



# Solid lipid nanoparticles for gene therapy

**Title in Spanish:** *Nanopartículas sólidas lipídicas para terapia génica*

Alicia Rodríguez Gascón<sup>1,\*</sup>, M.<sup>a</sup> Ángeles Solinís Aspiazú<sup>1</sup>, Ana del Pozo Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Farmacia, Centro de investigación Lascaray ikergunea, Grupo Farmacocinética, Nanotecnología y Terapia Génica (FarmaNanoGene), Universidad del País Vasco UPV/EHU.

**ABSTRACT:** Gene therapy is a rapidly advancing field with great potential for the treatment of genetic and acquired systemic diseases. This therapy requires the introduction of foreign genetic material in the target cells to modify a genetic sequence. Viral vectors are the most effective, but their application is limited by their immunogenicity, oncogenicity and the small size of the DNA they can transport. Non-viral vectors, however, are safer, lowered cost, and more reproducible and do not present DNA size limit. The main problem of non-viral systems is their low transfection efficiency, although it has improved during the last years. This review presents the contribution of our research group to the design and evaluation of SLNs based non-viral vectors for gene transfer. We report our studies about the relationship between formulation factors and cell uptake and intracellular trafficking of the genetic material, very important for transfection. We have shown, for the first time, the ability to induce transgene protein expression of the SLNs after endovenous administration to mice. This revision also reports our work about the potential application of SLNs to the treatment of infectious and rare diseases, as the X-linked juvenile retinoschisis, a retinal disorder due to a deficiency in the protein retinoschisin, and characterized by poor eyesight and degeneration of the retina. The intraocular injection of SLNs bearing the gene that encodes retinoschisin to diseased mice led to the partial recovery of the retina. All together, our results show the potential of SLNs as a system for gene delivery.

**RESUMEN:** La terapia génica consiste en la administración de ácidos nucleicos con el fin de modular la expresión de proteínas específicas y revertir así una enfermedad. Es una nueva área de la medicina con gran potencial para el tratamiento de enfermedades tanto hereditarias como adquiridas. Hasta ahora, los sistemas virales de administración de ácidos nucleicos han resultado eficaces, pero presentan importantes problemas de seguridad. Los vectores no virales, en cambio, son más seguros pero menos eficaces, aunque su eficacia ha aumentado significativamente en los últimos años. Esta revisión recoge la contribución de nuestro grupo de investigación al diseño de vectores no virales basados en nanopartículas sólidas lipídicas (SLNs) para terapia génica. Hemos estudiado la relación entre factores de la formulación con los procesos de internalización y disposición intracelular del material genético, que condicionan la eficacia de transfección, y por primera vez demostramos la capacidad de las SLNs para inducir la síntesis de una proteína tras su administración endovenosa a ratones. Esta revisión también recoge nuestros trabajos sobre la aplicación de las SLNs en el tratamiento de enfermedades infecciosas y enfermedades raras, como la retinosquisis juvenil ligada al cromosoma X, enfermedad en la que la retina está desestructurada debido a la deficiencia de la proteína retinosquisina. La administración de SLNs con el gen que codifica esta proteína en un modelo animal de esta enfermedad indujo la recuperación estructural de la retina. Los trabajos aquí recogidos muestran el gran potencial de las SLNs como sistemas de administración de ácidos nucleicos.

\*Corresponding Author: alicia.rodriguez@ehu.es

Received: October 28, 2016 Accepted: February 13, 2017

Premio "Real Academia Nacional de Farmacia" del Concurso científico 2016 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 4 (2016), pp. 408-423

Language of Manuscript: Spanish

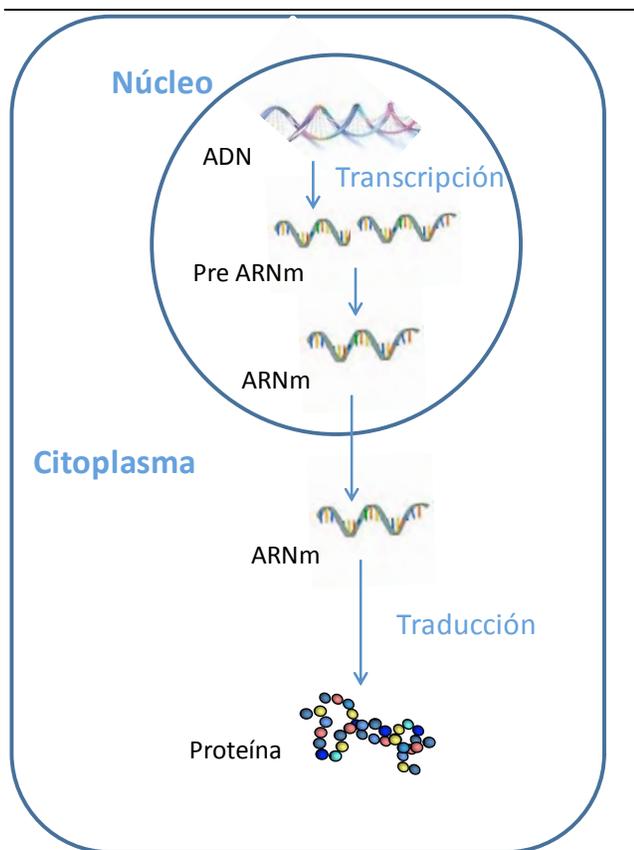
## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, debido a la descodificación del genoma humano y los continuos avances en biotecnología, la terapia génica ha emergido como una prometedora herramienta terapéutica basada en la utilización de ácidos nucleicos para modificar la expresión de proteínas que están alteradas en determinadas enfermedades. Según la Agencia Europea del Medicamento (EMA), un producto

terapéutico basado en terapia génica consiste en un vector o sistema de administración que contiene un constructo genético para expresar una secuencia terapéutica o una proteína específica responsable de la regulación, reparación, adición o delección de una secuencia genética determinada (1). Son muchas las patologías que pueden ser potencialmente tratadas con terapia génica, desde enfermedades de tipo genético hasta otras como el cáncer

o el SIDA. El primer producto de terapia génica aprobado en Europa por la EMA, denominado Glybera<sup>®</sup>, está indicado para el tratamiento de la deficiencia familiar de la lipoproteinlipasa, un raro trastorno autosómico recesivo, y que produce un retraso en el metabolismo de los quilomicrones. La acumulación de quilomicrones en el plasma causa accesos recidivantes de pancreatitis, que habitualmente comienzan en la infancia.

En la expresión de los genes que codifican las proteínas en células eucariotas intervienen varios procesos (figura 1): síntesis de un pre ARN mensajero (ARNm), que a su vez se transforma en un ARNm, que sale del núcleo de la célula al citoplasma, donde se produce el proceso de traducción mediante el cual se sintetizan las proteínas. La interferencia de alguno de estos procesos puede dar lugar a un cambio en la expresión de las proteínas (2). La introducción en la célula de una secuencia genética para modificar artificialmente la expresión de un determinado gen (incrementar o bloquear) se conoce como transfección.



**Figura 1. Procesos implicados en la expresión génica en células eucariotas.**

El proceso de transfección para modificar la expresión génica de una célula se puede conseguir con la administración de ADN o ARN exógeno. La terapia génica con ARN está ganando un gran interés en los últimos años. La administración de ARNm (3) generalmente da lugar niveles de transfección mayores que el ADN, ya que no tiene que llegar al núcleo de la célula, uno de los pasos limitantes para la transfección; sin embargo, la duración

del efecto es menor, lo que puede limitar su aplicación terapéutica (4), aunque sí puede llegar a ser más útil en vacunación (5,6). Si lo que se pretende es bloquear en lugar de inducir la expresión de un gen, el ARN de interferencia (ARNi) ofrece la posibilidad de silenciar genes de forma específica. Este proceso se basa en la utilización de “short interfering” RNA (siARN), que son secuencias cortas de ARN de doble cadena de 21 nucleótidos capaces de interactuar de forma específica y bloquear el ARNm (7). El siARN puede ser introducido en la célula como tal, o bien puede utilizarse lo que se conoce como “short hairpin” ARN (shARN), que es un plásmido de ADN que lo codifica e induce su formación en el interior de la célula (8). Otra forma de ARNi es la utilización de micro ARN (miARN), que están constituidos por ARN de cadena simple de entre 19-25 nucleótidos originados a partir de la transcripción de un gen, de tal forma que se unen al ARNm e inducen su destrucción o la inhibición de la síntesis de la proteína correspondiente (9).

Una vez administrados, los ácidos nucleicos son eliminados del organismo muy rápidamente; además tienen grandes dificultades para atravesar las membranas celulares para acceder al citoplasma de las células diana. Por ello, un aspecto fundamental para el éxito de la terapia génica es la utilización de un sistema de administración eficaz y seguro (10), que proteja al material genético de la degradación, facilite su internalización en las células, y lo libere en su interior. Los sistemas de administración se clasifican en dos grandes grupos: vectores virales y no virales (11). Los vectores virales se preparan a partir de virus que han sido modificados mediante ingeniería genética de modo que permiten la expresión del gen que portan en las células diana, pero que no son capaces de replicarse en ellas (12). Los vectores virales permiten alcanzar eficacias de transfección altas; sin embargo presentan importantes limitaciones debido al potencial oncogénico e inmunogénico (por las proteínas víricas). Otro problema de los vectores virales es la incapacidad de incorporar ácidos nucleicos de elevado tamaño. Los sistemas virales más utilizados en terapia génica son los virus adenoasociados, adenovirus, retrovirus y lentivirus (13-15). Los vectores no virales, en cambio, son sistemas más seguros, y su fabricación a gran escala es más sencilla, más barata y más reproducible; además, no presentan ninguna limitación en cuanto al tamaño del material genético que pueden incorporar. Sin embargo, la eficacia de transfección de los vectores no virales es menor que la de los vectores virales, aunque en los últimos años ha mejorado significativamente. De hecho, se ha incrementado el número de ensayos clínicos que utilizan este tipo de vectores (16). Son numerosos los sistemas no virales que se pueden utilizar en terapia génica (17), incluyendo sistemas físicos, como la electroporación (18) o la inyección hidrodinámica (19), y los sistemas químicos. Estos últimos pueden estar compuestos por péptidos (20), polímeros (21), lípidos (22), o combinaciones entre ellos. Es importante que estos

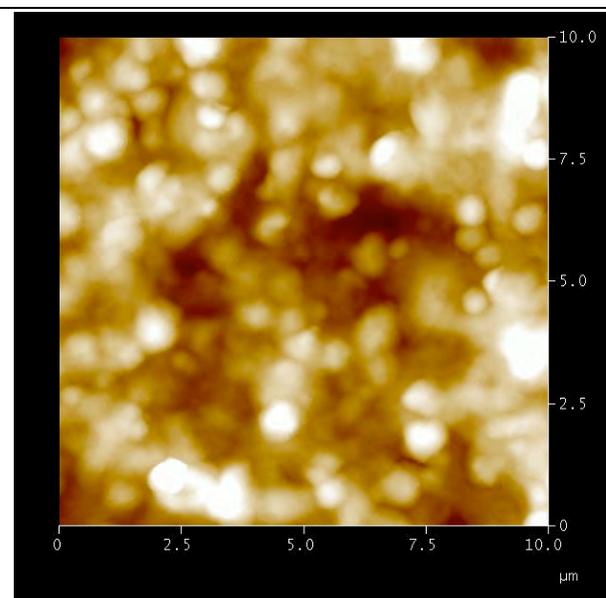
materiales sean biocompatibles y biodegradables. Entre los sistemas lipídicos más utilizados para terapia génica están las nanopartículas sólidas lipídicas (SLNs), que en los últimos años han demostrado un gran potencial como sistemas de administración de ácidos nucleicos.

