



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

PROGRAMA DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

**“Caracterización, formulación y diseño de un
proceso de producción de NTS-poliplex”**

TESIS

Que presenta

María Eugenia Aranda Barradas

Para obtener el Grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

Directores de Tesis: Dr. Daniel Martínez Fong

Dra. Elizabeth García García

Ciudad de México

Noviembre 2017

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Daniel Martínez Fong

Investigador del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias
CINVESTAV-IPN

Dra. Elizabeth García García

Líder de Proyectos de Nanotecnología
PSICOFARMA, S.A. DE C.V.

Dr. Juan Pedro Luna Arias

Investigador del Departamento de Biología Celular
CINVESTAV-IPN

Dr. Jaime Santoyo Salazar

Investigador del Departamento de Física
CINVESTAV-IPN

Dra. Liliana Quintanar Vera

Investigadora del Departamento de Química
CINVESTAV-IPN

Dr. Luis Fernando Rojas Ochoa

Investigador del Departamento de Física
CINVESTAV-IPN

Dra. María Eugenia Gutiérrez Castillo

Investigadora del Departamento de Biociencias e Ingeniería
CIEMAD-IPN

Este trabajo fue realizado con el apoyo #142917 de la Agence Nationale de la Recherche y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (ANR-CONACYT)

Este trabajo fue realizado en los laboratorios a cargo de los siguientes investigadores:

- Dr. Daniel Martínez Fong, Investigador del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
- Dra. Elizabeth García García, Investigadora del Departamento de Nanotecnología de Psicofarma, S.A. de C.V.
- Laboratorio de Biotecnología de Psicofarma, S.A. de C.V. Grupo Farmacéutico Neolpharma
- Dra. Liliana Quintanar Vera, Investigadora del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
- Dr. Jaime Santoyo Salazar, Investigador del Departamento de Física del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
- Dr. Luis Fernando Rojas Ochoa, Investigador del Departamento de Física del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
- Dra. Guillermina Ferro Flores, Investigadora del Departamento de Materiales Radiactivos del Instituto de Investigaciones Nucleares
- QFB. Sirenia González Pozos, Responsable del laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión del LaNSE (Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
- Ing. Josué Esaú Romero Ibarra, Responsable del laboratorio de Aplicaciones de la microscopía electrónica de barrido del LANE (Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

AGRADECIMIENTOS

A mis papás Rigo y Maru por todo el apoyo que me brindaron para concluir esta y cada etapa que he atravesado tanto a nivel personal como profesional e infinitas gracias por ser mi ejemplo de vida.

A mis queridos hermanos Juan y Rigo, por ser mis compañeros, mis cómplices y siempre mi apoyo. A Carmen, Karen, Magui, Roy, Vale, Hugo, Lucy y Liz por tantas cosas compartidas, tantas risas y tanto amor.

A mis abuelitos queridos Emilia y Enrique por su ejemplo, su cariño, por compartir conmigo un pedacito de su enorme sabiduría y por escucharme en todo momento.

A mis tíos David, Pepe, Hilda, Héctor y a mi comadre Hildita, por estar siempre al lado del camino.

A mis suegros Rosy y Jesús, por su apoyo incondicional, por los ánimos para concluir esta etapa y por el cariño que me han brindado.

A mi querido Gamboleritas' Team por los momentos de risas, de jalones de orejas, de tantas caricias a mi alma y porque contribuyeron mucho más de lo que se imaginan a la conclusión de este ciclo.

A mi amiga Paola Rojas Meza, por ser esas orejas y esa voz que llegan siempre cuando más lo necesito y que ayudaron de manera muy importante a que esta etapa llegara a su término.

A Mirna González Martínez y Sandra Ángeles Perea por su valiosa e inconveniente amistad, sin la cual hubiera enloquecido.

A mi amiga Adriana Campos Ramírez por escucharme y compartir, además de su experiencia en DDL, muchos momentos tanto de frustración como de alegría.

A mis queridos amigos, Francisco de León Ramírez por ser mi ejemplo en este y muchos otros aspectos y Marco Antonio Rodríguez Alvarado por escucharme y estar presente.

Al Dr. Daniel Martínez Fong, por todo el conocimiento compartido, por la confianza depositada en mí desde el inicio, por la paciencia, la motivación y el valioso tiempo dedicado a la dirección de este trabajo.

A la Dra. Elizabeth García García, por todo lo que he aprendido de ella y lo mucho que ha contribuido a mi crecimiento tanto personal como profesional; por el valioso tiempo que dedicó a la dirección de este trabajo; por todas las experiencias compartidas y esa amistad que para mí es entrañable.

A los Doctores Liliana Quintanar Vera, Jaime Santoyo Salazar, Luis Fernando Rojas Ochoa, Juan Pedro Luna Arias y María Eugenia Gutiérrez Castillo por sus valiosos comentarios y asesoría en el presente trabajo, así como por el apoyo y motivación que me brindaron para terminar.

Al Dr. José Gerardo Cabañas Moreno por su confianza, asesoría y apoyo en relación al programa de Nanociencias y Nanotecnología.

A mis colegas: Mariana Ramírez, Maripaz Márquez, Armando Espadas, Víctor Téllez, Helga Palma, Daniel Hernández y Rasagna Nadella por compartir conmigo sus valiosos conocimientos y por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo. Al Técnico Ignacio Araoz y a la Auxiliar Biól. Lourdes Escobedo; a la QFB Sirenia González y a la Auxiliar Biól. Magdalena Miranda por todo su apoyo técnico y emocional en esta etapa.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi amado esposo Jesús Rojo Hernández y a mi querida hijita Sofía Rojo Aranda porque simplemente no concibo el logro de cualquiera de mis metas sin su motivación y apoyo.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	9
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	13
RESUMEN	20
ABSTRACT	22
INTRODUCCIÓN	24
1. MARCO TEÓRICO	28
1.1. El NTS-poliplex.....	28
1.2. Abordajes terapéuticos	29
1.2.1. Enfermedades neurodegenerativas	29
Enfermedad de Alzheimer	30
Enfermedad de Parkinson	31
1.2.2. Cáncer	39
Epidemiología y tratamiento del cáncer.....	39
Genes terapéuticos para el tratamiento de cáncer con el NTS-poliplex	41
Aplicación del NTS-poliplex para el tratamiento de cáncer en modelos animales.....	42
1.3. ¿Qué se requiere para que una formulación de NTS-poliplex pueda utilizarse como tratamiento clínico en humanos?.....	44
1.4. Caracterización de los poliplexes	47
1.4.1. Funcionalidad biológica y eficiencia de transfección in vitro e in vivo.....	49
1.4.2. Forma física y patrones de aglomeración del nanovector	53
1.4.3. Estructura secundaria.....	55
1.4.4. Distribución de tamaño de partícula y potencial zeta.....	57
1.4.5. Ensamblaje (integridad, relaciones molares óptimas, etc.).....	60
1.5. Formulación y liofilización de poliplexes.....	61
1.6. Estudios de biodistribución y toxicidad.....	63
1.7. Procesos de producción de nanovectores no virales.....	65
2. JUSTIFICACIÓN	68
3. HIPÓTESIS	69
4. OBJETIVOS	69
4.1. Objetivo general	69
4.2. Objetivos específicos	70
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	71

5.2.	Determinación de funcionalidad biológica y eficiencia de transfección <i>in vitro</i>	72
5.3.	Determinación de funcionalidad biológica <i>in vivo</i>	73
5.4.	Microscopía Electrónica de Transmisión.....	73
5.5.	Microscopía Electrónica de Barrido	74
5.6.	Dispersión Dinámica de Luz	74
5.7.	Movilidad electroforética	75
5.8.	Dicroísmo Circular	75
5.9.	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier.....	75
5.10.	Protocolo de Liofilización.....	75
5.11.	Radio SEC-HPLC	76
6.	RESULTADOS	76
6.1.	Formulación del NTS-poliplex.....	77
6.2.	La funcionalidad biológica <i>in vitro</i> del NTS-poliplex se ve afectada por la concentración de glucosa en el vehículo	82
6.3.	El NTS-poliplex es capaz de transfectar <i>in vivo</i> utilizando PF25	84
6.4.	Efectos de la concentración de glucosa en el vehículo sobre la forma física y el patrón de aglomeración del NTS-poliplex.....	84
6.5.	La morfología del NTS-poliplex en EF25 y PF25 es comparable.....	86
6.7.	Caracterización de la estructura secundaria por las técnicas de Dicroísmo Circular (DC) y Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	89
6.8.	Diseño del proceso de liofilización del NTS-poliplex.....	95
6.9.	Efectos del proceso de liofilización sobre la funcionalidad biológica del NTS-poliplex.....	97
6.10.	Efecto del proceso de liofilización sobre la forma física de las nanopartículas de NTS-poliplex.....	99
6.11.	Efectos del proceso de liofilización sobre el tamaño de partícula y potencial zeta de las nanopartículas de NTS-poliplex	100
6.12.	La estructura secundaria del NTS-poliplex en PF25 se conserva después de la liofilización.....	101
6.13.	Efecto de la interacción con SFB sobre la forma física de las nanopartículas de NTS-poliplex reconstituidas.....	102
6.14.	Efecto de la interacción con suero humano sobre la integridad de las nanopartículas de NTS-poliplex reconstituidas	103
6.15.	Pruebas de estabilidad acelerada y a largo plazo de los liofilizados de nanopartículas de NTS-poliplex en PF25	105
6.16.	Biodistribución de las nanopartículas reconstituidas de NTS-poliplex	107
6.17.	Evaluación de la toxicidad de las nanopartículas de NTS-poliplex formuladas en PF25.....	109

6.18.	Depuración de las nanopartículas de NTS-poliplex.....	112
6.19.	Desarrollo del proceso escalable de producción (realizado en las instalaciones del laboratorio de biotecnología de Psicofarma).....	113
6.20.	Estandarización del proceso de obtención de pDNA.....	114
6.20.1.	Determinación del medio de cultivo óptimo para la propagación de pDNA.....	115
6.20.2.	Estandarización de las condiciones de fermentación en biorreactor para la propagación de pDNA.....	117
6.20.3.	Estandarización del proceso de purificación de pDNA.....	119
6.21.	Estandarización del proceso de síntesis de acarreador de Neurotensina.....	122
6.22.	Ensamblaje del NTS-poliplex.....	137
7.	DISCUSIÓN.....	138
7.1.	La formulación desarrollada confiere estabilidad y lioprotección a las nanopartículas de NTS-poliplex.....	138
7.2.	Las nanopartículas de NTS-poliplex reconstituidas se conservan íntegras en su mayoría al interactuar con suero.....	144
7.3.	La liofilización confiere una vida de anaquel a las nanopartículas de NTS-poliplex de al menos seis meses a 25 °C y 60% HR.....	145
7.4.	Las nanopartículas de NTS-poliplex en PF25 tienden a acumularse en hígado y riñones sin generar toxicidad.....	145
7.5.	La orina es una vía de eliminación de NTS-poliplex.....	149
7.6.	El proceso de producción de NTS-poliplex propuesto es escalable y adaptable a BPF.....	149
8.	CONCLUSIONES.....	152
8.1.	Caracterización de las nanopartículas de NTS-poliplex.....	152
8.2.	Desarrollo de un vehículo para el uso clínico de las nanopartículas de NTS-poliplex.....	153
8.3.	Evaluación de la seguridad del NTS-poliplex en el nuevo vehículo.....	154
8.4.	Propuesta del diseño de un proceso de producción de NTS-poliplex escalable y adaptable a BPF considerando su rentabilidad.....	154
9.	PERSPECTIVAS.....	155
10.	REFERENCIAS.....	157

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Comparación de vectores virales y no virales para terapia génica.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 2. Características de los vectores no virales y las metodologías más comunes para su determinación.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 3. Aspectos básicos en la aplicación de las Buenas Prácticas de Fabricación ..</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 4. Composición electrolítica y variables fisicoquímicas del líquido cefalorraquídeo y plasma.</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 5. Composición del Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM).</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 6. Componentes y atributos buscados en la formulación del NTS-poliplex.....</i>	<i>80</i>
<i>Tabla 7. Prototipos de formulaciones a pH 7.4 para las nanopartículas de NTS-poliplex.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabla 8. Osmolaridades de los prototipos de formulación y de DMEM (formulación experimental) suplementado con diferentes concentraciones de glucosa (EF25, EF100 y EF280, respectivamente)</i>	<i>81</i>
<i>Tabla 9. Interpretación de bandas de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier del NTS-poliplex y sus componentes de acuerdo con el número de onda y los grupos funcionales correspondientes.....</i>	<i>94</i>
<i>Tabla 10. Condiciones de liofilización para las nanopartículas de NTS-poliplex.</i>	<i>96</i>
<i>Tabla 11. Muestras y condiciones para la prueba de integridad en suero fetal bovino.</i>	<i>102</i>
<i>Tabla 12. Cantidades del pDNA pML1 y porcentajes de recuperación en las etapas intermedias y final.</i>	<i>120</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Tipos de vectores utilizados en terapia génica</i>	<i>25</i>
<i>Figura 2. Composición y estructura del NTS-poliplex.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 3. Mecanismo de acción del NTS-poliplex.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 4. Proyección de incidencias de Enfermedad de Parkinson.</i>	<i>32</i>
<i>Figura 5. Rutas dopaminérgicas en el cerebro humano</i>	<i>34</i>
<i>Figura 6. Resumen de las fases de desarrollo de terapia génica para Enfermedad de Parkinson utilizando factores neurotróficos y vectores virales.</i>	<i>36</i>

