC-colesterol, para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello (a través de la inyección intratumoral) y del cáncer de ovario (a través de una infusión en la cavidad peritoneal) para disminuir la resistencia de los tumores al tratamiento con radioterapia o quimioterapia.	Ensayos clínicos fase II en pacientes con cáncer de cabeza y cuello no operable (2001). Los ensayos clínicos fase I (1998, EE.UU.) no mostraron efectos tóxicos durante el tratamiento. Mayo 2000. Ensayo clínico fase II de tgDCC-E1A en pacientes con cáncer de cabeza y cuello [19]. De 21 pacientes evaluables, 1 experimentó una respuesta completa y otros 9 mostraron una estabilización o disminución del tamaño del tumor tratado. Estudios fase I en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario y cáncer de mamas demostraron que el gen E1A puede ser administrado sin riesgos. Estudio fase I de escalado de dosis del producto tgDCC-E1A en combinación con quimioterapia para el tratamiento del cáncer de ovario se inició en diciembre de 1999 y se espera que corra hasta principios del 2001. Estudio fase II de tgDCC-E1A en combinación con radioterapia para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello se inició en diciembre del 2000.
	Gen E1A formulado en liposomas LPD (lípidos catiónicos con ADN condensado con protamina) para el tratamiento de cáncer metastático, se aplica sólo y en combinación con quimioterapia.	Estudios preclínicos de tgLPD-E1A [20] han demostrado la habilidad del tgLPD-E1A administrado por vía sistémica para impedir el crecimiento del tumor en animales transplantados con dos tumores humanos diferentes. Estos efectos se incrementaron cuando se combinó con un tratamiento con quimioterapia.
Valentis, Inc. (California, EE.UU.)	Complejo formado por plásmido con gen de la IL-2 humana y una preparación liposomal del lípido catiónico DOTMA y colesterol.	Febrero 15, 2001. Se completó el reclutamiento de pacientes para su ensayo clínico aleatorizado fase IIb Se inyectó el complejo directamente en los tumores de pacientes con carcinomas de cabeza y cuello recurrentes o refractarios [21]. Los resultados de la fase I mostraron que la medicina del gen de IL-2 fue segura y bien tolerada, con evidencia de la expresión del gen por más de 7 días. Estos datos muestran, junto con múltiples estudios preclínicos, un decrecimiento en la velocidad de progresión del tumor o una remisión completa, y un claro creamiento en la supervivencia.
	Gen IL-2 humana formulada con lípidos catiónicos (aplicada por vía i.v.)	Abril 19, 2001. Se administró esta medicina por vía intravenosa a los primeros 4 pacientes en un ensayo clínico fase I. Esta medicina de genes usa un sistema de liberación optimizado de lípidos catiónicos que han mostrado localizarse eficientemente en los pulmones [22].
	Gen del VEGF (165) formulado con lípidos catiónicos (DOTMA) para tratar el estrechamiento de los vasos sanguíneos después de la angioplastia.	Noviembre 10, 1999. Se completó un ensayo clínico fase II a doble ciegas, con placebo controlado del gen del VEGF (165) con resultados positivos [23]. Fue administrado intravascularmente mediante un catéter a pacientes con enfermedad vascular periférica inmediatamente después de la angioplastia. Los pacientes mostraron evidencias de angiogénesis con la misma efectividad que el grupo que fue tratado con VEGF en un vector de adenovirus y no mostraron efectos adversos. Esta formulación del VEGF (165) también se prueba en un ensayo fase II en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias. Más de 50 pacientes con enfermedad de arteria periférica o coronaria han sido tratados sin que se observen efectos adversos.
	Gen CFTR formulado en un aerosol con lípidos catiónicos para la fibrosis quística.	California, Noviembre 23, 1999. Se completó un ensayo clínico fase IIa sin que se encontraran evidencias de inflamación (tolerado). El gen fue administrado con lípidos catiónicos en un aerosol por las vías respiratorias hacia el pulmón [24].
Merck (Alemania)	Gen HPV formulado con lípidos catiónicos. Vacuna de ADN contra el virus de papiloma humano [25].	Ya se realizan ensayos clínicos fase I.

ensayo clínico de fase I/II fue de 14 %, comparable a la que se obtuvo con la aplicación de la citoquina directamente y que osciló entre 10 y 20 %. En estos estudios se encontró, además, una menor respuesta de efectos adversos asociada al tratamiento [16].

### Tecnologías Utilizadas para la Obtención de las Formulaciones de ADN Aplicadas en Ensayos Clínicos

La primera generación de liposomas catiónicos de ADN, los complejos ADN-lípido catiónico, que actualmente se prueban en ensayos clínicos, tienen las siguientes características [26]: i) no son mutagénicos ni inmunogénicos, ii) se pueden producir en grandes cantidades, iii) no tienen un límite conocido para la talla del gen a formular, iv) se agregan con el tiempo, no son estables, por lo que hay que usarlos inmediatamente después de formulados, v) presentan una eficiencia de transfección relativamente baja en comparación con los vectores virales.