## 2. NANOPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS (SLNs) COMO SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA TERAPIA GÉNICA

Las SLNs son partículas esféricas en el rango de los nanómetros formadas por un núcleo lipídico sólido rodeado de una capa de tensioactivos. Están constituidas por lípidos fisiológicos muy bien tolerados, frecuentemente aprobados para uso farmacéutico (23), lo que les confiere ventajas desde el punto de vista de la seguridad. Fueron inicialmente diseñadas como sistemas de administración de fármacos debido a su capacidad de proteger las sustancias activas frente a la degradación, a la posibilidad de modular el perfil de liberación, a su estabilidad, y a la posibilidad de ser sometidas a procesos de esterilización y liofilización (24-26). Actualmente se considera a las SLNs uno de los sistemas más prometedores para la administración de ácidos nucleicos (27-29), tanto en estudios *in vitro* (30-32) como *in vivo* (33-35). Además, con relación a otros vectores no virales, presentan importantes ventajas, ya que, debido a su composición, son bien toleradas fisiológicamente, presentan una buena estabilidad a largo plazo, se pueden preparar con metodologías sencillas y pueden ser sometidas a procesos de esterilización y liofilización (36). En nuestro grupo de investigación trabajamos en el diseño y evaluación de vectores no virales a base de SLNs para terapia génica. En la figura 2 se recoge una fotografía de SLNs preparadas en nuestro laboratorio obtenida mediante microscopía de fuerza atómica.

Las SLNs para terapia génica se suelen preparar con lípidos catiónicos, cuyas cargas positivas interaccionan con las cargas negativas de los ácidos nucleicos, de tal forma que estos quedan adsorbidos sobre la superficie de la nanopartícula. Además, los lípidos catiónicos utilizados para preparar las SLNs para terapia génica deben actuar también como tensioactivos para favorecer la formación de una emulsión inicial, que es el primer paso para la elaboración de las SLNs. La unión del ácido nucleico a la nanopartícula facilita su movilidad a nivel intracelular y le confiere protección frente a la degradación enzimática. La relación entre el material genético y las SLNs es fundamental para que el vector final tenga las características adecuadas para la transfección, de tal manera que debe existir un equilibrio entre la capacidad de condensación del material genético, que debe ser suficiente para que quede protegido, pero no excesiva para no impedir su liberación en el citoplasma de la célula diana. Normalmente los vectores tienen carga superficial neta positiva para facilitar la interacción con la superficie celular, cargada negativamente, y su posterior entrada en la

célula.



**Figura 2. Imagen de SLNs obtenida por microscopía de fuerza atómica.**

## 3. BARRERAS PARA LA TRANSFECCIÓN

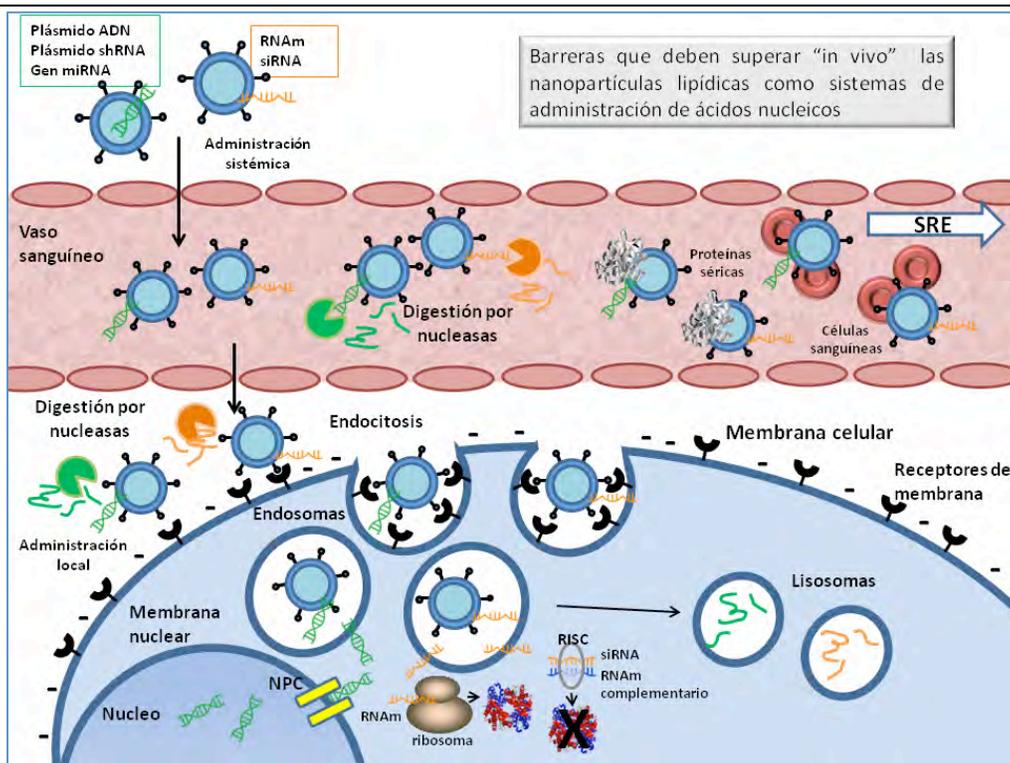
Los ácidos nucleicos deben superar una serie de barreras hasta alcanzar el lugar de acción (el citoplasma en el caso del ARN, o el núcleo en el caso del ADN): estabilidad en el medio extracelular, paso a través de la membrana celular, difusión intracelular, e internalización en núcleo. En la figura 3 se recoge un esquema con los pasos limitantes del proceso de transfección tras la administración sistémica de ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos son muy sensibles a la acción de las nucleasas, por lo que una vez administrados se degradan rápidamente, y el tiempo de residencia en el organismo es muy corto (37). Por ello, uno de los objetivos de la utilización de sistemas nanoparticulados es la protección frente a las nucleasas. Como se ha comentado anteriormente, el material genético generalmente se condensa sobre la superficie de la nanopartícula, lo que le proporciona estabilidad frente a la degradación. Tras la administración sistémica, puede haber una interacción con componentes sanguíneos, como las proteínas séricas, lo que da lugar a la formación de agregados que son eliminados por el sistema retículo endotelial, o retenidos a nivel pulmonar (37).

Una vez que el material genético llega a la célula, debe ser capaz de atravesar la membrana celular y acceder al citoplasma. Los ácidos nucleicos, debido a su tamaño y a las cargas negativas, tienen grandes dificultades para ser captados por la célula, por lo que la utilización de nanopartículas con carga superficial positiva facilita este proceso. Mediante interacciones electrostáticas, las cargas positivas de las nanopartículas interaccionan con las cargas negativas de la membrana celular, iniciándose el proceso de endocitosis, el principal mecanismo de internalización (38). Son varios los mecanismos de endocitosis que los

vectores pueden utilizar para penetrar en las células: macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolas, endocitosis dependiente

de flotilina, etc. (39), de tal forma que intervendrá un mecanismo u otro según el tipo de célula y el tipo de vector.



**Figura 3. Principales barreras para la transfección: degradación enzimática, agregación y opsonización, paso a través de la membrana celular, degradación lisosomal, liberación del vector, entrada en el núcleo.** NPC: complejo de poros nucleares, RISC: “RNA-induced silencing complex”, SER: sistema retículo endotelial.

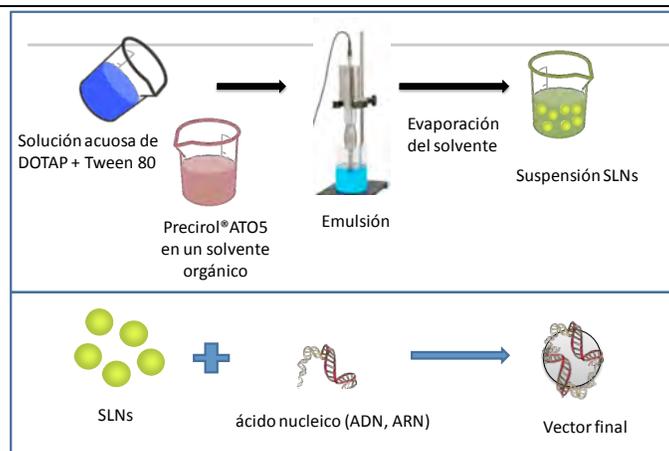
Una vez en el interior de la célula, el vector queda incluido en un endosoma que se puede fusionar con los lisosomas, formándose un endolisosoma, en el que la presencia de enzimas hidrolíticas hace que los ácidos nucleicos se puedan degradar. Por ello, es conveniente que el vector permanezca poco tiempo en el interior del endosoma, es decir, se debe favorecer el escape endosomal. La utilización de sustancias como DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina), colesterol, cloroquina, o algunos péptidos (GALA, KALA) favorecen el escape endosomal y por lo tanto la transfección (12). Existe también la posibilidad de preparar vectores capaces de proteger el material genético frente a la degradación lisosomal, de tal forma que la fusión del endosoma con el lisosoma no necesariamente conduzca a la inhibición de la transfección (40).