<i>Figura 7. Expresión de hGDNF-flag en neuronas dopaminérgicas positivas a tirosina-hidroxilasa.</i>	37
<i>Figura 8. Opciones actuales de tratamiento para el cáncer.</i>	40
<i>Figura 9. Proceso de la terapia génica con un gen suicida (sistema HSV-TK / GCV) y efecto bystander.</i>	42
<i>Figura 10. Tratamiento de cáncer en un modelo murino de neuroblastoma</i>	43
<i>Figura 11. Un modelo para la interfase de descubrimiento y desarrollo</i>	45
<i>Figura 12. Evaluación de la funcionalidad biológica de vectores no virales in vitro.</i>	50
<i>Figura 13. Evaluación de la funcionalidad biológica del NTS-poliplex in vivo.</i>	52
<i>Figura 14. Formación de estructuras tipo toroide.</i>	53
<i>Figura 15. Micrografías de TEM de las etapas de formación del NTS-poliplex.</i>	54
<i>Figura 16. Espectro de Dicroísmo Circular de plásmido.</i>	56
<i>Figura 17. Espectroscopía de Dicroísmo Circular de vectores no virales con polímeros diferentes.</i>	56
<i>Figura 18. Dispersión Dinámica de Luz y potencial zeta de un polímero con plásmido pUC19 a diferentes proporciones N/P.</i>	58
<i>Figura 19. Potenciales zeta de varios poliplexes a diferentes proporciones N/P.</i>	59
<i>Figura 20. Ensayo de retención electroforética para determinar la relación molar óptima pDNA:acarreador de neurotensina.</i>	61
<i>Figura 21. Funcionalidad biológica del NTS-poliplex en PF25 en comparación con EF25.</i>	83
<i>Figura 22. Micrografías confocales de la SNc de ratas Wistars sin transfección (control negativo) y transfectadas con las nanopartículas de NTS-poliplex /pEFGP-N1 formuladas en EF25 ó PF25.</i>	84
<i>Figura 23. Micrografías representativas del análisis por microscopía electrónica de transmisión del NTS-poliplex formado en EF25 o en PF25, en ausencia (-) o en presencia (+) de SFB.</i>	85
<i>Figura 24. Micrografías representativas del análisis morfométrico de las nanopartículas de NTS-poliplex en EF25 ó PF25 utilizando un microscopio electrónico de barrido.</i>	86
<i>Figura 25. Distribución del tamaño y potencial zeta de las nanopartículas de NTS-poliplex preparadas en DMEM o en la formulación glucosa 25 mM.</i>	87
<i>Figura 26. Distribución de tamaño de nanopartículas de NTS-poliplex por Dispersión Dinámica de Luz mediante el instrumento Nanotracs Wave.</i>	88
<i>Figura 27. Dicroísmo circular de las nanopartículas de NTS-poliplex y sus componentes.</i>	90

<i>Figura 28. Espectros de F.T.-I.R. de las nanopartículas de NTS-poliplex y sus componentes.....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 29. Grupos funcionales identificados por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (F.T.-I.R.) presentes en los componentes de las nanopartículas de NTS-poliplex</i>	<i>93</i>
<i>Figura 30. Diagrama del proceso estandarizado de liofilización para el NTS-poliplex.</i>	<i>96</i>
<i>Figura 31. Apariencia de los liofilizados y reconstituidos de las nanopartículas de NTS-poliplex en EF25 y PF25.....</i>	<i>97</i>
<i>Figura 32. Funcionalidad biológica in vitro e in vivo de las nanopartículas de NTS-poliplex preparado PF25 y reconstituido con agua inyectable después de 2 días post-liofilización.....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 33. Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de NTS-poliplex de reciente preparación en EF25 o en EF25 y reconstituidos con agua inyectable después de 2 días de anaquel.....</i>	<i>99</i>
<i>Figura 34. Gráficos representativos de distribución de tamaño de partícula y potencial zeta del NTS-poliplex formulado en PF25, liofilizado y reconstituido en agua inyectable.....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 35. Análisis de DC (Dicroísmo Circular) de las nanopartículas de NTS-poliplex preparadas en PF25 y reconstituidas con agua inyectable de liofilizados de 2 días de anaquel.....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 36. Micrografías representativas del NTS-poliplex reconstituido a diferentes tiempos de interacción con Suero Fetal Bovino (SFB).....</i>	<i>103</i>
<i>Figura 37. Cromatogramas de radioSEC-HPLC del NTS-poliplex, sus componentes y de las nanopartículas en presencia de suero humano.....</i>	<i>104</i>
<i>Figura 38. Estabilidad acelerada y a largo plazo de las nanopartículas de NTS-poliplex.....</i>	<i>106</i>
<i>Figura 39. Estudio de biodistribución de las nanopartículas de NTS-poliplex conteniendo el ^{99m}Tc-KP.</i>	<i>108</i>
<i>Figura 40. Marcadores de toxicidad hepática y renal en ratones Balb/C inyectados intravenosamente con nanopartículas de NTS-poliplex en su forma clínica.</i>	<i>110</i>
<i>Figura 41. Micrografías representativas de estudios histopatológicos de hígado y riñón tras la administración de las nanopartículas de NTS-poliplex resuspendido en PF25.</i>	<i>111</i>
<i>Figura 42. Cromatogramas de SEC-HPLC que muestran la presencia de las nanopartículas de NTS-poliplex en orina a los dos tiempos estudiados postadministración</i>	<i>113</i>
<i>Figura 43. Diagrama de flujo de producción de NTS-poliplex.....</i>	<i>114</i>

<i>Figura 44. Determinación de biomasa y rendimiento específico de pDNA con diferentes medios de cultivo durante el crecimiento de E. coli transformada con el plásmido pML1.....</i>	<i>116</i>
<i>Figura 45. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos purificados a partir de los diferentes cultivos en los medios LB, SOC, TB, y PDM.</i>	<i>117</i>
<i>Figura 46. Cinéticas de fermentación en bioreactor de 5 L en lote y lote alimentado para la propagación de pDNA.</i>	<i>118</i>
<i>Figura 47. Proceso escalable de purificación de pDNA pML1.</i>	<i>119</i>
<i>Figura 48. Cantidades y rendimientos obtenidos en el proceso de purificación de tres lotes de pML1.</i>	<i>120</i>
<i>Figura 49. Reacción de conjugación de poli-L-lisina (PLL) y succinimidil 3-(2-piridilditiopropionato) de cadena larga (LC-SPDP), y generación del complejo altamente reactivo PLL-SPDP-SH mediante la reducción del conjugado PLL-SPDP.</i>	<i>123</i>
<i>Figura 50. Reacción de acoplamiento del complejo succinimidil 3-(2-piridilditiopropionato) de cadena larga (LC-SPDP) con neurotensina (NT) (NT-SPDP), mediante la formación de un enlace covalente y la liberación de N-Hidroxisuccinimida.</i>	<i>124</i>
<i>Figura 51. Reacción de acoplamiento del complejo NT-SPDP con el conjugado PLL-SPDP-SH mediante la formación de enlaces covalentes y la liberación de piridina-2-tiona.</i>	<i>124</i>
<i>Figura 52. Cromatogramas representativos de la purificación de cada reacción de conjugación.....</i>	<i>126</i>
<i>Figura 53. Cromatograma de la separación de guanidina del acarreador de neurotensina.</i>	<i>127</i>
<i>Figura 54. Cromatograma de la purificación del conjugado PLL-SPDP-SH (absorbancia a 215 nm).</i>	<i>129</i>
<i>Figura 55. Cromatograma de la purificación del complejo PLL-SPDP obtenido por la reacción de 15 mg de LC-SPDP y 10 mg de PLL.....</i>	<i>133</i>
<i>Figura 56. Cromatograma de la purificación del complejo PLL-SPDP-SH utilizando 36 mg de DTT en la reacción.</i>	<i>135</i>

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

^{99m}Tc	Tecnecio metaestable 99
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
L	Microlitros
G	Microgramos
M	Micromolar
°C	Grados centígrados
Aa	Aminoácidos
Acm	Acetamidometil
AFM	Microscopía de fuerza atómica (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
ALT	Alanino amino transferasa
Amp	Ampicilina
As / as	Absorbancia
ATCC	Colección de Cultivos Celulares de EEUU (<i>American Type Culture Collection</i>)
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>)
BMA	Butilmetacrilato
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación
BUN	Nitrógeno ureico en sangre (<i>Blood Urea Nitrogen</i>)
C-Terminal	Carboxilo Terminal
CDNF	Factor neurotrófico dopaminérgico conservado (<i>Conserved Dopaminergic Neurotrophic Factor</i>)
Cf	Concentración final
CIS	Cisplatino
Cm	Centímetro
Cofepris	Comisión federal de prevención de riesgos sanitarios
Cpm	Cuentas por minuto

Da	Daltones
DDL	Dispersión Dinámica de Luz
DMAEMA	2-(dimetilamino)etil metacrilato
DMEM	Medio “Eagle” Modificado de Dulbecco (<i>Dulbecco’s Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxiribonucleic Acid</i>)
DTT	Dithioetiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
EF25	Formulación Experimental con glucosa 25 mM
EF100	Formulación Experimental con glucosa 100 mM
EF 280	Formulación Experimental con glucosa 280 mM
EFGP-N1	Proteína verde fluorescente N1 (<i>Enhanced Fluorescent Green Protein N1</i>)
EMA	Agencia europea de medicamentos (<i>European Medicine Agency</i>)
EN	Enfermedades Neurodegenerativas
EP	Enfermedad de Parkinson
FAS	Ácido graso sintetasa (<i>Fatty Acid Synthase</i>)
FDA	Administradora de fármacos y alimentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FPLC	Cromatografía de líquidos rápida para proteínas (<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
FT-IR	(Espectroscopía) Infrarroja por Transformación de Fourier (<i>Fourier Transformed – Infra Red</i>)
G	Gramos
GAS1	Arresto específico de crecimiento 1 (<i>Growth Arrest Specific 1</i>)
GCV	Ganciclovir

GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glia (<i>Glial Derived Neurotrophic Factor</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)
h	Horas
HEPES	(Ácido) 4-(2-HidroxiEtil)-1-Piperazinetanosulfónico (<i>4-(2-hidroxyethyl)-1-piperazinEthaneSulphonic (Acid)</i>)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HR	Humedad relativa
HSV-TK	Timidina cinasa del virus de Herpes Simplex (<i>Herpes simplex virus Thymidine Kinase</i>)
IPAAm	Poli(N-isopropilacrilamida)
kDa	Kilodaltones
kV	Kilovolts
L	Litro
LAL	Lisado de amebocitos de <i>Limulus</i>
LB	Medio Luria-Bertani
LC-SPDP	Succinimidil 3-(2-piridilditiopropionato) de cadena larga (<i>Long Chain - Succinimidyl 3-(2-PiridylDithioPropionate)</i>)
LMWP	Protamina de bajo peso molecular (<i>Low Molecular Weight Protamine</i>)
M	Molar
mAU	Mili Unidades de Absorbancia
Mbar	Milibares
mDeg	Miligrados
Min	Minuto(s)
mL	Mililitros
Mm	Milímetro
mM	Milimoles/Milimolar

mOsm	Miliosmol
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (<i>1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine</i>)
mRNA	RNA mensajero
mSm/cm	miliSiemens/centímetro
mV	Mili Volts
Ng	Nanogramos
Nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
NTN	Neurturina
NTS	Neurotensina
NTS-poliplex	Poliplex de neurotensina
NTSR1	Receptor a neurotensina tipo 1 (<i>Neurotensin Receptor type 1</i>)
OMS	Organización mundial de la salud
ORF	Marco de lectura abierto (<i>Open Reading Frame</i>)
PAGA	Ácido poli-(4-aminobutil)-L-glicólico (<i>Poly-(4-aminobuthyl)-L-glicolic acid</i>)
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos (<i>Phosphate Buffer Solution</i>)
PDM	Medio para pDNA (<i>Plasmid DNA Medium</i>)
pDNA	Plásmido de DNA
PEG	Polietilenglicol
pEGFP-N1	Plásmido con el gen que codifica para EGFP-N1
PEI	Polietilenimina
PF	Péptido fusogénico
PF25	Formulación Prototipo con glucosa 25 mM
PF100	Formulación Experimental con glucosa 100 mM
PF280	Formulación Prototipo con glucosa 280 mM