Un ejemplo de la tecnología de obtención de estas formulaciones se muestra en la Figura, la que aparece referida en la patente de Vical Inc. (EE.UU.) No. 6,147,055 y que describe la obtención de complejos del ADN de la IL-2 con la mezcla lipídica de marca comercial DMRIE y DOPE. Estos complejos se obtuvieron por la simple unión del ADN con la mezcla lipídica, que es facilitada por la interacción electrostática del ADN cargado negativamente con los grupos cargados positivamente en el lípido catiónico DMRIE [27].

En el producto Allovectin-7 desarrollado por la compañía Vical Inc. (EE.UU.), se obtienen por separado la solución estéril del ADN con 400 µg del gen HLA-B7 del MHC, y la mezcla lipídica seca estéril que contiene 77 µg de DMRIE y 90 µg de DOPE. Estos dos componentes, en viales estériles separados son estables durante al menos 8 semanas almacenados en condiciones apropiadas, a -20 °C para el ADN y a 4 °C para la mezcla DMRIE/DOPE. Justo antes de inyectar al paciente, ambos componentes deben mezclarse [28].

Otra de las tecnologías utilizadas para la formulación del gen terapéutico consiste en compactar el ADN con un polímero catiónico antes de ser encapsulado en los liposomas catiónicos. Como resultado se obtienen partículas de un menor tamaño, que muestran una mayor estabilidad y mejor protección del ADN ante la acción de las enzimas *in vivo*. La compañía Targeted Genetics Corp. (Seattle, EE.UU.) ensayó en humanos una formulación del gen E1A para el tratamiento de cáncer metastático en la que el ADN se condensó con el policatión protamina y luego se encapsuló en liposomas del lípido catiónico DC-colesterol (Tabla 1). En comparación con la simple mezcla del ADN y el lípido catiónico, esta formulación permitió una mayor actividad biológica del ADN aplicado por vía intravenosa [29].

Las formulaciones de ADN en liposomas catiónicos, con la inclusión de los complejos ADN-lípido catiónico y los complejos ADN-lípido catiónico-protamina, se exploraron clínicamente por varias vías de administración, entre ellas la intralesional, la intravenosa, la

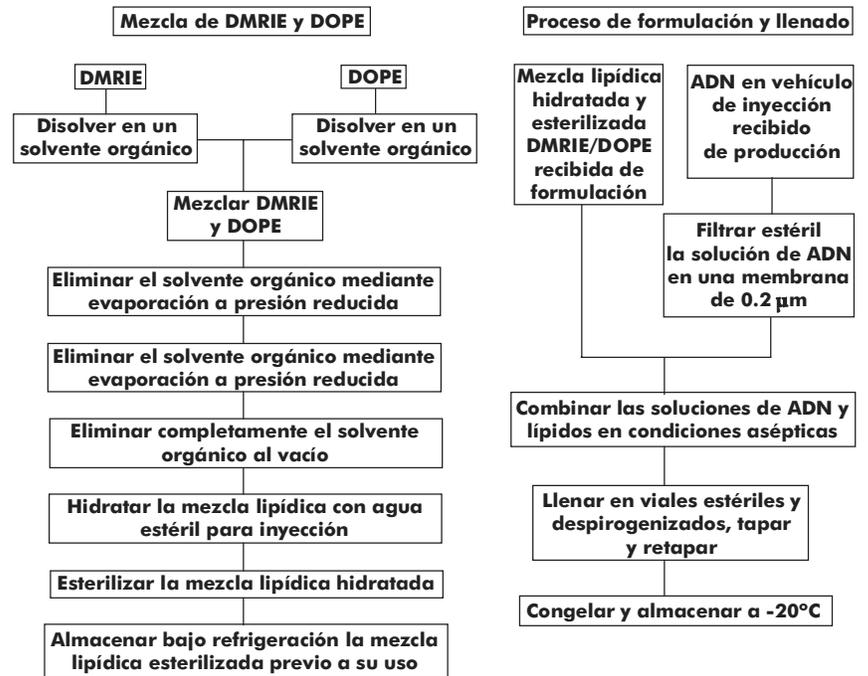


Figura. Proceso de obtención de complejos del ADN de la interleuquina 2 con la mezcla lipídica de DMRIE y DOPE. Estos complejos se obtienen por la simple mezcla del ADN con la mezcla lipídica, que es facilitada por la interacción electrostática del ADN cargado negativamente con los grupos cargados positivamente en el lípido catiónico DMRIE [27].

alveolar y la intravascular (Tabla 1). La vía intralesional fue utilizada en varios de estos estudios ya que permitió alcanzar, de forma sencilla, una adecuada biodisponibilidad del complejo ADN-lípido catiónico en el tejido enfermo, y disminuyó en gran parte los efectos adversos asociados a la toxicidad de los lípidos catiónicos. En cambio, la administración del ADN con lípidos catiónicos por las vías intravenosa y alveolar resultó ser menos eficiente o producir una mayor cantidad de efectos adversos por lo que es necesario disponer de un diseño y una optimización más cuidadosa de las formulaciones. Sin embargo, no existe una información detallada sobre estos estudios clínicos y las características de las formulaciones usadas, puesto que algunos de ellos no han concluido o no han sido publicados los resultados por parte de las compañías que los realizan.