En el caso de ADN, una vez en el citoplasma debe ser capaz de atravesar la membrana nuclear y acceder al núcleo. Este es un paso limitante debido a que la membrana nuclear es una barrera selectiva para moléculas de tamaño superior a 40 kDa, como son las moléculas de ADN. La entrada en el núcleo puede llevarse a cabo a través de dos mecanismos: durante la mitosis, ya que disminuye el efecto barrera de la membrana, o a través de los llamados complejos de poros nucleares (nuclear pore

complex, NPC). Por ello, una estrategia para incrementar la entrada al núcleo es incorporar péptidos que porten secuencias de señalización nuclear, como es el caso de la protamina, que tiene secuencias de 6 argininas consecutivas que actúan como secuencias de señalización nuclear (41). Este péptido ha demostrado su capacidad de mejorar el proceso de transfección gracias a su capacidad de favorecer la entrada del material genético al núcleo celular (42).

#### 4. DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE SLNs PARA TERAPIA GÉNICA: INFLUENCIA DE FACTORES RELACIONADOS CON LA FORMULACIÓN

A la hora de diseñar un vector no viral a base de SLNs, es fundamental llevar a cabo una adecuada selección de los componentes de la formulación. En uno de nuestros primeros estudios (43), evaluamos la influencia de la composición de las SLNs sobre la capacidad de transfección *in vitro*. Las SLNs se elaboraron mediante una técnica de emulsificación/evaporación del solvente, y los componentes utilizados fueron el lípido sólido Precirol® ATO5, el lípido catiónico DOTAP (dioleoil fosfatidil etanolamina), y el tensioactivo Tween 80. En la figura 4 se recoge un esquema con el método de elaboración de las SLNs empleado (44).



**Figura 4. Esquema con el método de elaboración de nuestros vectores a base de SLNs.**

El DOTAP es uno de los lípidos catiónicos más utilizados en terapia génica. Su actividad tensioactiva permite formar la emulsión inicial, y su carga positiva facilita la interacción con las cargas negativas del ADN. Por otro lado, el Tween 80 es uno de los tensioactivos más utilizados en la industria farmacéutica; además las cadenas de poli(etilenglicol) (PEG) del Tween 80 reducen la agregación de las nanopartículas, reduciendo su toxicidad y aumentando el tiempo de circulación en el organismo. En nuestro estudio, se evaluaron diferentes proporciones de DOTAP y Tween 80, siendo la proporción DOTAP 0,4% y Tween 80 0,1% la que proporcionó eficacias de transfección mayores. Otro factor a tener en cuenta a la hora de diseñar los vectores es la carga de ADN en las nanopartículas (expresada como relación entre el DOTAP y el ADN, en peso), ya que condiciona el tamaño de partícula, el potencial zeta o carga superficial, la capacidad de protección frente a desoxirribonucleasas, y la capacidad para que el ADN se libere a nivel intracelular. Utilizando el plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (pCMS-EGFP), evaluamos distintas proporciones DOTAP:ADN (entre 15:1 y 1:1) y caracterizamos los vectores en términos de tamaño de partícula, carga superficial, capacidad de unión del plásmido, capacidad de protección frente a DNasa I, capacidad de liberación, y eficacia de transfección en células HEK293 (células embrionarias de riñón humano). El tamaño, en el rango nanométrico, y la carga superficial o potencial zeta de los vectores son fundamentales para la transfección. Los vectores presentaron un tamaño de partícula que osciló entre 217 nm y 260 nm para los vectores preparados con DOTAP:ADN entre 15:1 y 4:1, y en el caso de los vectores preparados con DOTAP:ADN de 3:1, su tamaño fue mayor de 1  $\mu$ m, indicativo de la formación de agregados. En cuanto a la carga superficial, osciló entre +32 y +47 para los vectores con tamaño nanométrico; sin embargo, la carga superficial de los vectores con tamaño mayor de 1  $\mu$ m fue negativa, debido al alto contenido de ADN. La capacidad de protección del ADN se mantuvo cuando las SLNs se prepararon con proporciones DOTAP:ADN de 4:1 o superiores, y a medida que aumentaba la proporción de ADN en las

nanopartículas, la capacidad de protección disminuía. Por el contrario, para las proporciones más bajas de ADN en las SLNs, el alto grado de condensación impedía su liberación. Los estudios de transfección en HEK293 pusieron de manifiesto que la mayor eficacia de transfección se conseguía con la formulación que era capaz de condensar completamente el plásmido, lo protegía de la acción de la DNasa I, y no impedía su liberación, y nos permitió seleccionar la relación DOTAP:ADN de 5:1 para estudios posteriores. Estos resultados pusieron de manifiesto la importancia, a la hora de diseñar un vector, de conseguir un equilibrio entre estos tres procesos: unión, protección y liberación. Otra característica que deben tener los vectores para poder ser útiles en terapia génica, es la seguridad. Nuestros vectores demostraron que, una vez administrados en los cultivos celulares, no producían una disminución de la viabilidad celular.

Comprobamos la eficacia de transfección a lo largo del tiempo en dos modelos celulares: HEK293 y ARPE-19 (células humanas de epitelio pigmentado de retina). Las SLNs fueron capaces de transfectar ambas líneas celulares, aunque los niveles de transfección en las células ARPE-19 fueron menores que en las HEK293. Además, en las células HEK293, la expresión de proteína se detectó a partir de las 24 horas, mientras que en las células de retina no se detectó hasta las 72 horas. Esta diferencia en la producción de la proteína puede ser debida a las diferentes barreras que tiene que superar el ADN contenido en la nanopartícula hasta llegar al núcleo de la célula y que dependen de la formulación. Por ello, utilizando SLNs marcadas con el fluoróforo rojo NileRed, estudiamos la internalización celular en los mismos modelos celulares (38). Pudimos observar una internalización más lenta en las células ARPE-19 que en las células HEK293, lo que puede justificar el retraso en la transfección observado. Comprobamos además, que en las células HEK293, los vectores eran captados principalmente por endocitosis mediada por caveolas, mientras que en las células ARPE-19 entraban mayoritariamente por endocitosis mediada por clatrin. También encontramos diferencias en la disposición de los vectores a nivel intracelular: en las células HEK293 se encontraban distribuidos

homogéneamente por todo el citoplasma, pero en las células de retina estaban localizados en la zona correspondiente al retículo endoplasmático rugoso y al aparato de Golgi, donde son sintetizados los lisosomas. Esto demuestra que la menor transfección que se observó en las células ARPE-19 estaba asociada a la endocitosis mediada por clatrina, que conduce a los vectores hacia los lisosomas, donde el material genético se puede degradar. Otra razón que puede justificar la menor transfección de los vectores en ARPE-19 está relacionada con la entrada del ADN en el núcleo. Las células HEK293 se dividen más rápidamente que las células ARPE-19, por lo que la entrada en el núcleo será más difícil en estas últimas. Una vez caracterizados los vectores y estudiado su comportamiento intracelular, se estudió su capacidad de transfección *in vivo* (34) tras su administración por vía endovenosa a ratones Balb/c. Tras el análisis de muestras de pulmón, hígado y bazo, pudimos observar expresión de proteína en estos dos últimos órganos hasta 7 días después de la administración, pero no a nivel pulmonar.

## 5. ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LA CAPACIDAD DE TRANSFECCIÓN

### 5.1. Utilización de péptidos de penetración celular: SAP

El uso de péptidos capaces de atravesar las membranas celulares (péptidos de penetración celular o CPP) es una estrategia muy utilizada en terapia génica para incrementar la capacidad de transfección de los vectores no virales. Muchos de estos péptidos contienen aminoácidos cargados positivamente, y son hidrofóbicos, normalmente debido a una secuencia anfipática (45). Para incrementar la capacidad de transfección, incorporamos en las SLNs el péptido SAP (46), cuya secuencia es (VRLPPP)<sup>3</sup> (compuestos por tres unidades repetidas de VRLPPP; V: valina; R: arginina, L: leucina, P: prolina), que presenta ciertas ventajas sobre otros CPP debido a su origen no viral, anfipaticidad, solubilidad en agua, y a su falta de toxicidad (47). La presencia de SAP en los vectores no modificó la carga superficial pero sí el tamaño de partícula cuando la cantidad de SAP en el complejo era más elevada. Tanto en células HEK293 como en ARPE-19, la

presencia del péptido en las SLNs incrementó la capacidad de transfección de los vectores, incremento que se relacionó con el proceso de internalización, que en ambas líneas celulares se produce por endocitosis mediada por clatrina y por endocitosis mediada por caveolas. Aunque en ambos casos el SAP aumentó la transfección actuando sobre la endocitosis, el mecanismo fue diferente dependiendo de la línea celular. En las células HEK293, el incremento de la transfección se relacionó con una mayor entrada de los vectores en las células. Sin embargo, en las células ARPE-19, el SAP no modificó el grado de internalización celular. En estas células observamos que incrementaba la internalización de las SLN por endocitosis mediada por caveolas y este cambio en el mecanismo de entrada, de clatrina a caveolas, daría lugar a una reducción de la degradación lisosomal, favoreciendo la localización de los vectores en las inmediaciones del núcleo, lo que facilita su entrada en el mismo, y por tanto la transfección.

### 5.2. Utilización de péptidos con señales de internalización nuclear: protamina

Otra estrategia para incrementar la capacidad de transfección de nuestros vectores fue la incorporación en las SLNs de protamina, un péptido de señalización nuclear, que además actúa facilitando la transcripción y presenta una gran capacidad de condensación de los ácidos nucleicos, lo que favorece su protección frente a la degradación (48). Preparamos los vectores con SLNs y diferentes proporciones de protamina (40) y comprobamos como la capacidad para incrementar la transfección dependía de la línea celular. En las células HEK293, contrariamente a lo esperado inicialmente, la capacidad de transfección disminuía a medida que aumentaba la proporción de protamina en las nanopartículas. En cambio, en las células ARPE-19, la protamina incrementaba la transfección cuando se utilizaba en una proporción determinada, por encima de la cual, la transfección disminuía. En la figura 5 se recoge una gráfica con los niveles de transfección de las formulaciones de SLNs con diferente proporción de protamina en las células HEK293 y ARPE-19.