PGA	Ácido poliglicólico (<i>Poly(glycolic acid)</i>)
pH	Potencial de Hidrógeno
PK	Péptido cariográfico
PLL	Poli-L-Lisina
Pix	NTS-políplex
RadioSEC-HPLC	Radio-Cromatografía de líquidos de alta resolución de exclusión molecular (<i>Radio-Size Exclusion Chromatography – High Performance Liquid Chromatography</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>RiboNucleic Acid</i>)
Rpm	Revoluciones por minuto
s/sec/seg	Segundos
SEC	Cromatografía de exclusión molecular (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)
SEC-HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución de exclusión molecular (<i>Size Exclusion Chromatography – High Performance Liquid Chromatography</i>)
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SFB	Suero Fetal Bovino
siRNA	RNA silenciador (<i>silencing RNA</i>)
SNC	<i>Substancia nigra compacta</i>
SNC	Sistema nervioso central
SOC	Medio súper óptimo con represión catabólica (<i>Super Optimal Broth with</i>)
SPDP	Succinimidil 3-(2-piridilditiopropionato) (<i>Succinimidyl 3-(2-PiridylDithioPropionate)</i>)
TB	Cultivo Enriquecido (<i>Terrific Broth</i>)
TNF	Factor de Necrosis Tumoral (<i>Tumoral Necrosis Factor</i>)
U	Unidades

UV	Ultravioleta
VLD	Velocimetría de Laser Doppler
Vis	Visible
V	Volts
XK	Número de aumentos en TEM y SEM

RESUMEN

El poliplex de neurotensina (NTS-poliplex) es un sistema nanométrico no viral que ha demostrado ser eficaz en el envío específico de genes neurotróficos y proapoptóticos. Esto lo convierte en un tratamiento potencial para padecimientos como la Enfermedad de Parkinson y algunos tipos de cáncer, como lo han evidenciado diversas investigaciones realizadas en modelos animales. Sin embargo, para su uso en humanos es necesario, en primer lugar, el desarrollo de una formulación segura y que le confiera estabilidad, lo que es un reto debido a que este tipo de sistemas es muy inestable. Posteriormente se requiere de estudios de farmacocinética y biodistribución del NTS-poliplex en la nueva formulación, los cuales serán las bases para la realización de los estudios clínicos en humanos. Y, para la realización de estos últimos, es preciso el diseño y desarrollo de un proceso de producción que sea escalable, monitoreable y que se adapte a Buenas Prácticas de Fabricación.

Con base en esto, se planteó el objetivo de establecer una vinculación exitosa academia-industria con el fin de cerrar la brecha entre la investigación experimental y la aplicación clínica del NTS-poliplex. Por tanto, en el presente trabajo se realizó, en primer lugar, la caracterización de las nanopartículas de NTS-poliplex, la cual permitió establecer parámetros de referencia para la evaluación de formulaciones y una forma farmacéutica prototipo (liofilizada). Se determinaron forma física (Microscopía electrónica), tamaño de partícula (Dispersión dinámica de luz), carga de superficie (movilidad electroforética), estructura secundaria (Dicroísmo Circular), eficiencia de transfección (citometría de flujo) y funcionalidad biológica *in vitro* e *in vivo* (microscopía de epifluorescencia) de dichas nanopartículas. Utilizando estos parámetros y metodologías, se realizaron comparaciones de las características y comportamiento del NTS-poliplex en la formulación clínica desarrollada y el medio de cultivo celular utilizado como vehículo para fines experimentales. Una vez confirmada la comparabilidad entre ambos vehículos, los mismos parámetros se utilizaron para evaluar la integridad del NTS-poliplex después del proceso de liofilización, el cual fue desarrollado con el objetivo de conferir estabilidad y una vida de anaquel a estas nanopartículas. Se determinó que los reconstituidos de los liofilizados de NTS-poliplex en la formulación clínica

conservan sus características físicas y la funcionalidad biológica al exhibir una eficiencia de transfección similar a las muestras no liofilizadas, por lo que la formulación desarrollada confiere eficiente lioprotección.

Posteriormente se realizaron pruebas de estabilidad de los liofilizados de acuerdo con la NOM 073 SSA1-2015 a diferentes condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad y tiempo). La evaluación del producto tras 6 meses de almacenamiento a 25 °C y 60% de HR demostró que la formulación y el proceso de liofilización mantienen estable la estructura física y % de eficiencia de transfección.

A fin de determinar la integridad de los reconstituidos tras su interacción con suero (simulando la post-administración), se determinó la estructura física y el ensamblaje de las nanopartículas utilizando SFB y humano, respectivamente. Se observó que después de 15 minutos de contacto con el suero, la mayor proporción de nanopartículas permanece estable, lo que sugiere que serán capaces de llegar a las células blanco sin ser desensambladas en torrente sanguíneo.

Por otro lado, se realizaron estudios de biodistribución y toxicidad, mediante los cuales se confirmó la seguridad del NTS-poliplex en el vehículo desarrollado y se obtuvieron resultados preliminares de la acumulación y eliminación de las nanopartículas.

Por último, se propuso un proceso de producción escalable, rentable y compatible con buenas prácticas de fabricación, del cual se lograron avances experimentales en cuanto a la producción de plásmido y de acarreador.

Con lo obtenido en este trabajo, se ha logrado un gran avance en la vinculación academia-industria, lo que contribuye a la resolución de problemas de salud tanto a nivel nacional como internacional, lo cual, es uno de los objetivos más importantes de la ciencia y la tecnología.

ABSTRACT

NTS-polyplex is a non viral nanometric system that has been proven to be efficient for targeted delivery of neurotrophic and pro-apoptotic genes. This is why it's a potential treatment for Parkinson disease and some types of cancer, as shown by animal models-based research. However, for its clinical use, it's necessary, in the first place, the development of a safe formulation that is able to confer stability to the system, which is a main challenge due to the instability of these kind of systems. Then, pharmacokinetics and biodistribution studies of NTS-polyplex in the new vehicle are required previously to the performance of clinical studies. And finally, for these studies it's necessary to obtain a certified product that is able for use in humans, so, the design and development of a production process that is scalable, monitorial and adaptable to Good Manufacturing Practices is needed.

Based on this, the objective of this work was to stablish a successful academy-industry entailment with the aim of bridging the gap between experimental research and the clinical application of NTS-polyplex. Thus, NTS-polyplex nanoparticles were characterized, which allowed to establish reference parameters for the evaluation of formulations and a lyophilized pharmaceutical form prototype. Physical form (Electronic Microscopy), particle size (Dynamic Light Dispersion), surface charge (electrophoretic mobility), secondary structure (Circular Dichroism), transfection efficiency (flow cytometry) and *in vitro* e *in vivo* biological functionality (epifluorescence and confocal microscopy) were determined. By using these parameters and methodologies, comparison of characteristics and behavior of NTS-polyplex in the developed clinical formulations vs the research vehicle (culture medium) were made. Once confirmed the comparability between both vehicles, the same parameters were used to evaluate the integrity of NTS-polyplex after lyophilization process, which was developed with the aim of conferring stability and a shelf life for long-term storage of nanoparticles. It was determined that the reconstituted lyophilizates of NTS-polyplex in the clinical vehicle conserve their physical properties and biological functionality, with a transfection efficiency similar to that of non-lyophilized samples.

Subsequently, stability tests of lyophilizates at different storage conditions (temperature, humidity and time) were made. Evaluation of these products after 6 months of storage at 25 °C and 60% relative humidity showed that the developed formulation and the lyophilization process conserve their physical structure and transfection efficiency percentage.

Lately, to evaluate the integrity of reconstituted NTS-polyplex after its interaction with serum (mimicking post-administration), assembly and physical structure of nanoparticles were determined using human or fetal bovine serum. It was demonstrated that after 15 min of interaction with serum, the greater proportion of nanoparticles remain stable, suggesting that they will be able to arrive to target cells without being disassembled in blood stream.

In addition, biodistribution and toxicity tests were carried out. As expected, NTS-polyplex was located in organs that express NTSR1 even in a low density, like digestive tract. Our findings suggest that NTS-polyplex could be mainly cleared by kidneys, and secondly, by reticulate-endothelial system. It was also demonstrated, through kidney and liver damage markers and histocytology, that reconstituted NTS-polyplex and the new vehicle are safe for these tissues.

Finally, it was proposed a production process that is scalable, cost-effective and compatible with Good Manufacturing Practices, from which experimental advances in plasmid and NTS-carrier production were achieved.

With this work, a great advance in academy-industry entailment was accomplished. Our innovation might contribute to solving national and international healthcare problems, which are one of the most relevant objectives of science and technology.

INTRODUCCIÓN

La terapia génica consiste en la introducción de ácidos nucleicos al organismo, los cuales pueden ser: un pDNA que tenga insertado un gen que codifique para una proteína terapéutica; ó siRNAs, que actúen para silenciar la expresión de un gen que se ha vuelto patológica. Al proceso de introducción de material genético a las células se le conoce como transfección.

Estos ácidos nucleicos requieren de un vector para evitar su degradación en el organismo y para facilitar su entrada a las células. La seguridad y eficacia de los sistemas empleados para tal fin depende de varios factores, entre ellos, el tipo de vector que se utilice. Existen básicamente dos tipos: virales y no virales. Las ventajas y desventajas de cada uno se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de vectores virales y no virales para terapia génica

VECTORES VIRALES	VECTORES NO VIRALES
VENTAJAS:	DESVENTAJAS:
<ul style="list-style-type: none"> Alta eficiencia de transfección 	<ul style="list-style-type: none"> Menor eficiencia de transfección
DESVENTAJAS:	VENTAJAS:
<ul style="list-style-type: none"> Inespecificidad de transferencia génica Compromiso inmunológico Posibles efectos mutagénicos y/o carcinogénicos Tamaño limitado del gen a transferir Proceso de producción complejo, costoso y con poca reproducibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> Control de la toxicidad y la respuesta inmune Control de la inserción del material genético No hay limitantes en el tamaño del gen a transferir Transfección de manera dirigida Procesos de producción menos costosos, menos complejos y más reproducibles
EJEMPLOS	
Virus adeno-asociado 2, lentivirus, adenovirus	Poliplexes (pDNA ó siRNA unido a un polímero catiónico), lipoplexes (pDNA ó siRNA unido a lípidos), dendrímeros

De acuerdo con la información anterior, en primera instancia resulta más conveniente el uso y diseño de vectores no virales. No obstante, su desventaja

resulta ser de suma importancia, ya que, si no hay una elevada eficiencia de transfección, la eficacia terapéutica de un vector es muy reducida. En la Figura 1 se esquematizan los tipos de vectores desarrollados hasta el momento para el transporte y/o envío de material nucleico en terapia génica.

