DESARROLLO DE UN AGENTE DE TRANSFECCIÓN BASADO EN LÍPIDOS CATIÓNICOS

E. Elhalem[1], J. Morrone[2], S. Reidel[3], M. Ciarlantini[1], R. P. Gauna[2], V. Zannoni[2], L. Gandolfi Donadío[1], L. Pozo[4], V. Cesa[5], L. Matos[3], M. Blasco[3], M.V. Defain Tesoriero[2], M.J. Comin[1]
Programa de Fortalecimiento de la Cadena de Valor de la Industria Farmacéutica y Farmoquímica
(1) Laboratorio de Síntesis Orgánica-INTI Química, (2) Laboratorio de Sístemas de liberación controlada-INTI Química, (3) INTI-Biotecnología, (4) INTI-Gerencia de Desarrollo, (5) INTI-Economía Industrial
eelhalem@inti.gob.ar

Introducción

DMRIE (bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxietilamonio), es un lípido catiónico utilizado en formulaciones liposomales para la transfección de ácidos nucleicos (ADN, ARN) en células eucariotas.

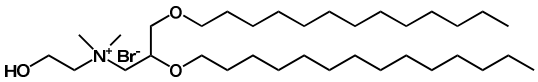


Figura 1: Estructura de DMRIE

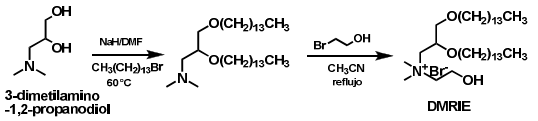
El único proveedor de este compuesto es la empresa Thermo Fisher Scientific, que lo comercializa para aplicaciones de I+D como agente de transfección en células animales, como una suspensión acuosa de concentración no informada de una mezcla 1:1 (m/m) de DMRIE con colesterol bajo el nombre comercial DMRIE-C. Este reactivo sirve tanto para aplicaciones *in vitro* como para terapia génica por lo que, con el advenimiento de nuevas tecnologías de edición génica, se posiciona como un reactivo de alto potencial comercial.
El proyecto planteado se caracteriza por su carácter interdisciplinario ya que involucra a 3 laboratorios del PTM.

Objetivo

General: Desarrollar productos con potencial de transferencia para aplicaciones de investigación científico-tecnológica (básica, aplicada, clínica) e industria farmacéutica.
Específico: Desarrollar un reactivo de transfección basado en DMRIE como producto comercial para la sustitución de importaciones.

Descripción

Síntesis de DMRIE.
Se sintetizó DMRIE en dos pasos a partir de materiales de partida y reactivos comercialmente asequibles (Kasireddy *et al*, 2004; Arpicco *et al*, 2004).



Esquema 1: Síntesis de DMRIE-INTI

Los dos pasos de reacción fueron optimizados variando la temperatura, el tiempo, el solvente, los equivalentes de cada reactivo y el orden de agregado.

Preparación de liposomas catiónicos. Caracterización fisicoquímica y morfológica.
Los liposomas fueron preparados de acuerdo al método de hidratación de la película delgada empleando DMRIE y colesterol (relación molar 1:1) y su concentración fue de 5 a 40 mM. La película lipídica se hidrató en buffer Hepes 20 mM con 10 mM de NaCl con agitación magnética. Los liposomas multilamelares resultantes se extruyeron a través de membranas de poro definido de 0,1 µm (NucleoporeTM). Dicha extrusión se realizó con un extrusor manual Miniextruder® (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, E.U.A.) (Hirsch-Lerner *et al*, 2005). Las suspensiones de liposomas se caracterizaron mediante el diámetro medio de tamaño de partícula (Z-Ave) y el índice de polidispersidad (PdI) por dispersión dinámica de luz. El potencial Z se determinó por análisis en fase de scattering de luz. Dichas determinaciones se realizaron en un Zetasizer Nano ZS (Malvern®, Reino Unido) a 25°C en solución de buffer Hepes 20 mM con 10 mM de NaCl. La morfología de los liposomas catiónicos se estudió por Microscopía de doble haz FIB/SEM (FEI Helios Nanolab 650).

Preparación y evaluación *in vitro* de Lipoplex (complejos liposomas-DNA).

La preparación del lipoplex se realizó según el protocolo DMRIE-C Reagent (Thermofisher®; https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/dmriec_man.pdf) utilizando las combinaciones de liposoma: ADN correspondientes a un experimento factorial completo cuyos factores fueron cantidad de liposomas (6 o 12 µL), cantidad de ADN (0,4 o 0,6 µg) y tamaño de liposomas (100 o 400 nm).
La citotoxicidad se evaluó de manera cualitativa utilizando una tabla propuesta por la norma ISO 10993-5:2009 que relaciona características citopáticas observadas al microscopio con grados de reactividad. Por otro lado, la transfección de la células CHO fue realizada con el plásmido pEGFP C1 (Clontech) en las condiciones de la Tabla 2, con 24 hs. de

contacto y analizada mediante microscopía de fluorescencia luego de 24 hs. de cultivo sin lipoplex (Bing HU *et al*, 2012).

Resultados

Síntesis de DMRIE.