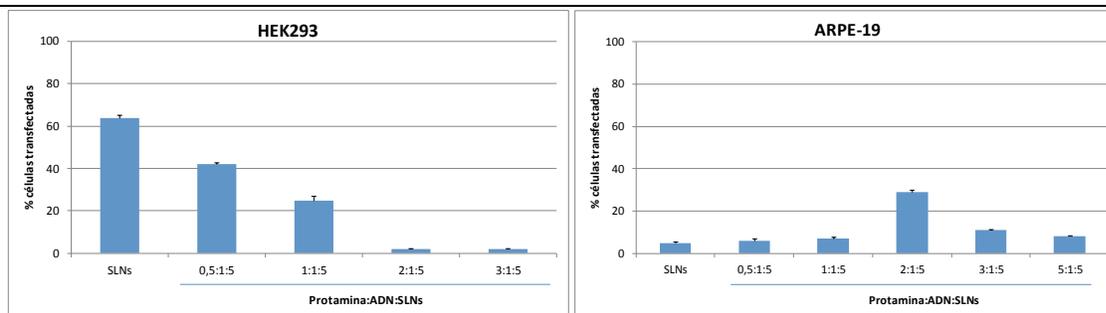


Figura 5. Porcentaje de transfección de células HEK293 y ARPE-19 tratadas con los vectores preparados con SLNs y diferentes proporciones de protamina.

Los estudios de internalización celular mostraron la falta de correlación entre la entrada en la célula del vector y el nivel de transfección. En células HEK293, los vectores entran mayoritariamente por endocitosis mediada

por caveolas, independientemente de la presencia o no de protamina. Sin embargo, en las células de retina la protamina indujo un cambio en el mecanismo de internalización, pasando de endocitosis mediada por

caveolas a endocitosis mediada por clatrin. Si tenemos en cuenta que la endocitosis mediada por clatrin conduce el vector hacia los lisosomas, podemos deducir que es la actividad lisosomal la que favorecería la liberación del ADN de las SLNs, donde se encuentra fuertemente unido debido a la alta capacidad de condensación de la protamina. La falta de actividad lisosomal de la vía caveolar justifica la disminución de la eficacia transfección de las células HEK293 a medida que aumenta la proporción de protamina en el vector. El efecto de la protamina disminuyendo la eficacia de transfección de los vectores en células HEK293 revela que la introducción en la formulación de algún componente para salvar uno de los pasos limitantes del proceso de transfección no siempre asegura un incremento en la eficacia porque puede suceder que otro de los pasos del proceso de transfección se vea perjudicado. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la evaluación de los mecanismos de internalización y disposición intracelular de los vectores para optimizar la formulación, teniendo en cuenta además la célula diana que se pretende transfectar.

### 5.3. Utilización de polisacáridos

#### 5.3.a. Dextrano

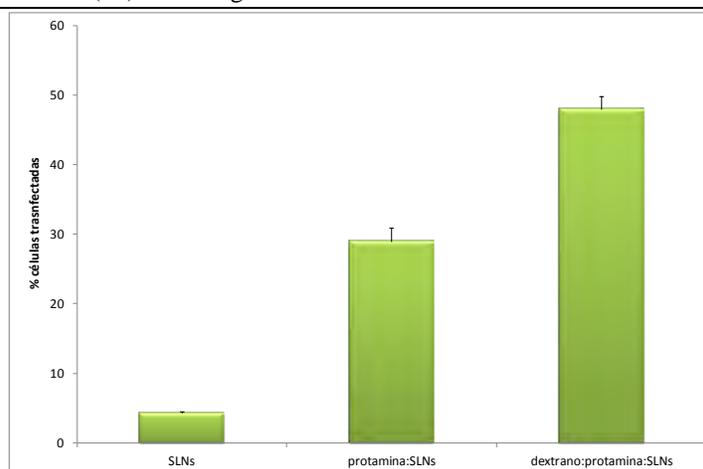
Otra opción para incrementar la eficacia de las SLNs es incorporar en la formulación polisacáridos aniónicos. Una vez conocido el efecto de la protamina sobre la eficacia de transfección y su relación con la actividad lisosomal, incorporamos dextrano en las SLNs debido a que favorece la endocitosis mediada por clatrin (49). En la figura 6 se

recoge una fotografía de los vectores preparados con dextrano y protamina obtenida por microscopía electrónica de transmisión.



**Figura 6. Fotografía de vectores preparados con dextrano:protamina:ADN:SLNs obtenida por microscopía electrónica de transmisión.**

Los estudios de transfección mostraron que la presencia de dextrano en las nanopartículas incrementaba significativamente la eficacia de transfección en ARPE-19. En la figura 7 se recoge la eficacia de transfección de células ARPE-19 tratadas con vectores preparados con SLNs, protamina y dextrano.



**Figura 7. Transfección in vitro de células ARPE-19 tratadas con vectores no virales preparados con SLNs, protamina y dextrano.**

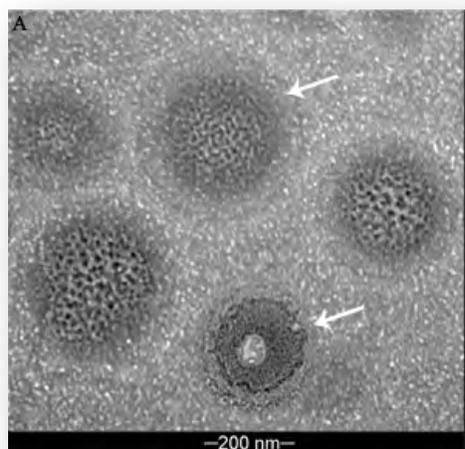
Estos resultados demuestran el potencial de este vector como sistema de administración de material genético para tratamientos a base de terapia génica. Además, se comprobó que no tiene actividad hemolítica y que no induce aglutinación de glóbulos rojos (49), lo que demuestra su biocompatibilidad. La administración endovenosa a ratones Balb/c indujo transfección a nivel de hígado, bazo y pulmón, que se pudo detectar hasta los 7 días post-administración. La formulación preparada con SLNs, dextrano y protamina, indujo mayores niveles de transfección y más duraderos en hígado y en bazo que las

SLNs solas (34) y además fue capaz de transfectar también el pulmón. Estos resultados son debidos por un lado, al efecto de la protamina, ya que su alto grado de condensación del ADN hace que esté más protegido frente a la degradación; por otro lado, el dextrano evitaría la interacción con componentes sanguíneos y aumentaría el tiempo de permanencia del vector en circulación sanguínea.

#### 5.3.b. Acido hialurónico (AH)

La capacidad del AH de interactuar con el receptor

CD44, implicado en procesos de internalización celular es bien conocida (50). De hecho se ha podido demostrar que este receptor está implicado en la internalización celular de diferentes nanosistemas (51). Por ello, estudiamos el efecto que podría tener la incorporación de AH en nuestros vectores basados en SLNs. Preparamos vectores con SLNs, protamina y AH (52) y evaluamos la eficacia de transfección en HEK293 y en ARPE-19. Utilizamos AH de diferentes pesos moleculares (150, 500 y 1500 kDa). La figura 8 muestra una fotografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión de los vectores preparados con SLNs, protamina y AH<sub>500</sub>, donde puede observarse alrededor de la partícula una capa o “corona” debido a la disposición de las cadenas de AH (flechas blancas).



**Figura 8. Fotografía de vectores preparados con AH<sub>500</sub>:protamina:SLNs obtenida por microscopía electrónica de transmisión.** Puede observarse alrededor de la partícula una capa o “corona” debido a la disposición de las cadenas de AH (flechas blancas).

Los vectores fueron capaces de transfectar eficientemente ambas líneas celulares, y se comprobó que el peso molecular no afectaba a la transfección de células

HEK293 y ARPE-19, pero con el AH de 150 y 500 kDa, la transfección aumentaba al aumentar su proporción en las nanopartículas. El mayor incremento en la transfección respecto a las nanopartículas preparadas sin AH ni protamina se observó en las células ARPE-19 (hasta 7 veces más células transfectadas). Estas células presentan receptores CD44, y el bloqueo de este receptor por la presencia en el medio de cultivo de un exceso de AH, hizo disminuir significativamente la transfección, lo que indica la participación de este receptor en la internalización celular del vector. Los estudios de internalización y disposición intracelular de los vectores en células HEK293 y ARPE-19 pusieron de manifiesto diferencias en el grado de descondensación del plásmido en el citoplasma celular en función de la composición del vector y de la línea celular. La interacción del AH con la matriz intracelular modifica la unión entre los componentes de la formulación, lo que favorecería la descondensación del ácido nucleico, y por tanto su liberación del vector (53). Esto es especialmente importante si el vector es internalizado por endocitosis mediada por caveolas, ya que la falta de actividad lisosomal hace más difícil la liberación del material genético cuando este está fuertemente unido al vector. Si el vector entra por endocitosis mediada por clatrina, es la actividad lisosomal y no el efecto del polisacárido, la principal responsable de la liberación intracelular del ácido nucleico.

## 6. APLICACIONES DE LAS SLNs EN TERAPIA GÉNICA

La terapia génica es una estrategia terapéutica relativamente reciente, y desde el primer ensayo clínico aprobado por la FDA en 1990 (14,54) se han llevado a cabo más de 2000 ensayos clínicos. La tabla 1 recoge las indicaciones más frecuentes para las que los productos evaluados van dirigidos (13). Tal y como se observa en la tabla, la principal indicación es el cáncer, con un 65% del total de ensayos, seguido de las enfermedades cardiovasculares, con un porcentaje mucho menor (7,5%).

**Tabla 1. Principales indicaciones de los productos a base de terapia génica evaluados en los ensayos clínicos realizados en todo el mundo.**

Orden	Indicación	Número de ensayos	Porcentaje respecto al número total de ensayos
1	Cáncer	1517	64,4
2	Enfermedades cardiovasculares	177	7,5
3	Marcadores genéticos	50	2,1
4	Voluntarios sanos	53	2,2
5	Enfermedades infecciosas	179	7,6
6	Enfermedades inflamatorias	14	0,6
7	Enfermedades monogénicas	235	10
8	Enfermedades neurológicas	43	1,8
9	Enfermedades oculares	34	1,4
10	Otras	54	2,3

A continuación se presentan nuestras aportaciones que demuestran la potencial aplicación de las SLNs para terapia génica. Más específicamente, nos hemos centrado en las enfermedades raras y en las enfermedades infecciosas.