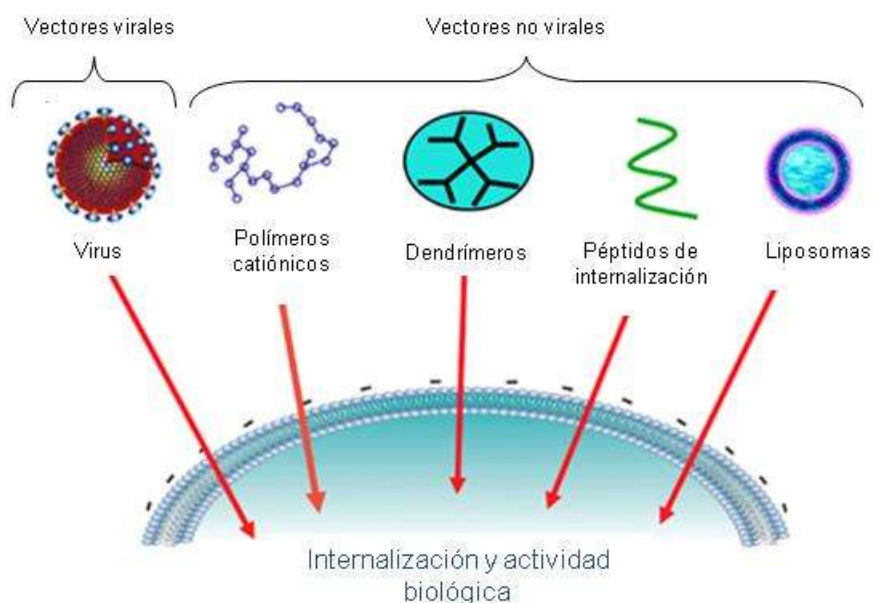


Figura 1. Tipos de vectores utilizados en terapia génica¹

Los mecanismos generales de la transferencia de genes mediada por los vectores no virales están dados por los siguientes pasos: 1) las partículas nanométricas se forman por la combinación de lípidos catiónicos (liposomas o lipoplexes) o polímeros catiónicos con ácidos nucleicos (polioplexes) en una solución acuosa y amortiguada; 2) las nanopartículas de polioplexes se unen a la superficie celular por interacciones electrostáticas no específicas entre los complejos cargados positivamente y la superficie celular cargada negativamente, o se unen a receptores específicos que sufren internalización cuando su ligando los activa; y 3) entran a las células por endocitosis o mecanismos similares. Una vez dentro, el pH del endosoma baja de 7 a 5.5 y parte del ácido nucleico escapa de los endosomas tempranos hacia el citosol. El transporte citoplasmático de los endosomas juega un papel activo en llevar el material transfectado cerca de la región perinuclear². Los mecanismos de escape de endosomas son diferentes, pues dependen del tipo de señales de evasión endosomal que se le asocian a los polioplexes³. Los lipoplexes entran a la célula de manera inespecífica por ser

hidrofóbicos y ser afines a los lípidos de la membrana celular⁴. Los lipoplexes o poliplexes se disocian y el plásmido (pDNA) liberado entra al núcleo por dos vías hipotéticas: a) entrada pasiva de DNA al núcleo durante la división celular cuando la membrana nuclear se desintegra temporalmente; b) transporte activo del DNA a través de los poros nucleares. Estos dos mecanismos no son mutuamente excluyentes en un tipo celular determinado, y se ha demostrado que la estructura de la membrana nuclear y sus mecanismos de importación constituyen una barrera significativa para el envío de genes^{5; 6; 7}.

Se han utilizado diversos materiales para el desarrollo de vectores no virales tipo poliplex; entre ellos, proteínas de unión a DNA como histonas; polímeros catiónicos como poli-L-lisina (PLL), polietilenimina (PEI) (siendo estos dos los más utilizados y caracterizados), ácido poli-(4-aminobutil)-L-glicólico (PAGA), poli(N-isopropilacrilamida) IPAAM, 2-(dimetilamino)etil metacrilato (DMAEMA) y butilmetacrilato (BMA); polímeros basados en carbohidratos como el quitosán; o bien, dendrímeros catiónicos⁷, de los cuales el más utilizado es la poliamidoamina⁸.

Los lípidos catiónicos que se han utilizado para la formación de lipoplexes son principalmente detergentes cuaternarios de amonio, derivados catiónicos de colesterol y diacilglicerol, y derivados alquilados de poliaminas⁹.

Los péptidos de internalización ó CPPs (por sus siglas en inglés: *Cell Penetrating Peptides*) cuentan con una alta densidad de aminoácidos cargados positivamente como lisina o arginina, o tienen secuencias que contienen un patrón alternado de aminoácidos polares y no polares o hidrofóbicos. Estos dos tipos de estructura son conocidos como policatiónico ó anfipático, respectivamente. Y un tercer tipo de CPP son los péptidos hidrofóbicos, los cuales contienen únicamente residuos apolares, con carga neta baja o tienen grupos de aminoácidos hidrofóbicos que son cruciales para la captación¹⁰.

Se han desarrollado diversos acarreadores de genes que corresponden a cada uno de estos tipos y, de acuerdo con su funcionalidad, podrían clasificarse en varios grupos: 1) aquellos que forman complejos condensados con el DNA para protegerlo de nucleasas y otros componentes de la sangre; 2) aquellos diseñados para el envío dirigido a tipos celulares específicos; 3) aquellos diseñados para incrementar el envío de DNA al citosol o al núcleo; 4) aquellos diseñados para disociarse del DNA en el citoplasma, y 5) aquellos diseñados

para liberar el DNA en el tejido para alcanzar una expresión continua o controlada. Los lípidos y polímeros son los más utilizados para el envío de genes¹¹.

El NTS-poliplex es un sistema no viral que cuenta con todas las ventajas de este tipo de vectores, y durante su desarrollo se ha logrado conjuntar las 5 características anteriores en un solo vector, superando así el problema de baja eficiencia de transfección característico de los vectores no virales. La acción de sus nanopartículas estructuradas va dirigida a las células que expresan el receptor a neurotensina tipo 1 (NTSR1), desencadenando la endocitosis mediada por receptor, y cuenta con una serie de elementos que van dando “instrucciones” a la célula para el desensamblaje de nanopartículas y la llegada oportuna del DNA terapéutico al núcleo para su transcripción (ver apartados siguientes).

Estas características, aunadas a su no toxicidad, hacen del NTS-poliplex un tratamiento potencial para la enfermedad de Parkinson (EP) y algunos tipos de cáncer. La transferencia de esta tecnología a la industria y a la clínica implica cumplir con una serie de pasos que se detallarán a continuación.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. El NTS-poliplex

La composición del NTS-poliplex consta básicamente de un pDNA (DNA plasmídico que tiene insertado el gen terapéutico) al que se le han acoplado electrostáticamente dos elementos: 1) un péptido cariofílico (PK) y 2) un acarreador de neurotensina, el cual consta de un péptido fusogénico (PF) y la neurotensina (ligando) unidos covalentemente a un soporte de PLL (conjugado PLL-NTS-PF) (Figura 2A). Esta interacción electrostática da lugar a nanopartículas que tienen una forma tipo toroide (Figura 2B).

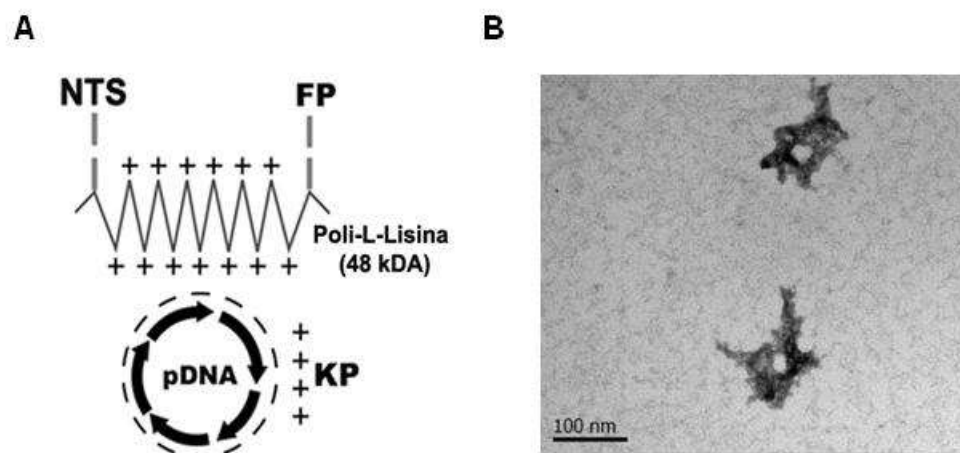


Figura 2. Composición y estructura del NTS-poliplex. A) Representación esquemática de la formación del NTS-Poliplex. El NTS-poliplex consta del acarreador de NTS y el pDNA. El acarreador de NTS se forma por la unión covalente de la poli-L-lisina (PLL) con la neurotensina y el péptido fusogénico (PF) utilizando un agente entrecruzador. La PLL es capaz de unir electrostáticamente al pDNA y éste a su vez puede unir electrostáticamente al péptido cariofílico (PK). El uso de promotores transcripcionales tejido-específicos en el pDNA confiere el segundo punto de especificidad a este sistema de transferencia génica. B) Micrografía representativa de las nanopartículas de NTS-poliplex tomada en un microscopio electrónico de transmisión

Los dominios peptídicos presentes en el NTS-poliplex actúan de manera conjunta para crear un mecanismo de acción que consiste en los siguientes eventos celulares involucrados en la transferencia génica (Figura 3): 1) endocitosis tras la interacción de la neurotensina del NTS-poliplex con el NTSR1 de las células blanco; 2) escape del endosoma por medio del PF, evitando así su

degradación por la alta acidez y las enzimas endosomales; 3) transporte del pDNA al núcleo a través del PK; 4) expresión del gen/proteína terapéutico(a).

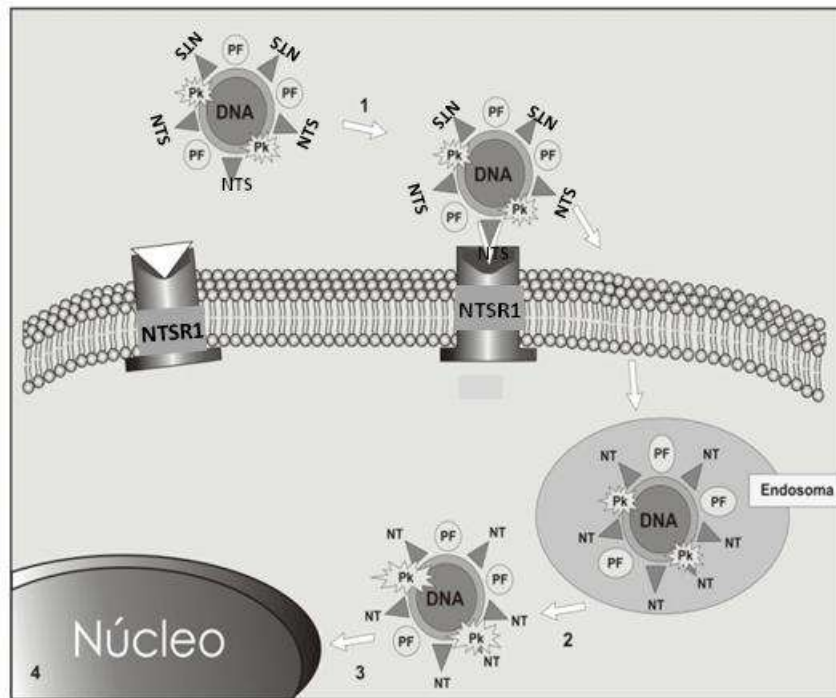


Figura 3. Mecanismo de acción del NTS-poliplex. El NTSR1 es activado por NTS que está presente en el NTS-poliplex, induciendo su internalización. En el endosoma, el PF induce el rescate oportuno del NTS-poliplex de la vesícula endocítica, provocando su liberación al citoplasma. En el citoplasma, el PK interviene en el direccionamiento del pDNA hacia el núcleo celular en donde se lleva a cabo la transcripción del transgén que puede estar regulado por un promotor tejido-específico. *NTSR1*: Receptor de Neurotensina de Alta Afinidad 1; *Pk*: Péptido cariofilico; *PF*: Péptido Fusogénico *NTS/NT*: Neurotensina

Estas características convierten al NTS-poliplex en un sistema específico y eficaz para el envío dirigido de genes a células que expresan el NTSR1, con el fin de tratar padecimientos donde estén involucrados estos tipos celulares.

1.2. Abordajes terapéuticos

1.2.1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son ocasionadas por la muerte y/o pérdida progresiva de la estructura y función de células neuronales. Entre este

tipo de enfermedades se encuentran la esclerosis lateral amiotrófica, Enfermedad de Parkinson (EP), Alzheimer y Huntington; siendo la EP y Alzheimer las más comunes. A la fecha, este tipo de enfermedades es incurable. Sin embargo, a medida que la investigación relacionada con ellas progresa, aparecen muchas similitudes que pueden ligarlas en un nivel subcelular, lo que brinda la esperanza de desarrollar terapias que sean capaces de combatir varias de estas enfermedades. Hay diversos paralelismos entre los diferentes desórdenes neurodegenerativos, siendo los más comunes el ensamblaje atípico de proteínas y la muerte celular inducida.

En el sistema nervioso central, el NTSR1 se expresa en *substantia nigra*, área tegmental ventral, núcleo amigdalóideo, estriado y cortezas entorrinal y prefrontal^{12; 13}. En diversas enfermedades neurodegenerativas, la población neuronal de estas áreas cerebrales se ve afectada; sin embargo, hay una porción de neuronas que sobrevive y conserva la expresión de NTSR1. Estas células son blanco para el NTS-poliplex; y una vez transfectadas, generarán la proteína terapéutica que ejercerá su efecto en las mismas células y en las zonas aledañas, obteniéndose un efecto terapéutico significativo.