### Patentes que Fijan el Desarrollo Comercial de las Formulaciones de ADN con Lípidos Catiónicos

Bossart y Pearson en el año 1995 [30] propusieron una jerarquía de la propiedad intelectual en la que las patentes con reivindicaciones dirigidas a conceptos de tratamiento de enfermedades tienen un impacto más amplio, ya que éstas excluyen del mercado el mayor número de productos. Le siguen por su fortaleza para bloquear el desarrollo de productos alternativos las patentes que reivindican la secuencia del gen terapéutico, ya que usualmente no existen sustitutos para un gen terapéutico determinado. Con menor grado de fortaleza se ubican las relacionadas con los sistemas de liberación de genes, basados en

polímeros, lípidos, etc. y en último lugar las que reivindican sistemas de expresión de genes ya sean promotores, potenciadores etc.

Las patentes dirigidas a los sistemas no-virales de liberación de genes comenzaron a ser aprobadas en los años 1996 y 1997 [31].

A finales del año 1996 y principios del año 1997 la oficina de patentes de Estados Unidos aprobó dos patentes a la compañía dedicada a la terapia de genes Vical Inc., la USP 5,580,859 y la USP 5,589,466 que cubren la administración de ADN desnudo con propósitos terapéuticos y vacunales respectivamente. Esta tecnología parece ser útil para la vacunación y ha sido autorizada a varias compañías productoras de vacunas como Merck (Whitehouse Station, Nueva Jersey, EE.UU.) y la transnacional Pasteur Merieux Connaught.

Otra patente, la USP 5,676,954 inventada por Kenneth Brigham fue otorgada en Octubre de 1997 a la Universidad de Vanderbilt (Nashville, Tennessee, EE.UU.), la cual la había autorizado a la compañía GeneMedicine Inc. (EE.UU.). La compañía Valentis Inc. (EE.UU.) asumió esta autorización al ocurrir la fusión de las compañías GeneMedicine con Megabios Inc. (EE.UU.). Esta patente demanda ampliamente el uso de complejos de lípido catiónico con ADN administrados por vía intravenosa o por inhalación. Por otro lado, a la compañía Megabios Inc se le habían autorizado la patente USP 5,827,703 y la USP 5,756,353 de la Universidad de California (EE.UU.). Estas patentes plantean variaciones sutiles del sistema de liberación formado por complejos de lípido catiónico con ADN, que fueron descritas en la invención de Kenneth Brigham. Con la formación de la compañía Valentis Inc., las dos patentes complementarias quedaron bajo el control exclusivo de una sola compañía.

Las patentes sobre la síntesis y el uso de lípidos catiónicos que actualmente se prueban en ensayos clínicos (Tabla 1) fueron concedidas a las compañías patrocinadoras en los años 1993-1995 (Tabla 2).

### Tendencias de la Investigación sobre los Sistemas de Administración de Genes Basados en Liposomas

La mayoría de las formulaciones de ADN-liposoma que se encuentran en ensayos clínicos son complejos de ADN con lípidos catiónicos, las cuales se reconocen en la literatura como mejorables en término de eficiencia de transfección, toxicidad y estabilidad de la formulación *in vitro* e *in vivo* [32-34].

Las investigaciones para el mejoramiento de estas formulaciones comprenden dos áreas principales: i) la síntesis química de nuevas estructuras lipídicas de una menor toxicidad y mayor eficiencia de transfección, y ii) la obtención de nuevas tecnologías de formulación de estos lípidos.

#### Síntesis química de nuevas estructuras lipídicas

Para identificar moléculas lipídicas más eficaces fue necesario que los investigadores sintetizaran un gran número de moléculas estructuralmente relacionadas que luego fueron probadas en ensayos *in vivo*. Como un ejemplo del desarrollo en este campo de investiga-

Tabla 2. Principales patentes concedidas en el período de 1993 a 1999 sobre la síntesis y uso de los lípidos catiónicos en la terapia génica.