La síntesis de DMRIE se llevó a cabo en escala multigramo con un rendimiento global del 30%. DMRIE se caracterizó por espectroscopía de RMN y MASA. La pureza se determinó por técnicas de RMN. El proceso desarrollado es potencialmente escalable.

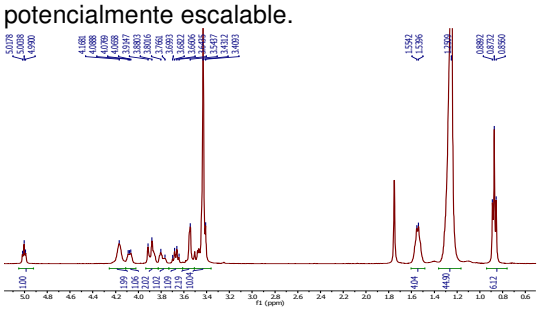


Figura 2: Espectro RMN-^{1}H (400 MHz) de DMRIE

Preparación de liposomas catiónicos. Caracterización fisicoquímica y morfológica.

Se lograron obtener liposomas catiónicos. Como puede observarse en la Tabla 1, el ZAve fue aproximadamente de 100 nm y se observó baja polidispersión (PdI < 0,1). El potencial Z fue mayor a 30, valor que se correlaciona con la estabilidad física que presentan estos liposomas en fase acuosa.

Tabla 1: Caracterización fisicoquímica de los liposomas cationicos

Z-Ave nm	PdI Width nm	PdI	Pot Z mV
138 (5)	35 (5)	0,068 (0,038)	50 (15)

Nota: el desvío estándar fue indicado entre paréntesis.
Z-Ave: Tamaño medio de partícula. PdI width: ancho de coeficiente de polidispersidad. PdI: Coeficiente de polidispersidad. Pot Z: Potencial Z.

En la Figura 4 puede observarse la morfología y la homogeneidad de los liposomas catiónicos.

Figura 4: Imagen de microscopía de doble haz FIB/SEM de liposomas catiónicos con una magnificación de 37.000 (Izq.) y 150.000 (Der.).

Preparación y evaluación *in vitro* de Lipoplex (complejos liposomas-DNA).

La evaluación del efecto citopático mediante un diseño factorial completo (2^3; Tabla 2), indicó que el factor "tamaño de liposomas" fue el que presentó el mayor efecto (90%) en esta respuesta.

Tabla 2: Evaluación de efecto citopático.

Muestra	Grado	Reactividad
Liposoma (+) ADN (-)	1	Escasa
Liposoma(-)ADN(+)	0	Ninguna
DA-0,4-6-100	3	Moderada
DA-0,4-6-400	4	Severa
DA-0,4-12-100	2	Leve
DA-0,4-12-400	4	Severa
DA-0,6-6-100	3	Moderada
DA-0,6-6-400	4	Severa
DA-0,6-12-100	2	Leve
DA-0,6-12-400	4	Severa

Nota: Las muestras fueron codificadas como DA- "volumen de liposomas en µl"-"cantidad de ADN en µg"-"tamaño de liposomas en nm".

En cuanto a la transfección, si bien resultó positiva para GFP en todas las condiciones, la eficiencia de transfección aparente resultó baja en todos los casos (Figura 5).

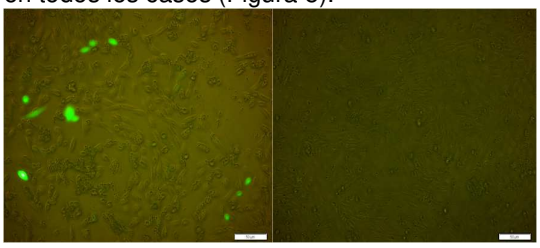


Figura 5: Izq. Campo claro + fluorescencia de DA-0,6-12-100. Der. Campo claro + fluorescencia del control negativo (ADN (-) Liposoma 0,168 mM (+))

Conclusiones

Los liposomas catiónicos preparados con el DMRIE sintetizado resultaron efectivos en la transfección de células CHO mediante un protocolo canónico de transfección. La proyección de este desarrollo es aplicar un diseño experimental para optimizar la combinación de características físicas y condiciones de transfección para maximizar la eficiencia de transfección. Adicionalmente, se propone evaluar las variables críticas del proceso de síntesis y preparación de liposomas catiónicos para poder realizar el cambio de escala.

Bibliografía

- Arpicco S. *et al.* (2004). Synthesis, characterization and transfection activity of new saturated and unsaturated cationic lipids. *IL FARMACO*, *59,* 869-878.
- Bing HU *et al.* (2012). The improvement of liposome-mediated transfection of pEGFP DNA into human prostate cancer cells by combining low-frequency and low-energy ultrasound with microbubbles. *Oncology Reports*, *27*, 475-480.
- Hirsch L. *et al.* (2005). Effect of "helper lipid" on lipoplex electrostatics. *Biochimica et Biophysica Acta, 1714*, 71-84.
- Kasireddy K. *et al.* (2004). Synthesis of novel cationic cardiolipin analogues for the optimal delivery of therapeutic agents. *Tetrahedron Letters*, *45*, 2743-2746.