Enfermedad de Alzheimer

El *World Alzheimer report 2015* postula que existen 46.8 millones de casos de demencia a nivel mundial y las proyecciones para el 2030 y 2050 son de 74.7 y 131.5 millones respectivamente.

Actualmente no existe cura para la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, los tratamientos medicamentosos y no medicamentosos pueden contribuir a mejorar los síntomas cognitivos y los trastornos de la conducta. Actualmente, se están buscando nuevos tratamientos para alterar el curso de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de la gente que la padece.

Neurológicamente, el Alzheimer se caracteriza por la pérdida de neuronas y sinapsis en la corteza cerebral y ciertas regiones subcorticales del cerebro. Esta pérdida provoca una atrofia importante de las regiones afectadas, incluyendo la degeneración en el hipocampo, lóbulos temporal y parietal, así como partes de la corteza frontal y el giro cingulado.

Se ha encontrado que en la enfermedad de Alzheimer, la expresión del NTSR1 en el lóbulo temporal está significativamente reducida¹⁴. Asimismo, se ha demostrado un efecto protector importante de la neurotensina a través de su interacción con el NTSR1 en un modelo murino de isquemia focal cerebral¹⁵.

A la fecha no se ha explorado experimentalmente el posible uso del NTS-poliplex en la enfermedad de Alzheimer; sin embargo, parte de las células y regiones aledañas que se ven afectadas en esta enfermedad expresan NTSR1, por lo que podría tratarse de otro blanco para las nanopartículas de NTS-poliplex.

Enfermedad de Parkinson

La prevalencia de la Enfermedad de Parkinson (EP) asciende de 0.3% en la población general de EEUU a 1 - 2% en personas de 65 años o más; algunos datos indican una prevalencia de 4 - 5% en individuos mayores de 85 años¹⁶. A nivel mundial hay 6.3 millones de personas afectadas por la EP¹⁷. Las estadísticas sugieren que, sin importar la raza, los hombres son más susceptibles a la EP que las mujeres, con una proporción de 3 a 2 en el rango de 60 a 69 años de edad. Sin embargo, en el caso de personas mayores de 75 años, la enfermedad afecta a ambos sexos de manera equitativa¹⁸. La edad promedio en la cual aparecen los síntomas es de 60 años, aunque en el 10% de los casos los síntomas se han presentado antes o a partir de los 45 años de edad. Éste último grupo padece lo que se conoce como EP "juvenil". En los EEUU hay actualmente más de un millón de personas diagnosticadas con EP. Esta cifra supera a la suma de casos totales de esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y distrofia muscular. Alrededor de 40,000 casos de EP son diagnosticados anualmente, lo cual, por definición, no incluye los miles de casos nuevos que no han sido detectados¹⁹. En la figura 4 se muestra una proyección del porcentaje de pacientes con EP al año 2030 en las naciones con mayor densidad de población. Se estima que en México la EP afecta a medio millón de personas; sin embargo, hasta 56 % de los pacientes diagnosticados con esta enfermedad no la tienen, de acuerdo con la investigadora Selva Rivas

Arancibia, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México²⁰.

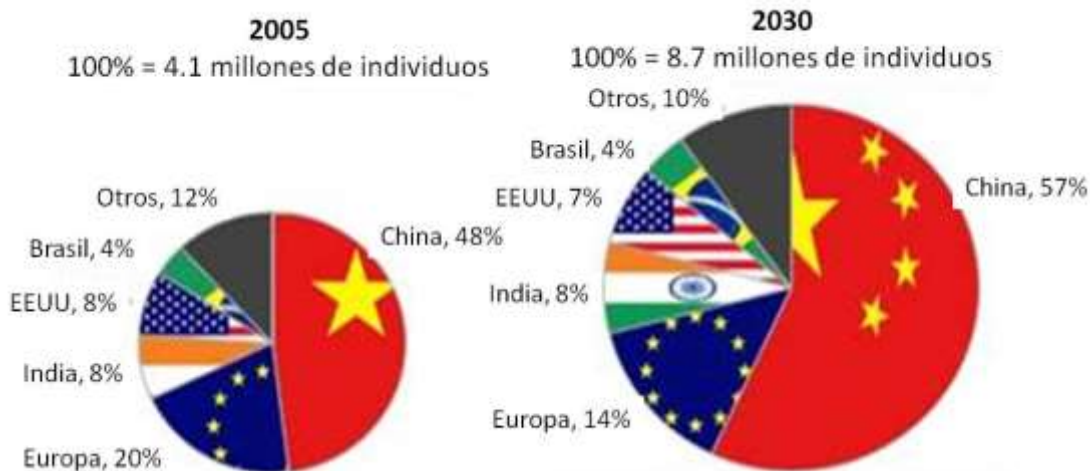


Figura 4. Proyección de incidencias de Enfermedad de Parkinson. Distribución de individuos de más de 50 años con EP en los años 2005 y 2030, tomando en cuenta diez de las naciones más pobladas a nivel mundial y cinco de Europa del Este²¹

Entre un 5 y 10% de los pacientes con EP tienen una forma familiar o hereditaria de parkinsonismo y alrededor del 90% de los casos aparentemente son esporádicos. A pesar de la intensa investigación genética y de toxicología ambiental, hasta la fecha no se conocen los mecanismos patogénicos exactos causantes de la pérdida selectiva de células dopaminérgicas en la *substantia nigra*. Lo que se sabe actualmente es que ocurren diversos eventos fisiológicos como la disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y mal funcionamiento de proteínas que juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. En el caso de la EP esporádica estos procesos son inducidos principalmente por factores ambientales, sin embargo estos podrían actuar en conjunto con la probable susceptibilidad de algunos genes determinantes en dichos procesos. También se ha reportado que una reducción en la capacidad de sobre-expresar factores tróficos en respuesta al estímulo nocivo podría remover un importante mecanismo de defensa natural y contribuir así a la degeneración celular²².

La mayoría de los pacientes con EP presenta los siguientes signos: temblor en los brazos, mandíbula, piernas y cara; rigidez de extremidades y tronco; acinesia (dificultad para iniciar el movimiento); bradiscinesia (lentitud de movimiento); inestabilidad de la postura, o deterioro en el equilibrio y

coordinación. Estos pacientes también pueden experimentar una variedad de síntomas no motores, incluyendo depresión, deterioro cognitivo, psicosis, alucinaciones, conductas compulsivas, somnolencia excesiva durante el día, hipotensión ortostática, síntomas gastrointestinales, constipación, disfunción urinaria y sexual, cambios en la manera de hablar, problemas cutáneos, dolor y dificultad para masticar y deglutir¹⁹.

Actualmente los tratamientos para la EP son de dos tipos: farmacológicos y quirúrgicos. Ninguno de estos es capaz de detener el progreso de la enfermedad ni de curar de manera definitiva su sintomatología. Aunado a esto, los pacientes generalmente presentan efectos adversos a corto, mediano y largo plazo con cualquiera de estas estrategias. La elección del tratamiento depende del estadio clínico de la EP y los objetivos que se quieran alcanzar, que son principalmente la recuperación del control motor para mejorar la calidad de vida.

El NTS-poliplex es un tratamiento potencial para evitar la progresión de la EP y proveer recuperación funcional del sistema dopaminérgico nigroestriatal (tratamiento neurotrófico). La molécula diana de las nanopartículas de NTS-poliplex, el NTSR1, pertenece a la gran superfamilia de receptores acoplados a la proteína G y, en conjunto con la neurotensina, regula múltiples funciones, como regular la presión arterial, los niveles de azúcar, la temperatura corporal, la movilidad y secreción intestinal y antinocicepción¹⁴. Las neuronas dopaminérgicas que se ven afectadas en la EP están localizadas específicamente en la *substantia nigra compacta*, que es la fuente de innervación al estriado, conformando la “ruta dopaminérgica nigroestriatal” en el cerebro (Figura 5). Estas neuronas contienen la más alta densidad de NTSR1 en el cerebro^{13; 23}, lo que las hace blanco para su tratamiento con NTS-poliplex. Además, la EP generalmente es diagnosticada cuando la cantidad de células dopaminérgicas de la SNc que se han perdido es de alrededor del 50-60% de la población inicial, lo que indica que el 40-50% restante puede transfectarse ya que conservan la expresión del NTSR1. Las técnicas de FD-PET (del inglés *Fluorodeoxyglucose (¹⁸F) - Positron Emission Tomography*) y -CIT-SPECT (del inglés *-Carbomethoxy-3β-(4-Iodophenyl) nortropane ([¹²³I]) - Simple Photon Emission Computed Tomography*) demuestran que hay una pérdida anual del 5-10% en la innervación estriatal en pacientes con EP temprana, sugiriendo que la

neurodegeneración dopaminérgica se puede detectar en una etapa temprana para iniciar el tratamiento neurotrófico y evitar el proceso progresivo en estos pacientes²⁴. Todo esto hace de las neuronas dopaminérgicas los blancos ideales para el tratamiento con el NTS-poliplex, empleando algún gen neurotrófico que evite la muerte y degeneración de estas células y provea regeneración funcional.

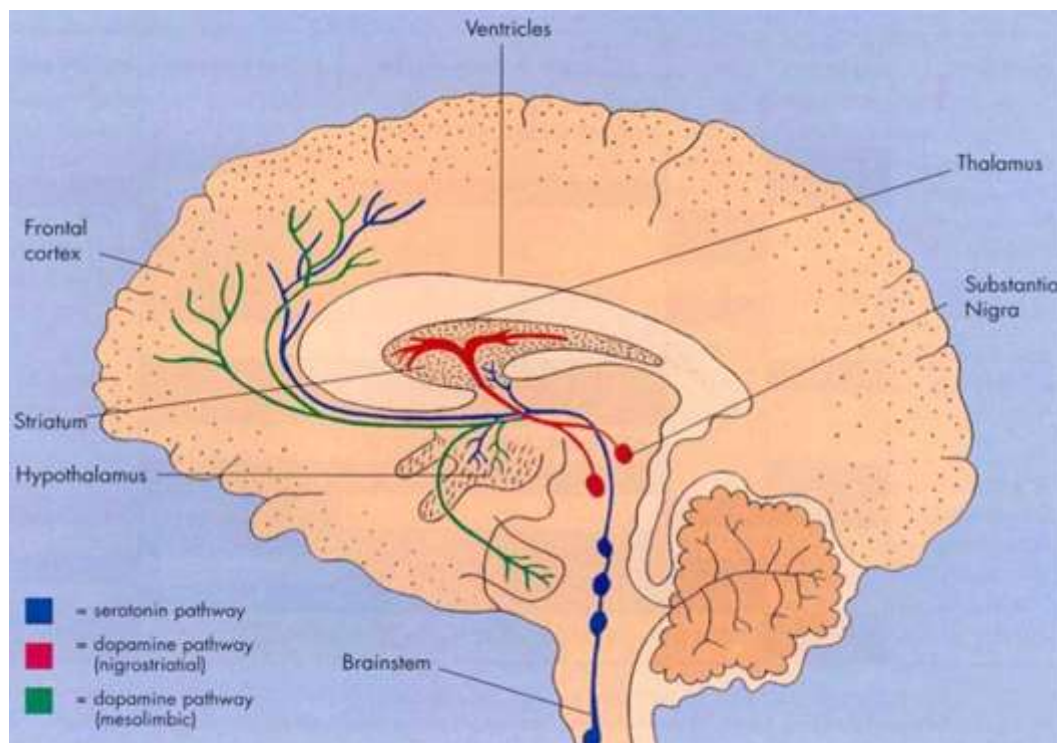


Figura 5. Rutas dopaminérgicas en el cerebro humano²⁵

Actualmente se ha demostrado experimentalmente que la terapia neurotrófica es una alternativa terapéutica con efectos neuroprotectores y neuroregeneradores eficientes en el tratamiento de la EP. Esta terapia ha sido capaz de detener la progresión de la EP en etapas temprana y avanzada del modelo animal; además de revertir las alteraciones motoras generadas por la EP experimental²². Experimentalmente se ha demostrado la funcionalidad de factores neurotróficos recombinantes tales como el Factor Neurotrófico Derivado de la Glia (GDNF, por *Glial Derived Neurotrophic Factor*), Neurturina (NTRN), Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF, por *Brain Derived Neurotrophic Factor*) y Factor Neurotrófico Dopaminérgico Conservado (CDNF, por *Conserved Dopaminergic Neurotrophic Factor*), siendo estos capaces de mantener la supervivencia de células dopaminérgicas en ensayos *in vitro* e *in vivo* y

recuperar la inervación funcional al estriado, restaurando así la ruta dopaminérgica nigroestriatal²⁶.