Patente	Composición de la formulación/propiedades
Lípidos catiónicos. Año: 1994 No: USP 5334761 Firma: Life Technologies Inc. (EE.UU.).	Lípidos catiónicos de la familia DORI donde los grupos R1 y R2 (cadenas laterales) son grupos alquilo o alquenilo de 23 átomos de carbono.
Lípidos catiónicos para la liberación intracelular de moléculas biológicamente activas Año: 1993 No: USP 5264618 Firma: Vical, Inc., San Diego, CA, EE.UU.	Complejos lípido catiónicos-ADN. Lípido catiónico incluido: DMRIE. Propiedades: Facilitan el transporte de agentes biológicamente activos (ej, ADN) al interior de las células.
Lípidos catiónicos para la liberación intracelular de moléculas biológicamente activas Año: 1995. No: USP 05459127 Firma: Vical, Inc., San Diego, CA, EE.UU.	Complejos lípido catiónicos-ADN. Lípido catiónico incluido: DMRIE. Propiedades: Facilitan el transporte de agentes biológicamente activos (ej, ADN) al interior de las células.
Método para liberar ácidos nucleicos dentro de las células. Año: 1994. No: USP 5283185 Firmas: University of Tennessee Research Corporation, Knoxville, TN. McMaster University, Ontario, Canadá.	Complejos lípido catiónicos-ADN. Lípido catiónico incluido: DC-Chol. Propiedades: Facilitan la transferencia de ácidos nucleicos al interior de las células.
Composiciones y métodos para la terapia génica <i>in vivo</i> Año: 1998 No: USP 5827703 Firma: univ.CALIFORNIA (US), Licenciada a Valentis Inc. (EE.UU.).	Vesículas constituidas por lípidos catiónicos (DOTMA, DDAB, DOTAP, DOPE, L-PE (lisinil-fosfatidilamina)) y de manera opcional, lípidos no catiónicos (colesterol) en una relación molar desde 1:19 hasta 1:0. El cassette de expresión para el ADN puede ser lineal o plasmídico. Cubre la liberación sistémica de genes en complejos ADN: lípido, incluyendo la vía intravenosa o intraperitoneal.
Complejos DNA-lípido catiónico para la transfección de ADN Año: 1999 No: USP 5932241 Firma: Valentis Inc. (EE.UU.)	Complejo ADN-liposoma constituido por una mezcla de lípidos neutros (colesterol o DOPE) y un lípido catiónico de cadenas laterales R1 y R2 de 11 a 29 átomos de carbono y un residuo catiónico de fórmula: --CH2--(CH2) <i>n</i> --N+(R)3. ( EDMPC, O-etil-dimirstoil-fosfatidilcolina).

ción, Felgner de la compañía Vical Inc. (EE.UU.), obtuvo en el año 1996 estructuras lipídicas que produjeron un incremento en la expresión del transgén en el pulmón de ratón de 1 000 veces comparado con la obtenida cuando se usaron las estructuras lipídicas de sus estudios iniciales en el año 1993 [35].

A pesar de que de que la eficacia de estas formulaciones liposomales de ADN, medida en término de la expresión total del transgén (masa total de proteína expresada), se acerca a la lograda con vectores virales, todavía los virus son sistemas de administración de genes mucho más eficientes [36]. Por ejemplo, los adenovirus son típicamente usados *in vitro* a una multiplicidad de infección de cerca de 100. En estas condiciones, en las que cada célula se expone a un promedio de sólo 100 partículas de virus funcionales, la mayoría de ellas pueden ser transfectadas. Para lograr niveles comparables de la expresión del transgén con liposomas catiónicos, las células deben ser expuestas a cerca de 10<sup>6</sup> de copias del plásmido por célula, 5 µg de plásmido/millón de células. Diferencias similares en la eficiencia de estos dos sistemas de administración de genes son aparentes en los estudios *in vivo*. En el pulmón de ratón, fueron usadas cerca de 2 x 10<sup>13</sup> copias del plásmido que corresponde a 130 µg ADN formuladas en liposomas, mientras que en un estudio típico de vector de adenovirus se administraron sólo 10<sup>9</sup> partículas de virus. Por lo tanto, la eficacia es comparable para los liposomas catiónicos y los vectores virales, pero las eficiencias relativas, en tér-

mino del número de copias del transgén requeridas para lograr una expresión del gen óptima y segura, difieren al menos  $10^4$  veces.

A pesar de estas diferencias, los liposomas representan una alternativa al uso de sistemas virales de administración de genes *in vivo*. Los sistemas no-virales de administración de genes, en particular los liposomas catiónicos, tienen como características una expresión temporal del producto del gen y una menor eficiencia de transfección, mientras que no generan una apreciable respuesta de anticuerpos contra sus estructuras al ser administrados repetidamente.

Por su parte los vectores virales como el asociado a adenovirus (VAA) tienen como propiedades la expresión prolongada del producto del gen, tienen una alta eficiencia de transfección y generan una respuesta de anticuerpos contra sus estructuras al ser administrados repetidamente.