### 6.1. Enfermedades raras

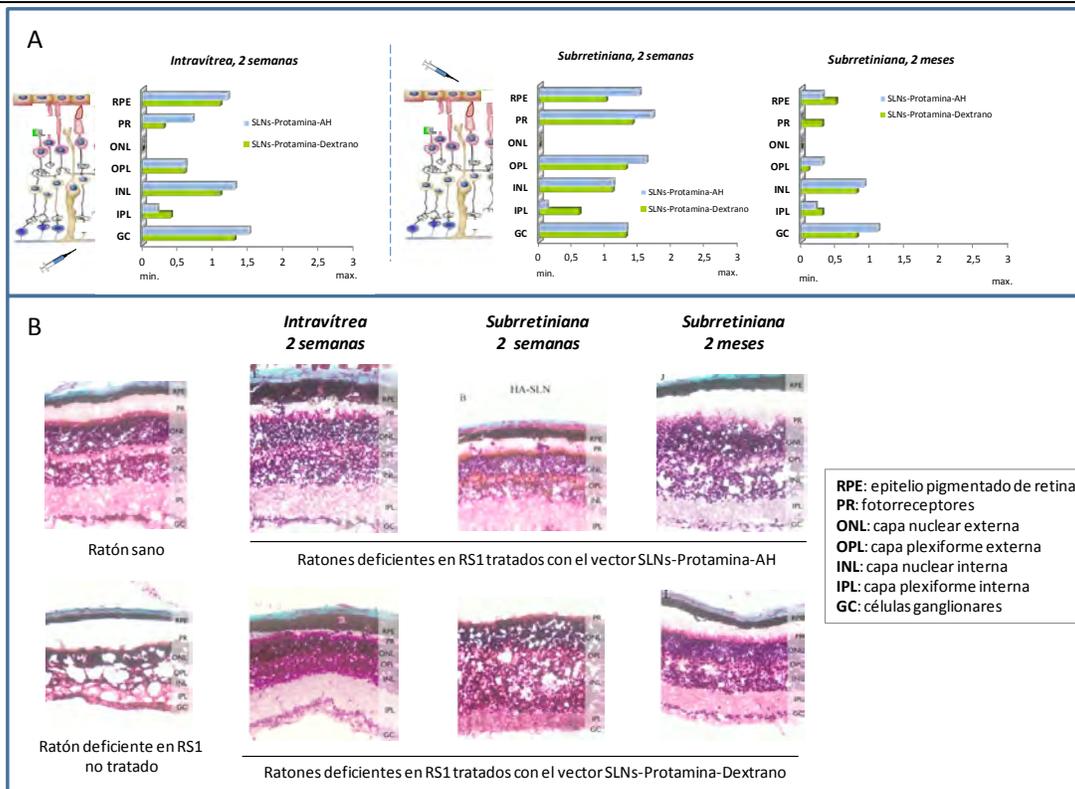
#### 6.1.a. Retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X (XLRS)

La XLRS es una enfermedad degenerativa de la retina central que tiene un modo de herencia recesivo afectando casi exclusivamente a hombres, aunque también hay casos aislados descritos en mujeres, con una prevalencia estimada de 1/5.000 – 1/25.000 (55). Puede desarrollarse desde edad muy temprana, pero lo más frecuente es detectarla en pacientes entre 5 y 10 años porque los pacientes de esas edades encuentran dificultades en la lectura. Los principales síntomas que se experimentan desde la infancia son la dificultad para ver en detalle y la disminución de la visión central, que progresa muy lentamente. A veces se produce disminución brusca de la visión debido a hemorragias o desprendimiento de retina. En el centro de la retina se observa una cavidad quística que puede desarrollarse en la fovea. También puede presentarse en la retina periférica. Los quistes presentan un patrón estrellado y estrías radiales que se han comparado con los radios de una rueda de bicicleta; pueden coalescer para formar una gran cavidad quística central, lo que conduce a una rápida pérdida de visión. El gen responsable de la retinosquiasis (*RS1*) codifica una proteína de 224 aminoácidos, la retinosquiasina (56,57). Esta proteína se expresa muy abundantemente en los fotorreceptores (retina externa), pero la enfermedad típicamente afecta a las capas retinianas más internas que contienen células ganglionares, incluida la capa de fibras nerviosas. Tras la síntesis y secreción de retinosquiasina por los fotorreceptores, la proteína alcanza la superficie de las células retinianas y es la responsable de la interacción/adhesión entre fotorreceptores, células bipolares y células de Müller, contribuyendo al mantenimiento de la integridad de la retina. El espectro de mutaciones en el gen *RS1* es amplio, habiendo mutaciones que truncan la proteína (deleciones pequeñas, inserciones y *splice site*) o mutaciones *missense* que suelen encontrarse en el dominio discoidin (importante para la adhesión entre células). Al fallar esta proteína, falla la adhesión entre las células, lo que permite que se formen los espacios quísticos que dan nombre a la enfermedad (58).

La terapia génica ha sido propuesta como una potencial herramienta para el tratamiento de diferentes enfermedades oculares, incluyendo las enfermedades degenerativas de la retina (59,60). Por ello, para conocer la potencial utilidad de nuestros vectores en el tratamiento de la XLRS, preparamos los vectores a base de SLNs con el plásmido pCEP4-RS1, y evaluamos su capacidad para inducir la producción de retinosquiasina en células ARPE-19. Comprobamos que tras el tratamiento, las células eran capaces de expresar el gen *RS1* y sintetizar la proteína; además detectamos una mayor producción de retinosquiasina cuando el vector incluía, además de las SLNs, protamina y dextrano (61) y más aún cuando se sustituía el dextrano por el AH (33). Posteriormente demostramos que ese vector, preparado con un gen marcador (pCMS-EGFP), que codifica para la proteína verde fluorescente, era capaz de transfectar la córnea tras su administración tópica a ratas, y la retina tras la administración intravítrea y subretiniana, también en ratas. Además, observamos que en el caso de la retina, el tipo de células transfectadas dependía de la vía de administración. Así, la administración intravítrea daba lugar a una mayor transfección de células ganglionares, mientras que se transfectaban más fotorreceptores y células del epitelio pigmentario cuando el vector se administraba por vía subretiniana (61).

En una fase posterior, administramos los vectores a ratones transgénicos deficientes en el gen *RS1*, por vía subretiniana y por vía intravítrea. A las dos semanas de la administración, pudimos detectar la retinosquiasina producida como consecuencia del proceso de transfección en las diferentes capas de la retina, y cuando los vectores se administraron por vía subretiniana, pudimos detectar la retinosquiasina también a los dos meses. El análisis estructural confirmó la recuperación parcial de la estructura de la retina, que estaba significativamente dañada en los animales como consecuencia de la enfermedad. En la figura 9 se recoge la expresión de retinosquiasina en la retina de los animales, e imágenes de las retinas tras la tinción tricrómica de Masson. Puede observarse la recuperación de la integridad de las retinas de los animales tratados (33, 62).

Estos trabajos han demostrado por primera vez la eficacia de un vector no viral para transfectar la retina de animales deficientes en el gen *RS1*, producir retinosquiasina y mejorar la integridad de la retina. Hasta nuestro conocimiento, son los estudios más avanzados que muestran el potencial real de las SLNs en terapia génica.



**Figura 9. A. Expresión de retinosquisina en las retinas de los ratones deficientes en *RS1* tratados por vía intravítrea o por vía subretiniana con los vectores SLNs-Protamina-AH y SLNs-Protamina-Dextrano. B. Imágenes de las retinas tratadas con la tinción tricrómica de Masson.**

**6.1.b. Enfermedad de Fabry (EF)**

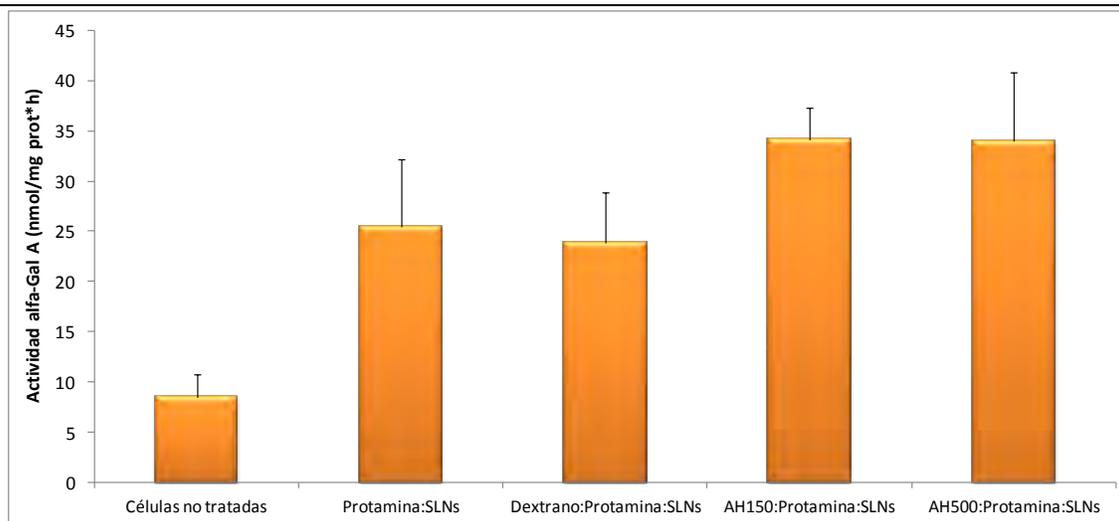
La EF es una alteración metabólica, multisistémica y grave, de carácter hereditario. Se trata de una enfermedad monogénica, ligada al cromosoma X, que se produce por diversas mutaciones en el gen de la  $\alpha$ -galactosidasa A ( $\alpha$ -Gal A). En condiciones normales esta enzima rompe la porción de  $\alpha$ -galactosilo terminal de la globotriaosilceramida Gb3, para dar galactosa y lactosilceramida. En los casos en los que la  $\alpha$ -Gal A es defectuosa, se acumula Gb3 principalmente en los lisosomas, pero también en el retículo endoplasmático, la membrana y en el núcleo de las células endoteliales vasculares, afectando de forma predominante a órganos como la piel, el sistema nervioso, el riñón y el corazón (63). La acumulación de Gb3 da lugar a manifestaciones clínicas diversas: neuropatía dolorosa, lesiones cutáneas, opacidad corneal, afectación renal, afectación cardíaca (hipertrofia del ventrículo izquierdo), manifestaciones neurológicas (accidente isquémico transitorio, crisis comiciales, lesiones isquémicas), manifestaciones gastrointestinales (dolor abdominal de tipo cólico y postprandial, diarrea autolimitada). La incidencia de la EF, que es considerada una enfermedad rara, no es bien conocida y oscila entre 1:117.000 y 1:476.000. La terapia enzimática sustitutiva (TES) es actualmente el único tratamiento. Existen dos medicamentos basados en la enzima recombinante aprobados por la EMA y por la Food and Drug Administration (FDA): agalsidasa alfa