Se han realizado estudios clínicos utilizando infusiones de GDNF^{27; 28} y BDNF recombinantes o terapia génica con virus adenoasociados que transducen el gen para la NTRN²⁹. En el caso de GDNF se observaron beneficios terapéuticos significativos cuando éste se administró vía intraputamina con cirugía estereotáxica de manera crónica utilizando bombas de perfusión implantadas en el tejido subcutáneo de la región abdominal o del área subfacial (lo cual es altamente invasivo)²⁷. Sin embargo, en otro esquema donde se administró mensualmente no hubo resultados benéficos significativos, debido probablemente a la baja concentración disponible de GDNF recombinante en el sitio de acción²⁸. Por otro lado, se han realizado estudios clínicos administrando el gen de NTRN a través de un vector viral (virus adenoasociado 2) en el núcleo putamina. No se obtuvieron resultados satisfactorios en ensayos doble ciego a 12 meses y se presentaron efectos adversos serios en 13 de 38 pacientes. Los autores de este reporte sugieren que el direccionamiento de tratamiento a la SNc podría proveer una solución a este tipo de abordaje²⁹. Asimismo, las características intrínsecas de los vectores virales representan probables causas de esta falta de éxito. En la figura 6 se presentan las fases a las que han llegado las pruebas de funcionalidad que involucran terapia génica con factores neurotróficos.

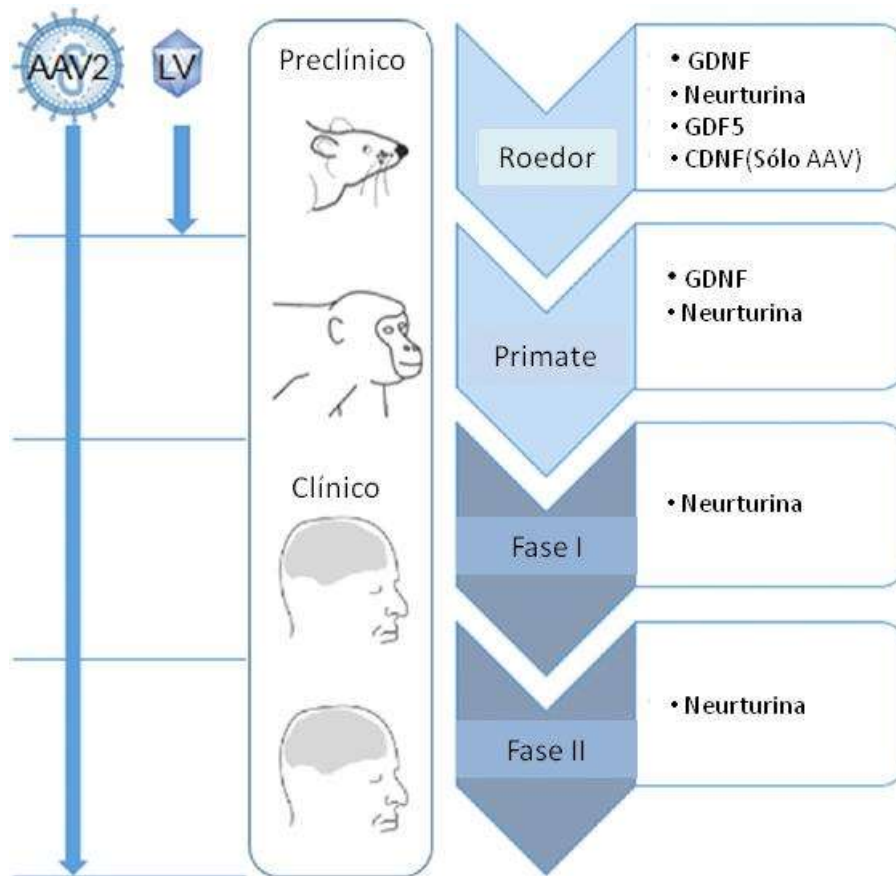


Figura 6. Resumen de las fases de desarrollo de terapia génica para Enfermedad de Parkinson utilizando factores neurotróficos y vectores virales. AAV2: vector viral (virus adeno-asociado2); LV: vector viral (lentivirus); GDF5: Factor 5 de crecimiento y diferenciación³⁰

Por todo esto, es necesario el desarrollo y optimización de vectores no virales para su administración en la terapia génica específica y dirigida, que mejoren la eficiencia de transfección de genes para factores neurotróficos con efectos adversos mínimos o nulos.

Se ha demostrado la capacidad terapéutica del NTS-poliplex en la transferencia de los genes que codifican para GDNF³¹ o BDNF³² en ratas con hemiparkinson agudo, generadas por la inyección unilateral de la neurotoxina 6-OHDA en el núcleo estriado. Una semana después de inducir la neurodegeneración, al transfectar las neuronas dopaminérgicas de la SNc del lado lesionado con el gen que codifica para GDNF humano más un flag para descartar el GDNF endógeno, se demostró la expresión de este transgén en las neuronas dopaminérgicas nigrales de las ratas hemiparkinsonianas (Figura 7).

Estudios de los efectos terapéuticos del NTS-poliplex en estas ratas han demostrado la recuperación total de los niveles de dopamina y la restauración de

la inervación dopaminérgica en el estriado y en forma parcial en la SNc del lado lesionado, además de la sobrevivencia de una proporción significativa de neuronas dopaminérgicas en la SNc, en comparación con animales control lesionados³¹.

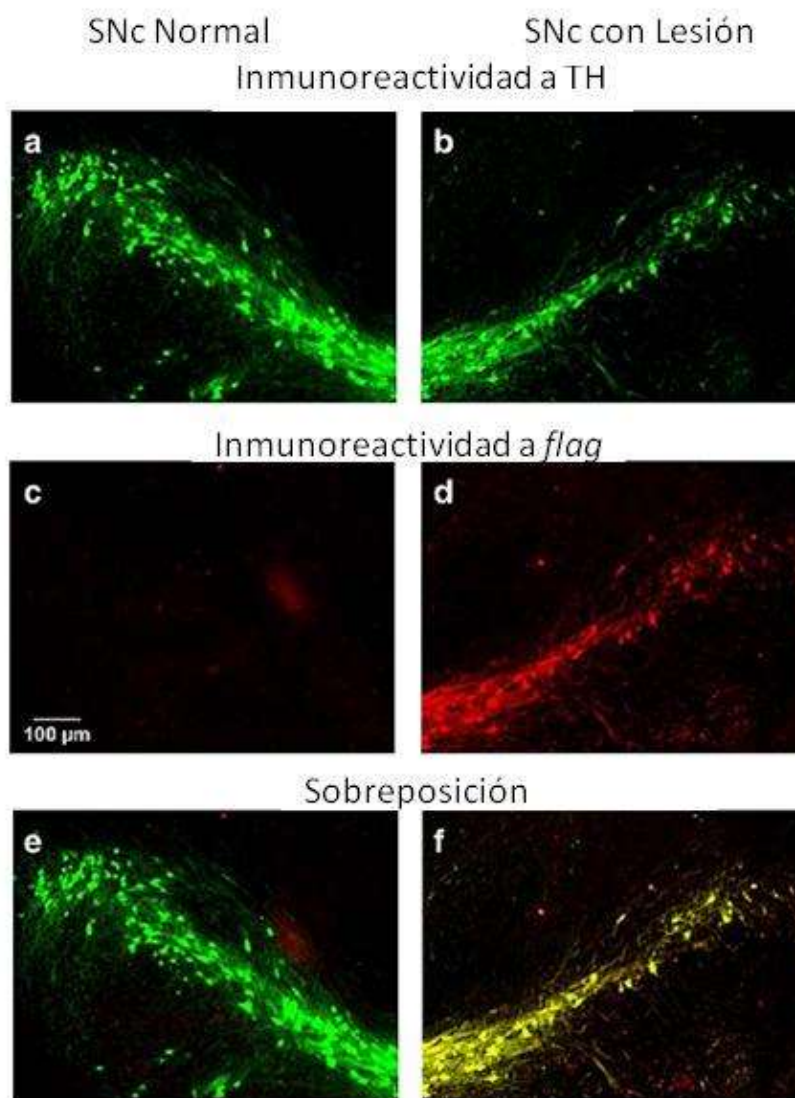


Figura 7. Expresión de hGDNF-flag en neuronas dopaminérgicas positivas a tirosina-hidroxilasa. Cortes de la SNc de ratas hemiparkinsonianas a 3 semanas de la transfección intranigral de pEF-Bos-hGDNF-flag utilizando el NTS-poliplex. Canal verde: neuronas dopaminérgicas tirosina hidroxilasa (TH) positivas; Canal rojo: hGDNF-flag. Los pares *a - b*, *c - d*, y *e - f* corresponden al mismo nivel nigral. La barra de calibración es válida para todas las imágenes³¹

Por otro lado, se ha demostrado que la transfección del hGDNF mejora las alteraciones motoras de la marcha sin restricción y reduce significativamente ($80 \pm 5\%$) la conducta de giro inducida por anfetamina o apomorfina. Todos estos resultados en conjunto sugieren que la transfección del gen hGDNF con el NTS-

poliplex detiene la progresión de la neurodegeneración inducida por 6-OHDA en el sistema dopaminérgico nigroestriatal y promueve su recuperación funcional³¹. Resultados similares se han obtenido con la transfección de otros genes de factores neurotróficos como el BDNF³² y hCNDF³³ en la SNc de ratas hemiparkinsonianas, lo que corrobora que el NTS-poliplex en conjunto con genes que codifican factores neurotróficos que actúan sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNc puede ser aplicado de manera exitosa en el tratamiento de la EP.

Para simular el posible uso de la terapia neurotrófica en la situación clínica, se ensayaron las nanopartículas de NTS-poliplex con el gen BDNF en el modelo de la EP crónica en combinación con un agonista para el receptor D3 (7-OH-DPAT). La combinación se seleccionó porque el BDNF³⁴ y la activación del receptor D3 contribuyen significativamente en el mantenimiento y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas³⁵. El estudio se realizó en ratas Wistar macho de un año de edad cuando se realizó la lesión estriatal con 6-OHDA. Cinco meses después de la lesión, las ratas se transfectaron con las nanopartículas de NTS-poliplex con el gen BDNF-flag en la SNc y se inició el tratamiento con 7-OH-DPTA infundido intraperitonealmente por bombas osmóticas durante 4½ meses. Dos meses y medio después de haberse suspendido el tratamiento farmacológico, las ratas se sacrificaron para realizar los estudios moleculares y celulares. Periódicamente se hicieron las evaluaciones conductuales y los registros electromiográficos. Los resultados mostraron que la sobre expresión del BDNF-flag en las ratas que recibieron el agonista D3 normalizaron su marcha y la coordinación motora, además se les eliminó la rigidez motora. La recuperación motora estuvo asociada con el aumento en el número de neuronas de la SNc, en la inervación al estriado y en el número de espinas dendríticas de las neuronas estriatales³⁶. Por lo tanto, la combinación de la administración única de las nanopartículas de NTS-poliplex con el gen BDNF-flag con la activación crónica del receptor D3 de dopamina es un tratamiento prometedor que ofrece restaurar las neuronas dopaminérgicas en la EP. El hecho de que las neuronas dopaminérgicas sobrevivientes sean capaces de expresar BDNF^{37; 38} y expresen TrKB³⁹ sugiere fuertemente que estas neuronas mantienen su capacidad de responder a la estimulación de BDNF y, en consecuencia, predice el éxito de la

terapia neurotrófica combinada con la nanopartículas de NTS-poliplex con el gen BDNF-flag y un agonista D3.

En resumen, actualmente se cuenta con 4 diferentes innovaciones de las nanopartículas de NTS-poliplex que constituyen el repertorio terapéutico para la EP.

1.2.2. Cáncer

Se ha reportado que el NTSR1 se encuentra sobreexpresado en algunas células tumorales provenientes de tejidos que naturalmente expresan el NTSR1^{40; 41}. Además, el NTSR1 se expresa *de novo* en células tumorales de tejido que carecen de dicho receptor en el estado sano como en el cáncer de pulmón⁴² y de mama⁴³. De hecho, se ha correlacionado la presencia y cantidad de este receptor con el grado de malignidad y mal pronóstico de cáncer^{44; 45; 46}. A la fecha, se ha descrito la presencia de este receptor en cantidades considerables en tumores primarios de neuroblastoma^{41; 47; 48}, mama^{43; 49}, células no pequeñas de pulmón⁴², próstata⁵⁰, colon^{40; 51; 52; 53}, mesotelioma⁵¹, astrcitoma, meduloblastoma, meningioma, sarcoma de Ewing y carcinoma medular tiroideo⁵⁴. Esto es de gran relevancia, ya que estas células tumorales se convierten en un blanco ideal para el tratamiento con el NTS-poliplex, en combinación con algún gen terapéutico cuya función sea desencadenar los mecanismos de muerte celular.