Esto hace que los liposomas catiónicos sean más apropiados para las aplicaciones en las que hay que administrar el gen repetidamente y se necesite una expresión temporal del gen. Este es el caso del tratamiento con genes de citoquinas como la IL-2, el interferón alfa (IFN-alfa) o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) para el tratamiento de células que se dividen con rapidez como son las del cáncer o las del tejido endotelial vascular.

Los vectores virales como el VAA son más apropiados, sin embargo, para las aplicaciones en las que se necesita una sola administración del gen y la expresión del mismo por tiempo muy prolongado. Este es el caso de la generación de una respuesta inmune protectora mediante la aplicación de vacunas de ADN.

La diferencia en eficiencia de transfección entre los liposomas y los vectores virales define la oportunidad para el desarrollo de una nueva generación de sistemas sintéticos de administración de genes. Esta tercera generación de formulaciones de liposomas debe ser varios órdenes de magnitud más eficiente que las formulaciones que actualmente están en investigación.

### Nuevas tecnologías de formulación de liposomas

A diferencia de las formulaciones de vectores virales, los complejos ADN-liposomas catiónicos no son estables en término de tamaño de partícula [37-39]. Ha sido difícil obtener complejos ADN-liposomas catiónicos con una distribución de tamaño de partícula adecuado para la inyección sistémica, y, en la mayoría de los estudios publicados, se han utilizado preparaciones inestables. Frecuentemente, estos complejos fueron usados dentro de un período de tiempo de 30 min hasta unas pocas horas. En estudios clínicos en los que se usaron lípidos catiónicos para la formulación de ADN terapéutico, los dos componentes fueron mezclados al lado de la cama del paciente y usados inmediatamente [39]. La inestabilidad estructural junto con la pérdida de la eficiencia de transfección de los complejos de ADN-liposomas catiónicos han sido importantes obstáculos para el desarrollo de la terapia génica basada en liposomas.

Complejos estables de ADN-liposomas catiónicos se han podido obtener mediante dos estrategias: i) la adición de pequeñas cantidades de un conjugado de polietilenglicol con fosfolípido que es incorporado en

la estructura del liposoma, y ii) la compactación del ADN con pequeños polímeros catiónicos (poliaminas) antes de la formación del complejo ADN-liposoma. Estas preparaciones fueron estables a 4 °C por varios meses y dieron altas y reproducibles eficiencias de transfección del gen después de ser administradas en ratones por vía intravenosa [40]. En cambio, las formulaciones similares pero no estabilizadas perdieron completamente su capacidad de transfectar las células en sólo 4 días.

Otra de las estrategias que han sido utilizadas para la estabilización de los complejos ADN-liposomas catiónicos fue la adición del surfactante Tween 80. Las formulaciones así obtenidas forman complejos estables con el ADN que no experimentan un cambio en su eficiencia de transfección o tamaño de partícula al ser almacenadas a 4 °C durante al menos 10 días [41]. Adicionalmente, la eficiencia de transfección de estas formulaciones no se afectó por la presencia de suero en los experimentos *in vitro*. Se supone que la estabilización de los complejos ADN-liposomas catiónicos por parte del Tween 80 se produce por la presencia en la superficie de las partículas lipídicas de las estructuras ramificadas de polietilenglicol presentes en el Tween 80, las cuales forman una barrera estérica que minimiza las interacciones entre el ADN y los lípidos catiónicos, responsables de la agregación de los complejos.

Como materia prima para la producción de complejos ADN-liposomas, el Tween 80 es atractivo ya que su uso en humanos ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, EE.UU.) pero además, esta sustancia sintética puede ser comprada a las compañías suministradoras en grandes cantidades y con una alta pureza a precios relativamente bajos.

Estas formulaciones de ADN no tienen que ser preparadas al momento de usarse, ya que pueden ser elaboradas como un solo producto listo para su uso, el cual es estable durante su almacenamiento y transportación.

El detergente octilglucósido es otro surfactante que se ha empleado en la formulación de los complejos de ADN-liposomas catiónicos para obtener preparaciones de ADN estables. Los complejos estables de ADN-liposomas catiónicos se obtuvieron al solubilizar los liposomas catiónicos en octilglucósido al 1 % y mezclar el ADN con el lípido en presencia del detergente [42]. La eliminación del detergente mediante una diálisis produjo una suspensión de lípido-ADN que fue capaz de transfectar las células cultivadas de tejido hasta 90 días después de su almacenamiento a 4 °C, sin ninguna pérdida en su eficiencia de transfección. Se obtuvieron niveles similares en la transferencia de los genes cuando se mezclaron los lípidos catiónicos en forma de liposomas con el ADN justo antes de añadirlo a las células. Sin embargo, la capacidad de transfectar las células se perdió completamente pasadas 24 h.