(ReplagalTM®) y agalsidasa beta (Fabrazyme®). Estos medicamentos deben administrarse por vía parenteral cada dos semanas, y producen mejora de la patología renal y cardíaca además de reducir el dolor y mejorar la calidad de vida de los pacientes (65,66) pero su eficacia depende claramente de que se instaure en fases iniciales (67,68). Otro inconveniente es que desencadena la formación de anticuerpos anti- $\alpha$ -Gal A (69). También hay que considerar los efectos adversos (70), y el elevado coste del tratamiento; se estima que el coste anual por paciente es de aproximadamente 210.000 euros (71). Debido a las limitaciones de la terapia actual de la EF, existe una clara necesidad de buscar nuevas estrategias para mejorar la calidad de vida de los pacientes. La terapia génica para tratar la EF es una nueva opción terapéutica que ha ido ganando interés en los últimos años (72). Son varias las razones que hacen que esta enfermedad sea una buena candidata a ser tratada mediante terapia génica (73): 1) se debe a la alteración de un único gen, 2) con un nivel de actividad de tan solo el 15-20% del nivel normal se consigue eficacia clínica, 3) se puede conseguir efecto terapéutico a largo plazo, y 4) menor coste que la TES.

Para probar la utilidad de las SLNs en la EF, preparamos diferentes formulaciones con el plásmido pR-M10- $\alpha$ Gal A, que codifica para la  $\alpha$ -Gal A, a base de SLNs, protamina y dextrano. Los vectores fueron capaces de transfectar la línea celular HepG2 (células hepáticas de origen humano) e inducir la producción de  $\alpha$ -Gal A,

alcanzándose niveles de actividad hasta 12 veces superior con respecto a las células sin tratar (74). En un estudio posterior, evaluamos vectores preparados con SLNs, protamina y dextrano o AH de 150 y 500 kDa en una línea celular inmortalizada de células endoteliales obtenida a partir de células de un paciente con EF, denominada IMFE1 (75). Setenta y dos horas post-transfección, las células fueron capaces de expresar la enzima, siendo las formulaciones preparadas con AH las más eficaces, con un aumento de la actividad de la  $\alpha$ -Gal A de hasta 4 veces con respecto a las células sin tratar. Los resultados se

confirmaron mediante RT-PCR. En la figura 10 se recoge el nivel de actividad de la  $\alpha$ -Gal A en las células IMFE tratadas con los vectores (30). Como se ha comentado previamente, para esta enfermedad un pequeño incremento en la actividad es suficiente para obtener un efecto terapéutico a largo plazo, por lo que es de esperar que el aumento en la actividad  $\alpha$ -Gal A en las células tratadas con una única dosis del vector sea suficiente para conseguir efecto terapéutico in vivo.



**Figura 10. Actividad  $\alpha$ -Gal A en células IMFE1 tratadas con los diferentes vectores a base de SLNs.**

Como se ha comentado, en la EF se produce una acumulación de glucoesfingolípidos en las células, que son componentes del sistema de caveolas, implicado en los procesos de internalización de los sistemas nanoparticulados (76). Por tanto, los mecanismos implicados en la captación de nuestros vectores posiblemente están afectados por la alteración de las células como consecuencia de la enfermedad. De hecho, los estudios de internalización descartaron la entrada por endocitosis mediada por caveolas. Sí pudimos confirmar la co-localización de los vectores con los lisosomas, que facilitarían la liberación del plásmido del vector, donde se encuentra fuertemente condensado debido a la protamina. Estos resultados confirman una vez más, la importancia no solo del vector si no de la célula diana en el proceso de diseño de un vector no viral para terapia génica.

En resumen, nuestro estudio demuestra por primera vez la eficacia de vectores no virales a base de SLNs para transfectar un modelo celular de la EF, induciendo un incremento significativo en la actividad  $\alpha$ -Gal A.

### 6.2. Enfermedades infecciosas: Virus de la hepatitis C (VHC)

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre 3 y 4 millones de personas se infectan cada año con el VHC, y aproximadamente 150 millones presentan infección crónica, que puede derivar en cirrosis y/o hepatocarcinoma. Se estima que 350.000 personas mueren cada año como consecuencia de la infección por

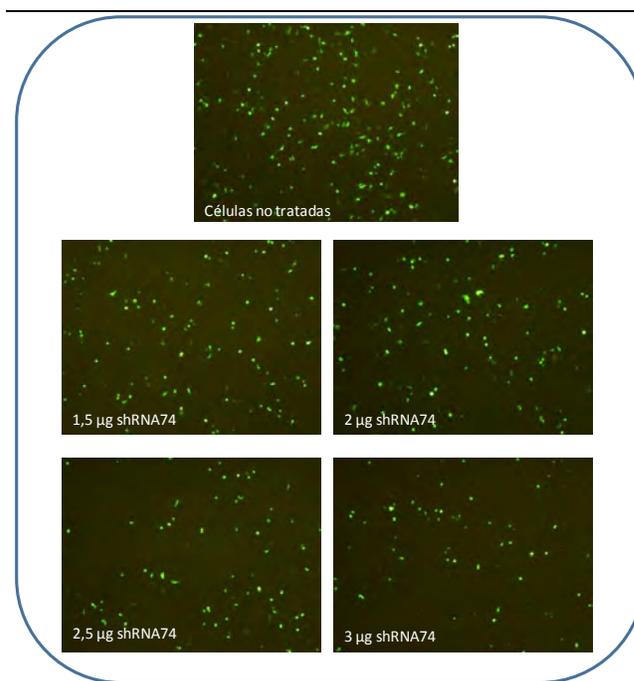
VHC (77). Los nuevos inhibidores de proteasas como el simeprevir o sofosbuvir han mejorado sustancialmente la respuesta antiviral (78); sin embargo, es de esperar que con su uso, debido a la presión farmacológica se seleccionen resistencias frente a estos nuevos fármacos, ya que el virus presenta una alta tasa de mutación (79). Además, el tratamiento es excesivamente caro y debe administrarse conjuntamente con otros fármacos, como el interferón pegilado y la ribavirina, que incrementan la posibilidad de aparición de efectos adversos (80). Por ello, es evidente la necesidad de desarrollar nuevos antivirales más efectivos, más seguros y de menor coste para el tratamiento de aquellos pacientes para los que los fármacos actuales no son efectivos. En este sentido, el ARNi se postula como una prometedora estrategia (81).

Desde el descubrimiento del ARNi, muchos estudios han demostrado su potencial como estrategia terapéutica, y actualmente representa una interesante herramienta para el control y/o tratamiento de enfermedades, como el cáncer (82), enfermedades neurodegenerativas (83), y enfermedades infecciosas (81). Entre las enfermedades infecciosas que pueden ser potencialmente tratadas con ARNi, destacan las infecciones debidas al virus de la inmunodeficiencia humana, al virus de la hepatitis B o al VHC (84). En la mayoría de los casos, con la terapia génica se busca el bloqueo de genes del agente infeccioso.

El genoma del VHC consta de una sola cadena de ARN (+), que se replica en el citoplasma celular, y por tanto,

este virus puede ser un buen candidato para el tratamiento con ARNi a través del silenciamiento de secuencias específicas de su ARN. En este sentido, la secuencia denominada “Sitio Interno de Entrada al Ribosoma” (IRES), que se encuentra en el extremo 5’ de la región no traducida (UTR) y que es necesaria para la síntesis proteica y por tanto para la replicación del virus, ha sido propuesta como secuencia diana para la inhibición del virus (85,86).

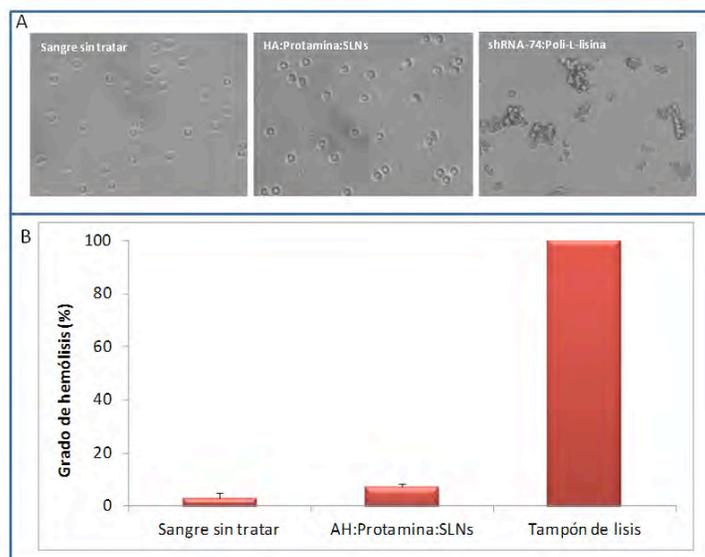
Teniendo en cuenta estas consideraciones, estudiamos la potencial aplicación de los vectores preparados con SLNs, protamina y dextrano o AH, para el tratamiento de la infección crónica debida al VHC, a los que incorporamos un plásmido que codifica un ARNi frente al dominio II de la secuencia IRES-VHC (shRNA74) (31,32). Puesto que el VHC se replica y acantona en el interior de los hepatocitos a lo largo de su ciclo de vida, los estudios in vitro de eficacia de silenciamiento los llevamos a cabo en las líneas celulares HepG2 y Huh-7 (células de hepatoma de origen humano). Los vectores fueron internalizados en las células de forma rápida y eficiente, independientemente del polisacárido empleado, siendo el principal mecanismo de entrada la endocitosis mediada por clatrin, y en menor medida la endocitosis mediada por caveolas. La captación mediada por el receptor CD44 también estaba implicada, aunque este mecanismo resultó ser mucho menos eficiente para el silenciamiento. Asimismo, se comprobó que la macropinocitosis no intervenía en el proceso de entrada a la célula. Al tratar células HepG2 y Huh-7 con los vectores que expresaban IRES-GFP tras un proceso previo de transfección, se comprobó una disminución del IRES-GFP, consecuencia del proceso de silenciamiento debido al shRNA74 incorporado en los vectores. Independientemente de la presencia de AH o dextrano en el vector, el silenciamiento incrementaba al aumentar la dosis; además, resultó ser más eficaz el vector preparado con AH, que permitió alcanzar, para la dosis más alta (3  $\mu\text{g}$  de shRNA74), un silenciamiento del 60% en las células HepG2, y un 50% en las células Huh-7. En la figura 11 se recogen imágenes de las células Huh-7 en las que se puede observar como la expresión de IRES-GFP disminuye al aumentar la dosis de shRNA74 en el vector preparado con AH.