En los siguientes apartados se abordarán con más profundidad estos padecimientos y el papel del NTS-poliplex en su posible tratamiento.

Epidemiología y tratamiento del cáncer

“Cáncer” es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de “tumores malignos” o “neoplasias malignas”. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o

propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer⁵⁵.

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo alrededor de 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años⁵⁵. En 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en el hombre fueron los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado; mientras que en la mujer fueron los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago.

Los principales tipos de cáncer a nivel global son los siguientes⁵⁵:

- pulmonar (1,59 millones de defunciones);
- hepático (745 000 defunciones);
- gástrico (723 000 defunciones);
- colorrectal (694 000) defunciones;
- mamario (521 000 defunciones);
- cáncer de esófago (400 000 defunciones).

Los tratamientos actuales contra cáncer son sumamente agresivos y costosos. La figura 8 esquematiza los más comunes:



Figura 8. Opciones actuales de tratamiento para el cáncer⁵⁶

Con excepción de la terapia dirigida, todos estos tratamientos no son específicos y representan un riesgo importante de disminución de la calidad de vida del paciente en caso de que sean exitosos para controlar el cáncer. La terapia dirigida está constituida básicamente por anticuerpos monoclonales y factores estimulantes de hematopoyesis, los cuales sirven de “apoyo” al sistema

inmune para combatir a los tumores; sin embargo, generalmente son administrados como complemento de alguna de las terapias anteriores.

Es por esto que el encontrar un tratamiento para esta enfermedad es de suma importancia para resolver uno de los principales problemas de salud pública y de calidad de vida a nivel mundial.

Genes terapéuticos para el tratamiento de cáncer con el NTS-poliplex

En contraste con el caso del tratamiento de la EP con NTS-poliplex y factores neurotróficos para contribuir a la supervivencia y regeneración celular, para el tratamiento del cáncer el gen terapéutico debe atacar las células tumorales, las cuales serán transfectadas debido a la sobreexpresión de NTSR1 en su superficie.

Para este fin se puede utilizar lo que se conoce como “genes suicidas”, los cuales son un tipo de genes manipulados en el laboratorio con el fin de inducir muerte celular. En este caso, la proteína expresada por el gen suicida activa a un fármaco exógeno que induce la apoptosis en las células cancerosas transfectadas, pero no en las células sanas. Un ejemplo es el sistema suicida con el gen para HSV-TK (timidina cinasa del virus del herpes simplex I) – Ganciclovir (GCV). En este sistema, la proteína HSV-TK que se expresa en las células transfectadas, resulta inofensiva para las células sanas y cancerosas pero, cuando se pone en contacto con el agente antiviral GCV, lo transforma en una sustancia bioactiva que activará la apoptosis en las células cancerosas que expresan HSV-TK. Este efecto puede extenderse hacia las células cancerosas vecinas que se interconectan por uniones comunicantes, ya que la sustancia tóxica entrará en contacto con ellas desencadenando también la apoptosis. Este proceso se conoce como “*bystander*”⁵⁷ (Figura 9).

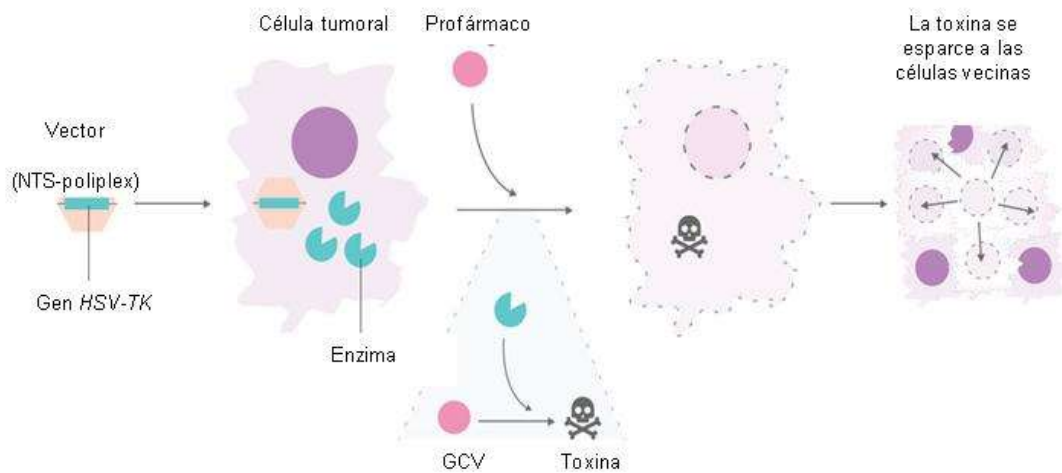


Figura 9. Proceso de la terapia génica con un gen suicida (sistema HSV-TK / GCV) y efecto bystander⁵⁸

Por otro lado, también podrían utilizarse como genes terapéuticos para el tratamiento del cáncer, genes supresores de tumor, o bien, genes letales. Se han hecho estudios con este tipo de genes. Por ejemplo, el gen GAS1 es un gen supresor de tumores putativo que bloquea la entrada a la fase S (síntesis de DNA) del ciclo celular y previene así la proliferación celular⁵⁹.

En el siguiente apartado se abordará lo que a la fecha se ha realizado utilizando el NTS-poliplex y estos sistemas para el tratamiento de cáncer en modelos animales.

Aplicación del NTS-poliplex para el tratamiento de cáncer en modelos animales

El grupo del Dr. Martínez Fong ha aplicado el NTS-poliplex en conjunto con el sistema suicida HSV-TK / GCV vía intravenosa e intratumoral en un modelo murino de neuroblastoma, obteniendo una reducción en el tamaño de los tumores de entre 30 y 50% en comparación con el grupo control (figura 10A).

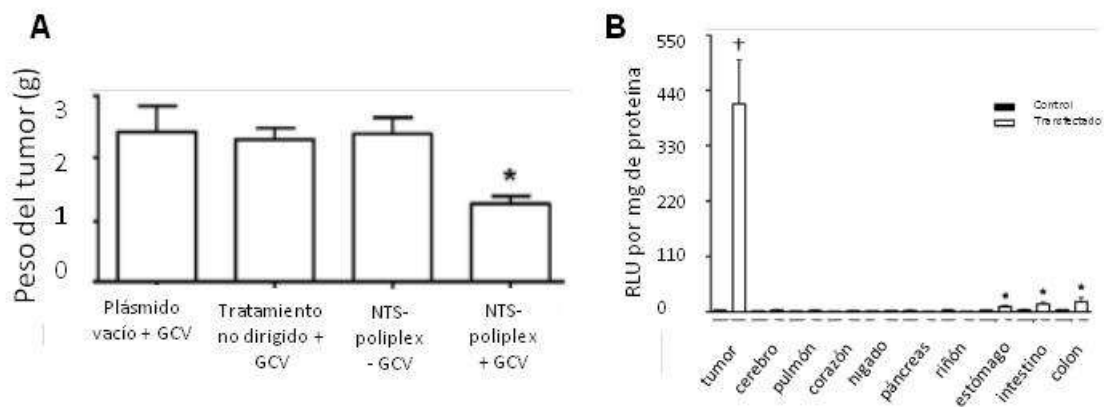


Figura 10. Tratamiento de cáncer en un modelo murino de neuroblastoma, A) Reducción del tamaño tumoral después de la transfección intratumoral con NTS-poliplex / HSV-TK y la administración de GCV. B) Actividad de luciferasa en órganos y neuroblastoma después de la administración sistémica de NTS-poliplex / pLUC (pDNA con el gen que codifica para luciferasa como gen reportero)⁶⁰ (adaptación de las figuras 5 y 8)

Asimismo, en este modelo se demostró la capacidad que tiene el vector de transfectar de manera específica las células tumorales en una administración sistémica, por medio de ensayos de actividad de luciferasa efectuados en órganos periféricos y en el tumor⁶⁰ (figura 10B).

Por otro lado, Castillo y colaboradores⁶¹ trabajaron con la línea celular MDA-MB-231, la cual proviene de tumores humanos de cáncer de mama triple negativos, siendo un subtipo muy agresivo y sin tratamiento específico. En ensayos *in vitro*, se demostró que la transfección de esta línea celular con el NTS-poliplex utilizando el sistema HSV-TK / GCV es dependiente de la activación de NTSR1, y se observó el decremento en la viabilidad celular en alrededor de un 49% debido al mecanismo de apoptosis desencadenado por la expresión del gen HSV-TK y la adición de GCV. Posteriormente, los autores realizaron un modelo murino de cáncer de mama triple negativo a través del xenoinjerto de esta línea celular en ratones atímicos, y se aplicó un esquema de tratamiento tanto vía intratumoral como sistémica utilizando el NTS-poliplex / gen HSV-TK / ganciclovir. Ambas vías de administración permitieron la llegada y transfección de las nanopartículas de NTS-poliplex al tumor. La expresión de HSV-TK y el GCV desencadenaron la apoptosis y se inhibió significativamente el crecimiento del tumor (55-60%); el peso de los tumores transfectados con el gen HSV-TK fue un 55% menor al de los tumores control. Asimismo, se observó que

la transfección intravenosa no indujo apoptosis en órganos periféricos, lo que apoya la inocuidad del sistema HSV-TK/GCV y del NTS-poliplex⁶¹.

De igual forma, actualmente se está llevando a cabo un estudio en el que se prueba la eficiencia del NTS-poliplex en conjunto con el gen Gas1 para el tratamiento de cáncer de pulmón, utilizando un modelo murino con xenoinjerto de un cultivo de una línea celular proveniente de un tumor primario de pulmón humano, sumamente agresiva y resistente.

Los hallazgos anteriores sugieren que el NTS-poliplex es un sistema eficaz para el envío específico de genes terapéuticos para combatir tumores que cuenten con una alta densidad del receptor a neurotensina, garantizando la regresión de los mismos sin los efectos adversos que tienen los tratamientos actuales.

1.3. ¿Qué se requiere para que una formulación de NTS-poliplex pueda utilizarse como tratamiento clínico en humanos?

El proceso para que un medicamento se encuentre en el mercado es largo y complejo. A continuación se muestra un esquema que resume a grandes rasgos las etapas para que esto suceda, desde el surgimiento de la idea hasta la comercialización.

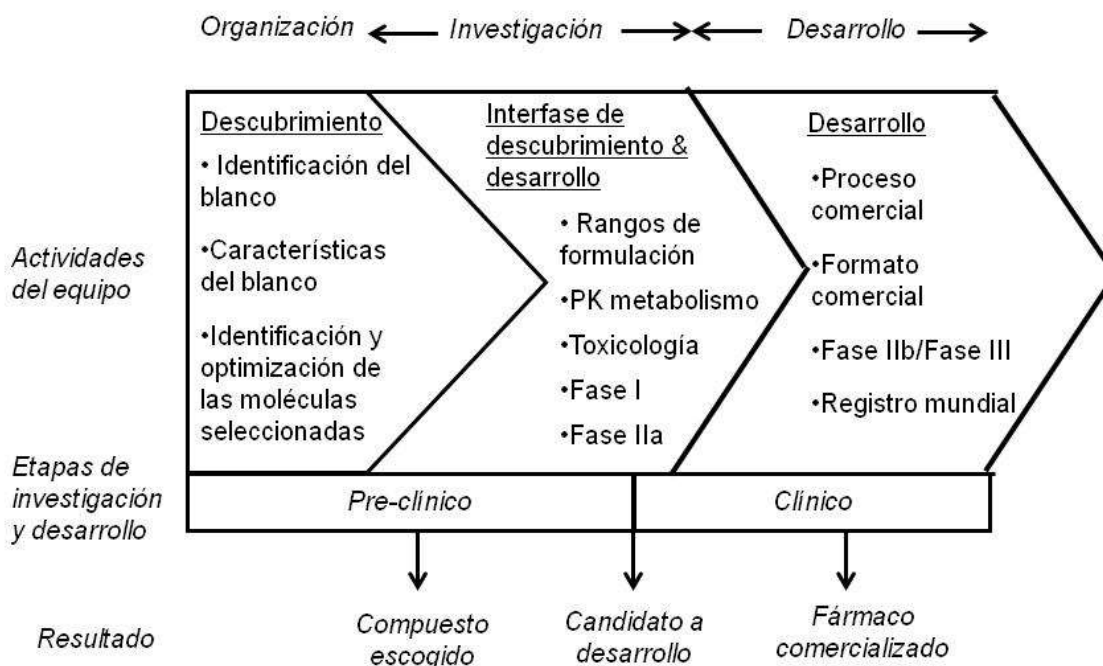


Figura 11. Un modelo para la interfase de descubrimiento y desarrollo⁶²

En el caso de formulaciones de poliplexes, que son medicamentos no convencionales, debe agregarse, además, una etapa para el diseño, desarrollo y transferencia de un proceso de producción que sea rentable, escalable y adaptable a las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF).