Como una alternativa para la disminución de la toxicidad de las formulaciones de ADN-liposomas se elaboraron formulaciones de ADN-liposomas que evitan el uso de lípidos catiónicos. En una de estas nuevas tecnologías [43], el ADN se compacta con el polication espermina, en una emulsión de agua-cloroformo estabilizada con fosfolípidos. Después de eliminar el solvente orgánico, las partículas formadas pueden ser

homogeneizadas hasta un tamaño promedio de alrededor de 200 nm, que retienen en su interior el ADN que se protege de la digestión con nucleasas. Estas preparaciones liposomales fueron activas en la transfección de varias líneas celulares, y su eficiencia de transfección en cultivo tuvo el mismo orden de magnitud que la obtenida con los lípidos catiónicos, no obstante fueron mucho menos tóxicas para las células.

En otra de las tecnologías que evita el uso de lípidos catiónicos [44] se produce una eficiente encapsulación del ADN en liposomas neutros pequeños mediante la adición de etanol y cloruro de calcio a una mezcla acuosa de vesículas unilaminares pequeñas (SUVs) y ADN plasmídico. Los complejos lipídicos neutros, compuestos por 1,2-dioleoyl-sn-phosphatidylcholine (DOPC), DOPC/DOPE (1,2-dioleoyl-sn-phosphatidylethanolamine) (1:1) o DOPC/DOPE/colesterol (1:1:1), tienen un diámetro promedio efectivo de menos de 200 nm y encapsulan hasta el 80% del ADN el cual es retenido a pH 4,0 y en el suero a 37 °C. Se espera que la toxicidad de esta formulación sea significativamente menor que la de otros sistemas no-virales de administración de genes.

### Desarrollo de la selectividad de la acción de las medicinas de genes formuladas en liposomas

Si bien la vía de administración intra-lesional es la más utilizada por su simplicidad, también se ha presentado la necesidad de desarrollar formulaciones de ADN-liposoma que puedan ser aplicadas con efectividad por vía sistémica.

Entre los problemas que aparecen en el desarrollo de formulaciones para la aplicación por esta vía está la posibilidad de diseminación de estas medicinas en varios órganos y tejidos del organismo [45, 46], que pueden conducir a una mayor toxicidad del tratamiento y una menor efectividad de su acción terapéutica [47].

Una estrategia que se ha planteado para solucionar este problema es el desarrollo de sistemas de administración de genes basados en liposomas que se puedan dirigir a regiones específicas del organismo, como pueden ser un órgano o un tejido, en los que se quiere combatir la enfermedad [48].

Esta especificidad se logra mediante el acoplamiento en la superficie de los liposomas de ligandos o fragmentos de anticuerpos, llamados inmunoliposomas [49], que tienen una alta afinidad por receptores o antígenos que se expresan en el exterior de las células del tejido enfermo.

Liposomas dirigidos con ligandos como el folato, la transferrina o un fragmento de anticuerpo contra el receptor de la transferrina han mostrado un alto nivel de expresión del transgén en modelos preclínicos de cáncer humano de mama, próstata y cabeza y cuello.

También se han utilizado diferentes ligandos, como el beta-sitosterol beta-D-glucósido (Sit-D), para dirigir las formulaciones liposomales hacia el hígado. Los complejos de ADN/liposoma-Sit-D, de un tamaño promedio pequeño de 100 a 250 nm, produjeron una expresión alta y selectiva del gen marcador de luciferasa en el hígado de ratones una vez administrados por vía intravenosa [50]. Mediante la inclusión de la transferrina en la formulación de ADN liposomal fue posible expresar el transgén marcador beta-galactosidasa exclusivamente en la masa de un tumor de carcinoma hepatocelular implantado en el hígado de ratones, después de ser aplicada esta formulación en la arteria hepática [51].

Para que las formulaciones de ADN-liposomas tengan una alta eficacia al ser administradas por vía sistémica, es necesario además que éstas se mantengan en el torrente sanguíneo por un tiempo prolongado en concentraciones relativamente altas. Los complejos de ADN-liposoma ordinarios, de carga superficial positiva y tamaño de partícula grande son eliminados con facilidad por el sistema retículo-endotelial, por lo que tienen un tiempo de vida en sangre relativamente corto y sus mayores niveles de actividad son sólo observados en determinados órganos como los pulmones, el bazo y el hígado [52].

En la actualidad se desarrollan formulaciones de ADN-liposomas que tienen un mayor tiempo de circulación en sangre. Estas nuevas formulaciones se obtuvieron a través del acople en sus estructuras de polímeros como el polietilenglicol [49] o con un menor tamaño promedio de partícula, 70 nm, y carga superficial neta neutra. Estos polímeros evitan, además, la absorción y eliminación de estas formulaciones al disminuir la interacción con las estructuras del sistema retículo-endotelial y los componentes de la sangre [52].