**Figura 11. Expresión de IRES-GFP en células Huh-7 tratados con los vectores preparados con SLNs, AH y cantidades crecientes de shRNA74.** Puede observarse como la eficacia de silenciamiento aumenta al aumentar la dosis de shRNA74.

Posteriormente, evaluamos la eficacia de los vectores en la línea celular de hepatoma humano Huh-7 NS3-3 (87), que porta un replicón subgenómico del virus. Se observó una disminución significativa de la cantidad de ARN del VHC, indicativo del silenciamiento del IRES-VHC, siendo este más elevado cuanto mayor es la dosis de shRNA74.

Estudiamos también la potencial toxicidad de los vectores en los dos modelos celulares, y comprobamos que la viabilidad celular no se veía alterada. Puesto que la viabilidad celular por sí sola no es indicativo de toxicidad, y teniendo en cuenta una posible administración parenteral, evaluamos el efecto del vector a nivel hematológico midiendo el grado de hemólisis y la capacidad de aglutinación de eritrocitos. El vector no mostró actividad hemolítica ni tampoco indujo la aglutinación de eritrocitos indicativo de la biocompatibilidad del vector (figura 12). Es importante tener en cuenta que al AH se le atribuye la capacidad de reducir la interacción de las nanopartículas con componentes sanguíneos debido a un impedimento estérico.



**Figura 12. A) Estudio de aglutinación de eritrocitos con los vectores AH:protamina:SLNs. Tampón de lisis: control positivo (100 % lisis). B) Actividad hemolítica de los vectores. shRNA74:PLL: complejo formado por el plásmido shRNA74 y poli-L-lisina (control positivo).**

Estos resultados obtenidos con los vectores preparados con SLNs y el plásmido shRNA74 confirman la potencial utilidad de los vectores no virales basados en SLNs en el tratamiento de la infección crónica por el VHC.

## 7. CONCLUSIONES

El éxito de la terapia génica depende en gran medida del sistema de administración. Los vectores no virales, y más concretamente, las SLNs han demostrado tener propiedades muy adecuadas para la administración de ácidos nucleicos, entre los que cabe destacar la seguridad, la facilidad de producción a gran escala, la estabilidad tanto en fluidos biológicos como durante el almacenamiento, y la posibilidad de ser sometidas a procesos de esterilización y liofilización. En nuestros estudios hemos demostrado que las SLNs presentan una gran capacidad para proteger al material genético de la degradación enzimática y de ser rápida y eficientemente captadas por las células, aunque el grado de captación depende de la composición y de la línea celular. En este sentido, hemos puesto de manifiesto la importancia que tiene el conocimiento de los mecanismos de internalización y disposición intracelular para la optimización de la formulación. Además, por primera vez hemos demostrado la capacidad de un vector no viral basado en SLNs para transfectar e inducir la expresión de proteínas en diferentes tejidos tras su administración sistémica a ratones. Finalmente, hemos estudiado la potencial utilidad de los vectores preparados a base de SLNs para el tratamiento mediante terapia génica de enfermedades raras monogénicas, como la EF o la XLRS, y de enfermedades infecciosas con ARNi, como la infección crónica por el VHC. El principal logro conseguido por nuestro grupo de investigación ha sido la

restauración parcial de la retina tras la administración intraocular a ratones de un vector preparado con SLNs y el gen *RS1*, que codifica la proteína retinosquisina, deficiente en la enfermedad degenerativa de la retina XLRS, en la que se da una desestructuración de la retina que conduce a la pérdida de visión. Todos nuestros resultados nos permiten concluir que las SLNs son una prometedora herramienta como sistema no viral para terapia génica.

## 8. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación recibida del Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco (IT-341-10), el Departamento de Industria de Gobierno Vasco (programa Saiotek), del Ministerio de Economía y Competitividad (SAF SAF2010-19862, SAF2014-53092-R), y de la fundación Genzyme.

## 9. REFERENCIAS

1. EMA (2015) Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. Draft. EMA/CAT/80183/2014. European Medicines Agency.
2. Huang F, Yu CJ, Guo Y. Nucleic acids as regulatory molecules. In: Johnon PH, Ed. RNA Interference. Applications to drug discovery and challenges t pharmaceutical development. New Jersey: Jon Eiley and Sons, Inc 2011; pp.12-49.
3. Lee J, Boczkowski D, Nair S. Programming human dendritic cells with mRNA. *Methods Mol Biol* 2013; 969: 111-25.
4. Hecker JG. Nonviral, cationic lipid-mediated delivery of mRNA. *Methods Mol Biol* 2013; 969: 73-88.

5. Phua KK, Nair SK, Leong KW. Messenger RNA (mRNA) nanoparticle tumour vaccination. *Nanoscale* 2014; 6: 7715-29.
6. Rodríguez-Gascón A, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA. Development of nucleic acid vaccines: use of self-amplifying RNA in lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 1833-43.
7. Lares MR, Rossi JJ, Ouellet DL. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. *Trends Biotechnol* 2010; 28: 570-9.
8. Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol* 2010; 629: 141-58.
9. Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. Progress in microRNA delivery. *J Control Release* 2013; 172: 962-974.
10. Liu F, Shollenberger LM, Conwell CC, Yuan X, Huang L. Mechanism of naked DNA clearance after intravenous injection. *J Gene Med* 2007; 9: 613-619.
11. Rodríguez-Gascón A, del Pozo-Rodríguez A, Isla A, Solinís MA. Vaginal gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; 92: 71-83.
12. Del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. Terapia génica. Concepto, sistemas de administración y aplicaciones. *Industria Farmacéutica* 2006; 128: 86-99.
13. The Journal of Gene Medicine Clinical Trial Site. 2016. Jon Wiley and Sons Ltd. Disponible en <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinic/al/>.
14. Sheridan C. Gene therapy finds its niche. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 121-8.
15. Molla MR, Levkin PA. Combinatorial Approach to Nanoarchitectonics for Nonviral Delivery of Nucleic Acids. *Adv Mater* 2016; 28: 1159-1175.
16. Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy-an overview. *J Clin Diagn Res* 2015; 9: GE01-6.
17. Rodríguez-Gascón A, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA. Non-viral delivery systems in gene therapy. In Martín-Molina F, Ed. *Gene Therapy. Tools and potential applications*. Croatia: Intech 2013 pp: 3-33.
18. Young JL, Dean DA. Electroporation-mediated gene delivery. *Adv Genet* 2015; 89: 49-88.
19. Stoller F, Schlegel A, Viecelli HM, *et al*. Hepatocyte Transfection in small pigs after weaning by hydrodynamic intraportal injection of naked DNA/minicircle vectors. *Hum Gene Ther Methods* 2015; 26: 181-92.
20. Pan R, Xu W, Ding Y, Lu S, Chen P. Uptake mechanism and direct translocation of a new CPP for siRNA delivery. *Mol Pharm* 2016; 13: 1366-74.
21. Wang M, Wu B, Tucker JD, Lu P, Lu Q. Poly(ester amine) Constructed from Polyethylenimine and Pluronic for Gene Delivery in vitro and in vivo. *Drug Deliv* 2016; 10: 1-23.
22. Bose RJ, Arai Y, Ahn JC, Park H, Lee SH. Influence of cationic lipid concentration on properties of lipid-polymer hybrid nanospheres for gene delivery. *Int J Nanomedicine* 2015; 10: 5367-82.
23. Schwarz C, Mehnert W, Lucks JS, Müller RH. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *J Control Rel* 1994; 30: 83-96.
24. del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. Short- and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles for gene therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71: 181-9.
25. Swathi G, Prasanthi NL, Manikiran SS, Ramarao N. Solid Lipid Nanoparticles: Colloidal Carrier Systems for Drug Delivery. *IJPSR* 2010; 1:1-16.
26. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54 (Suppl): S131-S55.
27. Olbrich C, Bakowsky U, Lehr C-M, Müller RH, Kneuer C. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *J Control Release* 2001; 77: 345-55.
28. Rodríguez-Gascón A, Solinís MA, del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Pedraz JL, inventors; University of the Basque Country UPV/EHU, assignee. Lipid Nanoparticles For Gene Therapy, P200901664, PCT/ES/2010/070519, WO 2011/015701 A3, US2012/0183589 A1, 2011.
29. Rodríguez-Gascón A, Solinís MA, del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Fernández E, inventors; University of the Basque Country UPV/EHU, Universidad Miguel Hernández de Elche, assignees Lipid Nanoparticles for Treating Ocular Diseases. P201031897, PCT/ES2011/070883, US2013/0234592 A1, WO2011015701 (A3), 2012.
30. Ruiz de Garibay AP, Solinís MA, del Pozo-Rodríguez A, Apaolaza PS, Shen JS, Rodríguez-Gascón A. Solid lipid nanoparticles as non-viral vectors for gene transfection in a cell model of Fabry disease. *J Biomed Nanotechnol* 2015; 11: 500-11.
31. Torrecilla J, del Pozo-Rodríguez A, Apaolaza PS, Solinís MA, Rodríguez-Gascón A. Solid lipid nanoparticles as non-viral vector for the treatment of chronic hepatitis C by RNA interference. *Int J Pharm* 2015; 479: 181-8.
32. Torrecilla J, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, *et al*. Silencing of hepatitis C virus replication by a non-viral vector based on solid lipid nanoparticles containing a shRNA targeted to the internal ribosome entry site (IRES). *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016; 146: 808-17.
33. Apaolaza PS, Del Pozo-Rodríguez A, Torrecilla J, *et al*. Solid lipid nanoparticle-based vectors intended for the treatment of X-linked juvenile retinoschisis by gene therapy: In vivo approaches in Rs1h-deficient mouse model. *J Control Release* 2015; 217: 273-83.