### Consideraciones Finales

Los liposomas catiónicos han sido utilizados en muchas aplicaciones de la terapia génica. A pesar de que las investigaciones en este campo se encuentran en etapas tempranas, un número de estudios ya tienen resultados en humanos y mostrado la baja toxicidad del tratamiento. Aunque no hay una evidencia inequívoca de la eficacia, se han demostrado cambios fisiológicos que son relevantes para el proceso de las enfermedades tratadas.

Unos de los mayores retos que todavía enfrenta este campo es el diseño de formulaciones más eficientes. Los sistemas actuales de administración de genes serán, indudablemente, vistos como en su infancia cuando sean comparados con los desarrollados en el futuro. Es poco probable que alguna vez exista una formulación de liposomas universal, sino que serán varias formulaciones diseñadas específicamente para determinados sitios de órganos y determinadas enfermedades.

1. Fraley R, Subramani S, Berg P, Papahadjopoulos D. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J Biol Chem* 1980;255:10431-5.

2. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7413-7.

3. San H, Yang ZY, Pompili VJ, Jaffe ML, Plautz GE, Xu L, et al. Safety and short-term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993; 4:781-8.

4. Jiao S, Acsadi G, Jani A, Felgner PL, Wolff JA. Persistence of plasmid DNA and expression in rat brain cells in vivo. *Exp Neurol* 1992; 115:400-13.

5. Hazinski TA, Ladd PA, DeMatteo CA. Localization and induced expression of fusion genes in the rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;4:206-9.

6. Middleton PG, Caplen NJ, Gao X, Huang L, Gaya H, Geddes DM, et al. Nasal application of the cationic liposome DC-Chol:DOPE does not alter ion transport, lung function or bacterial growth. *Eur Respir J* 1994; 7:442-5.

7. Food and Drug Administration (FDA) web page. Available from: URL: <http://www.fda.gov/>
8. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) web page. Available from: URL: <http://www.emea.eu.int/>
9. Public Medline, National Library of Medicine, web page. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>
10. DNA Vaccine web page. Available from: URL: <http://dnavaccine.com/>
11. Medscape web page. Available from: URL: <http://www.medscape.com/>
12. Ulmer JB. An update on the state of the art of DNA vaccines. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2001; 4:192-7.
13. Vical Incorporated web page. Available from: URL: <http://www.vical.com/>
14. Scdegah M, Hedstrom R, Hobart P, Hoffman SL. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9866-70.
15. Ishii N, Fukushima J, Kaneko T, Okada E, Tani K, Tanaka SI, et al. Cationic liposomes are a strong adjuvant for a DNA vaccine of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13:1421-8.
16. Thompson JA, Figlin R, Galanis E, Bulowski R, Gillespie D, Selk L. Phase II trial of plasmid DNA/lipid (Leuvectin). Immunotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC). Abstract # 1662 from the American Society of Clinical Oncology Annual Meetings. Available from: URL: <http://www.asco.org/>
17. Weber J. Cancer vaccines: changing of the guard. American Society of Clinical Oncology 35<sup>th</sup> Annual Meeting. Day 4. May 18, 1999. Available from: URL: [http://www.medscape.com/medscape/cno/1999/ASCO/Story.cfm?story\\_id=672](http://www.medscape.com/medscape/cno/1999/ASCO/Story.cfm?story_id=672)
18. Hersh EM, Stopeck AT, Klasa R. Allovectin-7 (HLA-B7/b2M plasmid DNA/lipid complex) therapy in metastatic malignant melanoma, phase II studies [Abstract 1658]. 34th Annual ASCO Meeting, Los Angeles, CA, 1998. Available from: URL: <http://www.asco.org/cgi-bin/profabstracts.pl?absno=1658&div=ibt&year=98abstracts>.
19. Business Journals. Available from: URL: <http://seattle.bcentral.com/seattle/stories/2000/12/18/daily18.html>
20. Targeted genetics (TGEN) presents additional preclinical data from program in metastatic cancer. Biospace. Available from: URL: [http://www.biospace.com/news\\_story.cfm?StoryId=4491904](http://www.biospace.com/news_story.cfm?StoryId=4491904)
21. Valentis incorporated web page. PRNewswire. Available from: URL: [http://www.valentis.com/investors/pr\\_02-15-2001.html](http://www.valentis.com/investors/pr_02-15-2001.html)
22. Valentis incorporated web page. PRNewswire. Available from: URL: [http://www.valentis.com/investors/pr\\_04-19-2001.html](http://www.valentis.com/investors/pr_04-19-2001.html)
23. Valentis incorporated web page. PRNewswire. Available from: URL: [http://www.valentis.com/investors/pr\\_11-10-1999.html](http://www.valentis.com/investors/pr_11-10-1999.html)
24. Valentis incorporated web page. PRNewswire. Available from: URL: [http://www.valentis.com/investors/pr\\_11-23-1999.html](http://www.valentis.com/investors/pr_11-23-1999.html)
25. Hanissian J. Emerging HPV vaccines. Available from: URL: <http://www.medscape.com/SCP/IIIM/1997/v14.n04/m3105.hanissian/m3105.hanissian.html>
26. Huang L. Novel non-viral vectors for gene therapy. Controlled Release Society Workshop: Liposomal Therapeutics: Gene Therapy and More; 2000 Jul 8-9; Paris, France.
27. Hobart PM, Margalith M, Parker SE, Khatibi S. Cancer treatment method utilizing plasmids suitable for IL-2 expression. United States Patent 6,147,055 Noviembre 14, 2000.
28. Rini BI, Selk LM, Vogelzang NJ. Phase I study of direct intrasplenic gene transfer of HLA-B7 into intral millenium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 2001;12: 861-70. metastatic renal carcinoma lesions. *Clin Cancer Res* 1999; 5:2766-72.
29. Whitmore M, Li S, Huang L. LPD lipopolyplex initiates a potent cytokine response and inhibits tumor growth. *Gene Ther* 1999; 6: 1867-75.
30. Bossart J, Pearson B. Commercialization of gene therapy- evolution of licensing and rights issues. *Trends Biotechnol* 1995; 13: 290-4.
31. Fons MP. The intellectual property landscape in the field of plasmid-based gene therapy. *J Drug Target* 2000; 7:407-11.
32. Nishikawa M, Huang L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 2001;12:861-70.
33. Morse MA. Technology evaluation: gene therapy (IL-2), Valentis Inc. *Curr Opin Mol Ther* 2000;2:448-52.
34. Felgner PL, Tsai YJ, Sukhu L, Wheeler CJ, Manthorpe M, Marshall J, et al. Improved cationic lipid formulations for *in vivo* gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1995;772:126-39.
35. Felgner PL. Improvements in cationic liposomes for *in vivo* gene transfer. *Hum Gene Ther* 1996;7: 1791-3.
36. Felgner PL. Nonviral strategies for gene therapy. *Sci Am* 1997; 276: 102-6.
37. Behr JP. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconj Chem* 1994; 5:382-9.
38. Remy JS, Sirlin C, Vierling P, Behr JP. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconj Chem* 1994; 5:647-54.
39. Gao X, Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther* 1995;2:710-22.
40. Hong K, Zheng W, Baker A, Papahadjopoulos D. Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly (ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient *in vivo* gene delivery. *FEBS Lett* 1997; 400:233-7.
41. Liu F, Yang J, Huang L, Liu D. New cationic lipid formulations for gene transfer. *Pharm Res* 1996; 13:1856-60.
42. Hofland HE, Shephard L, Sullivan SM. Formation of stable cationic lipid/DNA complexes for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7305-9.
43. Shangguan T, Cabral-Lilly D, Purandare U, Godin N, Ahl P, Janoff A, et al. A novel N-acyl phosphatidylethanolamine-containing delivery vehicle for spermine-condensed plasmid DNA. *Gene Ther* 2000; 7:769-83.
44. Bailey AL, Sullivan SM. Efficient encapsulation of DNA plasmids in small neutral liposomes induced by ethanol and calcium. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1468:239-52.
45. Barron LG, Gagne L, Szoka FC Jr. Lipoplex-mediated gene delivery to the lung occurs within 60 minutes of intravenous administration. *Hum Gene Ther* 1999; 10:1683-94.
46. Parker SE, Ducharme S, Norman J, Wheeler CJ. Tissue distribution of the cytofectin component of a plasmid-DNA/cationic lipid complex following intravenous administration in mice. *Hum Gene Ther* 1997; 8:393-401.
47. Loisel S, Le Gall C, Doucet L, Ferec C, Floch V. Contribution of plasmid DNA to hepatotoxicity after systemic administration of lipoplexes. *Hum Gene Ther* 2001; 12:685-96.
48. Janoff AS. Novel modular fusogenic delivery systems for condensed plasmid DNA. Controlled Release Society Workshop: Liposomal Therapeutics: Gene Therapy and More; 2000 Jul 8-9; Paris, France.
49. Maruyama K, Ishida O, Takizawa T, Moribe K. Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 40:89-102.
50. Hwang SH, Hayashi K, Takayama K, Maitani Y. Liver-targeted gene transfer into a human hepatoblastoma cell line and *in vivo* by sterylglucoside-containing cationic liposomes. *Gene Ther* 2001; 8:1276-80.
51. Seol JG, Heo DS, Kim HK, Yoon JH, Choi BI, Lee HS, et al. Selective gene expression in hepatic tumor with trans-arterial delivery of DNA/liposome/transferrin complex. *In Vivo* 2000; 14:513-7.
52. Maurer N, Mori A, Palmer L, Monck MA, Mok KW, Mui B, et al. Lipid-based systems for the intracellular delivery of genetic drugs. *Mol Membr Biol* 1999;16:129-40.