34. del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís MA, *et al.* Solid lipid nanoparticles as potential tools for gene therapy: in vivo protein expression after intravenous administration. *Int J Pharm* 2010; 385: 157-62.
35. Delgado D, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, Bartkowiak A, Rodríguez-Gascón A. New gene delivery system based on oligochitosan and solid lipid nanoparticles: 'in vitro' and 'in vivo' evaluation. *Eur J Pharm Sci.* 2013 Nov 20;50(3-4):484-91.
36. Battaglia L, Serpe L, Foglietta F, *et al.* Application of lipid nanoparticles to ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2016; 24: 1-15.
37. Gottfried LF, Dean DA. Extracellular and Intracellular Barriers to Non-Viral Gene Transfer. In: Wei M, Good D, Eds. *Novel Gene Therapy Approaches.* Croatia: InTech 2013; pp.75-88.
38. del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. Solid lipid nanoparticles for retinal gene therapy: transfection and intracellular trafficking in RPE cells. *Int J Pharm* 2008; 360: 177-83.
39. Ruiz de Garibay AP, Solinís MA, Rodríguez-Gascón A, Ganjian H, Fuchs R. Role of endocytic uptake in transfection efficiency of solid lipid nanoparticles-based nonviral vectors. *J Gene Med* 2013; 15: 427-40.
40. Delgado D, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, Gascón A.R. Understanding the mechanism of protamine in solid lipid nanoparticle-based lipofection: the importance of the entry pathway. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 79: 495-502.
41. Biegeleisen K. The probable structure of the protamina-DNA complex. *J Theor Biol* 2006; 241: 533-40.
42. Vighi E, Montanari M, Ruozi B, Tosi G, Magli A, Leo E. Nuclear localization of cationic solid lipid nanoparticles containing protamine as transfection promoter. *Eur J Pharm Biopharm* 2010; 76: 384-93.
43. del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. Solid lipid nanoparticles: formulation factors affecting cell transfection capacity. *Int J Pharm* 2007; 339: 261-8.
44. del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Gascón AR, Solinís MÁ. Lipid nanoparticles as drug/gene delivery systems to the retina. *J Ocul Pharmacol Ther* 2013; 29: 173-88. doi: 10.1089/jop.2012.0128.
45. El-Sayed A, Khalil IA, Kogure K, Futaki S, Harashima H. Octaarginine- and octalysine-modified nanoparticles have different modes of endosomal escape. *J Biol Chem* 2008; 283: 23450-61.
46. del Pozo-Rodríguez A, Pujals S, Delgado D, *et al.* A proline-rich peptide improves cell transfection of solid lipid nanoparticle-based non-viral vectors. *J Control Release* 2009; 133: 52-9.
47. Fernández-Carneado J, Kogan MJ, Castel S, Giralte E. Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004; 43: 1811-4.
48. Masuda T, Akita H, Harashima H. Evaluation of nuclear transfer and transcription of plasmid DNA condensed with protamine by microinjection: the use of a nuclear transfer score. *FEBS Lett* 2005; 579: 2143-8.
49. Delgado D, Gascón AR, del Pozo-Rodríguez A, *et al.* Dextran-protamine-solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: in vitro characterization and in vivo transfection after intravenous administration to mice. *Int J Pharm* 2012; 425: 35-43.
50. Ruponen M, Rönkkö S, Honkakoski P, Pelkonen J, Tammi M, Urtti A. Extracellular glycosaminoglycans modify cellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *J Biol Chem* 2001; 276: 33875-80.
51. de la Fuente M, Seijo B, Alonso MJ. Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 2016-24.
52. Apaolaza PS, Delgado D, del Pozo-Rodríguez A, Gascón AR, Solinís MÁ. A novel gene therapy vector based on hyaluronic acid and solid lipid nanoparticles for ocular diseases. *Int J Pharm* 2014; 465: 413-26.
53. Ito T, Iida-Tanaka N, Niidome T *et al.* Hyaluronic acid and its derivative as a multi-functional gene expression enhancer: protection from non-specific interactions, adhesion to targeted cells, and transcriptional activation. *J Control Release* 2006; 112: 382-8.
54. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, *et al.* Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990; 323: 570-8.
55. Molday RS, Kellner U, Weber BH. X-linked juvenile retinoschisis: clinical diagnosis, genetic analysis, and molecular mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 2012; 31: 195-212.
56. Molday LL, Hicks D, Sauer CG, Weber BH, Molday RS. Expression of X-linked retinoschisis protein RS1 in photoreceptor and bipolar cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:8 16-25.
57. Sauer CG, Gehrig A, Warneke-Wittstock R, *et al.* Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nat Genet* 1997; 17: 164-70.
58. Weber BH, Schrewe H, Molday LL, *et al.* Inactivation of the murine X-linked juvenile retinoschisis gene, Rs1h, suggests a role of retinoschisin in retinal cell layer organization and synaptic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6222-7.
59. Solinís MA, del Pozo-Rodríguez A, Apaolaza PS, Rodríguez-Gascón A. Treatment of ocular disorders by gene therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 95: 331-42.
60. Delgado D, Rodríguez-Gascón A, Solinís MA, Aspiazu MA, del Pozo-Rodríguez A, Pedraz JL.

- Terapia génica aplicada al tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina. *Industria Farmacéutica* 2008;139:98-105.
61. Delgado D, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, et al. Dextran and protamine-based solid lipid nanoparticles as potential vectors for the treatment of X-linked juvenile retinoschisis. *Hum Gene Ther* 2012; 23: 345-55.
  62. Apaolaza PS, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, et al. Structural recovery of the retina in a retinoschisin-deficient mouse after gene replacement therapy by solid lipid nanoparticles *Biomaterials* 2015; 90: 40-9.
  63. Barbado Hernández FJ. Biografía de la enfermedad de Fabry. *Med Clin Monogr* 2010;11:3-6.
  64. Quinta R, Rodrigues D, Assunção M, et al. Reduced glucosylceramide in the mouse model of Fabry disease: correction by successful enzyme replacement therapy. *Gene* 2014; 536:97-104.
  65. Ramaswami U. Update on role of agalsidase alfa in management of Fabry disease. *Drug Des Devel Ther* 2011; 15: 155-173
  66. Hoffman B, Garcia de Lorenzo A, Mehta A, et al. Effects of enzyme replacement therapy on pain and health related quality of life in patients with Fabry disease: data from FOS (Fabry Outcome Survey). *J Med Genet* 2005; 42: 247-252.
  67. Germain DP, Charrow J, Desnick RJ, et al. Ten-year outcome of enzyme replacement therapy with agalsidase beta in patients with Fabry disease. *J Med Genet* 2015; 52: 353-8.
  68. Seydelmann N, Wanner C, Störk S, Ertl G, Weidemann F. Fabry disease and the heart. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015; 29: 195-204.
  69. Wilcox WR, Linthorst GE, Germain DP, et al. Anti-alpha galactosidase A antibody response to agalsidase beta treatment: data from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab* 2012; 105: 443-9.
  70. Hopkin RJ, Cabrera G, Charrow J. Risk factors for severe clinical events in male and female patients with Fabry disease treated with agalsidase beta enzyme replacement therapy: Data from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab* 2016; 119: 151-9.
  71. Vedder AC, Linthorst GE, Houge G, et al. Treatment of Fabry disease: outcome of a comparative trial with agalsidase alfa or beta at a dose of 0.2 mg/Kg. *PLoS One* 2007; 2: e598.
  72. Hollak CE, Vedder AC, Linthorst GE, Aerts JM. Novel therapeutic targets for the treatment of Fabry disease. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 821-33.
  73. Ruiz de Garibay A, Solinís MA, Rodríguez-Gascón A. Gene therapy for Fabry disease: a Review of the literature. *BioDrugs* 2013; 27: 237-46.
  74. Ruiz de Garibay AP, Delgado D, Del Pozo-Rodríguez A, Solinís MÁ, Gascón AR. Multicomponent nanoparticles as nonviral vectors for the treatment of Fabry disease by gene therapy. *Drug Des Devel Ther* 2012; 6: 303-310.
  75. Shen JS, Meng XL, Schiffmann R, Brady RO, Kanaski CR. Establishment and characterization of Fabry disease endothelial cells with an extended lifespan. *Mol Genet Metab* 2007; 92: 137-44.
  76. Shu L, Shayman JA. Caveolin-associated accumulation of globotriaosylceramide in the vascular endothelium of alpha-galactosidase A null mice. *J Biol Chem* 2007; 282: 20960-7.
  77. Hepatitis C. Fact sheet. World Health Organization. 2016. Disponible en: (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>)
  78. Pungpapong S, Aqel B, Leise M, et al. Multicenter experience using simeprevir and sofosbuvir with or without ribavirin to treat hepatitis C genotype 1 after liver transplant. *Hepatology* 2015; 61:1880-6.
  79. Romano KP, Ali A, Aydin C, et al. The Molecular Basis of Drug Resistance against Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Inhibitors. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002832.
  80. Preciado MV, Valva P, Escobar-Gutierrez A, et al. Hepatitis C virus molecular evolution: transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 15992-6013.
  81. Chandra PK, Kundu AK, Hazari S, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by intracellular delivery of multiple siRNAs by nanosomes. *Mol Ther* 2012; 20: 1724-36.
  82. Huang PI, Lo WL, Cherng JY, Chien Y, Chiou GY, Chiou SH. Non-viral delivery of RNA interference targeting cancer cells in cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* 2012; 12:275-84.
  83. González-Alegre P. ARN de interferencia terapéutico para enfermedades neurodegenerativas. *Rev Neurol* 2008; 47: 641-7.
  84. Torrecilla J, Rodríguez-Gascón A, Solinís MÁ, del Pozo-Rodríguez A. Lipid nanoparticles as carriers for RNAi against viral infections: current status and future perspectives. *Biomed Res Int* 2014; 161794.
  85. Moon JS, Lee SH, Kim EJ, et al. Inhibition of Hepatitis C Virus in Mice by a Small Interfering RNA Targeting a Highly Conserved Sequence in Viral IRES Pseudoknot. *PLoS One* 2016; 11:e0146710.
  86. Komar AA, Hatzoglou M. Exploring Internal Ribosome Entry Sites as Therapeutic Targets. *Front Oncol* 2015; 5: 233.
  87. Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285:110-3.