A la fecha, en el caso del NTS-poliplex, hay puntos de partida que es necesario considerar para dar cumplimiento y/o seguimiento al proceso descrito para su aplicación clínica. A continuación se enlistan los más importantes:

- Los ensayos se han desarrollado utilizando medio de cultivo celular *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) como vehículo del NTS-poliplex. En algunos ensayos *in vitro*, a este vehículo se le adiciona Suero Fetal Bovino (SFB). Su uso exclusivo en ensayos *in vitro* se debe a la alta inmunogenicidad que lo caracteriza, por lo que su empleo en un vehículo se descarta para fines clínicos. Por otro lado, el DMEM convencional es un medio formulado y fabricado para uso en cultivos celulares y en experimentación (ensayos *in vivo*). La adquisición de DMEM para uso clínico encarecería considerablemente un producto farmacéutico.
- Los componentes del DMEM interfieren significativamente con los instrumentos empleados en algunas metodologías que se utilizan para la

caracterización de los poliplexes, lo cual dificultaría la ejecución de futuras pruebas eficaces y rápidas para el control de calidad en la producción de lotes de NTS-poliplex.

- El NTS-poliplex, al igual que otros sistemas de lipoplex y poliplex, son altamente inestables en suspensión, por lo que, actualmente, su preparación debe ser inmediatamente antes de la administración. Esto hace poco viable su aplicación clínica y comercialización.
- A la fecha, se han realizado pruebas de toxicidad y estudios preliminares de biodistribución del NTS-poliplex utilizando como vehículo el DMEM. Sin embargo, deben realizarse y ampliarse estos estudios utilizando un vehículo apto para el uso clínico.
- No se cuenta con una metodología de producción que sea escalable y adaptable a buenas prácticas de fabricación de las nanopartículas y componentes del NTS-poliplex, lo que es indispensable para el registro de cualquier medicamento, e incluso, para su entrada a estudios clínicos en humanos.

Considerando todos estos puntos y la serie de pasos mencionados para el lanzamiento de un nuevo medicamento, los cuales son compatibles con los marcos normativos internacionales para productos biológicos / biotecnológicos (FDA y EMA) y nacionales (Cofepris), los primeros y principales pasos que deben realizarse para el NTS-poliplex son, en primer lugar, el desarrollo de una formulación segura que no comprometa la eficacia de las nanopartículas y que les brinde una estabilidad que haga posible una vida de anaquel.

Para desarrollar esta formulación es fundamental el contar con una amplia caracterización de las nanopartículas, lo cual permitirá evaluar su comportamiento en diferentes vehículos, y tras la aplicación de procesos que puedan darle mayor estabilidad, como la liofilización.

Posteriormente, es necesario describir el comportamiento del NTS-poliplex en el nuevo vehículo tras su administración para garantizar que, a nivel sistémico, a pesar de las cargas que aportan proteínas séricas, se mantenga íntegro y sea capaz de llegar al sitio de acción para obtener el efecto deseado.

De igual forma, es necesario verificar la seguridad del nuevo vehículo y del NTS-poliplex/vehículo mediante ensayos de toxicidad y biodistribución. Los últimos, deben describir posibles vías de eliminación de las nanopartículas y probables acumulaciones en órganos periféricos (administración sistémica).

Una vez confirmado que el nuevo vehículo es apto para el uso clínico, se requiere del diseño y planeación de un proceso que permita producir el NTS-poliplex y cada uno de sus componentes a mayor escala llevando un control de calidad adecuado y cumplir con las buenas prácticas de fabricación, sin comprometer la rentabilidad del mismo.

En los siguientes apartados se describirán más a detalle cada uno de los pasos mencionados anteriormente.

1.4. Caracterización de los poliplexes

Existen diversas metodologías para obtener parámetros que permitan evaluar las características de estas nanopartículas. En la siguiente tabla se resumen las más importantes y los métodos y/o tecnologías utilizados que permiten su obtención.

Tabla 2. Características de los vectores no virales y las metodologías más comunes para su determinación

CARACTERÍSTICA	METODOLOGÍAS EMPLEADAS MÁS COMÚNMENTE
Funcionalidad biológica in vitro (transfección de líneas celulares) e in vivo (administración en animales)	Microscopía confocal o de epifluorescencia
	Inmunocitoquímica / Inmunohistoquímica o inmunofluorescencia
	RT-PCR
Eficiencia de transfección	Citometría de flujo
Forma física	TEM, SEM, AFM
Patrones de aglomeración	TEM, SEM, AFM
Estructura secundaria	DC
Tamaño de partícula	DDL, SEM, TEM
Distribución de tamaño de partícula	DDL
Carga de superficie y distribución de la misma	Movilidad electroforética
Ensamblaje (formación, integridad, relaciones molares óptimas, etc.)	Retención electroforética, radioSEC-HPLC, TEM, DC, SEM, AFM, DDL, dispersión estática de luz

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa inversa; TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión; SEM: Microscopía Electrónica de Barrido; AFM: Microscopía de Fuerza Atómica; DC: Dicroísmo Circular; DDL: Dispersión Dinámica de Luz; radioSEC-HPLC: Cromatografía radiactiva de Líquidos de Alta Resolución por Exclusión de Tamaño

Cada una de estas propiedades aporta diferentes tipos de información y se complementan para buscar correlaciones entre sí y de este modo obtener un análisis global de las características de los complejos. Todo esto es la base para: el diseño de formulaciones, formas farmacéuticas, la descripción del comportamiento de los sistemas bajo diferentes condiciones, el diseño de pruebas para el control de calidad, e incluso, para el diseño de procesos de producción de los mismos. A continuación se abordarán de manera más detallada estos atributos y las metodologías mencionadas para describirlos.

1.4.1. Funcionalidad biológica y eficiencia de transfección *in vitro* e *in vivo*

Estas características son esenciales en la caracterización y evaluación de la calidad de nanovectores para terapia génica. Si un nanovector no es biológicamente funcional y/o presenta una baja eficiencia de transfección, no tiene sentido averiguar otras características físicas, ya que de entrada, su administración no cumplirá el objetivo en un futuro tratamiento.

La funcionalidad biológica es la capacidad de un nanovector para llegar a sus células blanco. Este parámetro puede ser determinado de manera cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa; y esta determinación puede realizarse mediante ensayos *in vitro* y/o *in vivo*. La determinación cuantitativa o semicuantitativa está representada por la eficiencia de transfección.

Para ensayos *in vitro*, se utilizan líneas celulares específicas que contengan el receptor para el ligando del vector, si lo tiene, o que presenten algún otro tipo de afinidad hacia él. Para una determinación rápida y cualitativa ó semicuantitativa, puede utilizarse un gen reportero; el más utilizado es el que codifica para la proteína verde fluorescente. La transfección será evidenciada en un microscopio confocal o de epifluorescencia, pudiéndose contrastar los núcleos celulares mediante tinción con Hoescht o DAPI y la presencia de la proteína verde fluorescente en el citoplasma de las células transfectadas. En caso de la determinación cuantitativa de la eficiencia de transfección, se utiliza un citómetro de flujo, el cual arrojará el porcentaje de células transfectadas ó la intensidad de fluorescencia detectada en el cultivo. Para determinar la expresión del transgén de interés, ya sea cualitativa o cuantitativamente puede utilizarse inmunofluorescencia en combinación con microscopía, o bien, PCR, Western ó Northern Blot del cultivo celular.

En la figura 12 se muestra un ejemplo de la evaluación cuantitativa (A) y semicuantitativa (B) de eficiencia de transfección *in vitro* de diferentes nanovectores utilizando la línea celular B16.

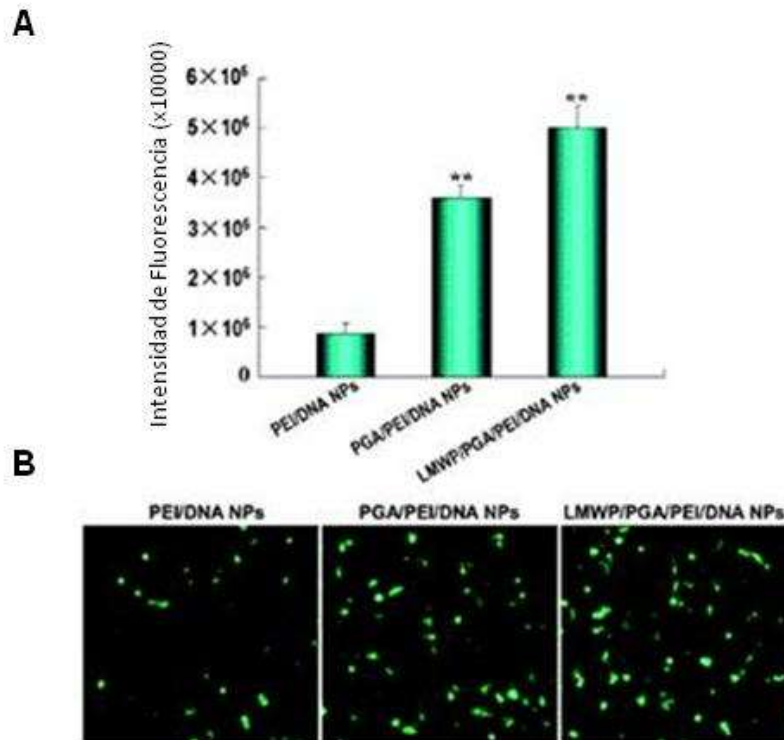


Figura 12. Evaluación de la funcionalidad biológica de vectores no virales *in vitro*. A) Eficiencia de transfección de células B16 mediada por nanopartículas de PEI/DNA, PGA/PEI/DNA y LMWP/PGA/PEI/DNA en medio de cultivo, respectivamente ($n=3$). $**P<0.01$, en comparación con las nanopartículas de PEI/DNA. B) Imágenes de células B16 transfectadas con nanopartículas de PEI/DNA, PGA/PEI/DNA y LMWP/PGA/PEI/DNA. *PEI/DNA*: Polietilenimina/Ácido Desoxirribonucleico; *PGA/PEI/DNA*: Ácido Poliglicólico/Polietilenimina/Ácido Desoxirribonucleico; *LMWP/PGA/PEI/DNA*: Protamina de Bajo Peso Molecular/Ácido Poliglicólico/Polietilenimina/Ácido Desoxirribonucleico⁶³

Cuando se evalúa la eficiencia de transfección *in vivo*, se utiliza el tejido de interés que contenga el receptor para el ligando del vector, ya sea proveniente de animales sanos o de modelos experimentales. Una vez administrado el nanovector por medio de la técnica y vía correspondiente, y después del tiempo adecuado para la expresión del transgén de interés, se realizan cortes histológicos de los tejidos donde se requiere evaluar la funcionalidad biológica del nanovector (realizando inmunofluorescencia y microscopía confocal); o bien, se extraen y tratan los tejidos para realizar las pruebas como qRT-PCR y/o alguna técnica de inmunotinción como ELISA y Western blot para cuantificar el mRNA y la proteína, respectivamente. Una vez determinada la eficiencia de transfección *in vivo*, generalmente ésta es correlacionada con algún efecto biológico o terapéutico a través de pruebas

funcionales; por ejemplo: conducta, disminución de tumores, sobrevivencia del animal de experimentación, etc.

En la figura 13 se muestra un ejemplo de la determinación de la eficiencia de transfección *in vivo* del NTS-poliplex y su correlación con el efecto terapéutico. En primer lugar, por RT-PCR y Western Blot se determinó la expresión del transgén hGDNF-flag insertado en el pDNA pEF-Bos después de su transfección utilizando el NTS-poliplex como vector, en la SNc de un modelo de ratas hemiparkinsonianas (el cual fue generado mediante 6-Hidroxidopamina (6-HODA)), (figura 13A y 13B). Posteriormente, se cuantificó la cantidad de dopamina en ratas lesionadas y control después de la transfección, ya que el hGDNF es un factor neurotrófico que promueve la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas; por tanto, este parámetro es un indicador indirecto del efecto terapéutico postransfección (Figuras 13C y 13D). Por último, la eficiencia de transfección y la recuperación en los niveles de dopamina se correlacionó con el efecto terapéutico directo en las ratas lesionadas y tratadas. Se observa que hay una disminución considerable en la conducta de giros ipsilaterales y contralaterales inducida por metanfetamina y apomorfina respectivamente. La conducta elevada de giros es característica del modelo de rata hemiparkinsoniana generado con 6-OHDA (Figura 13E y 13F).

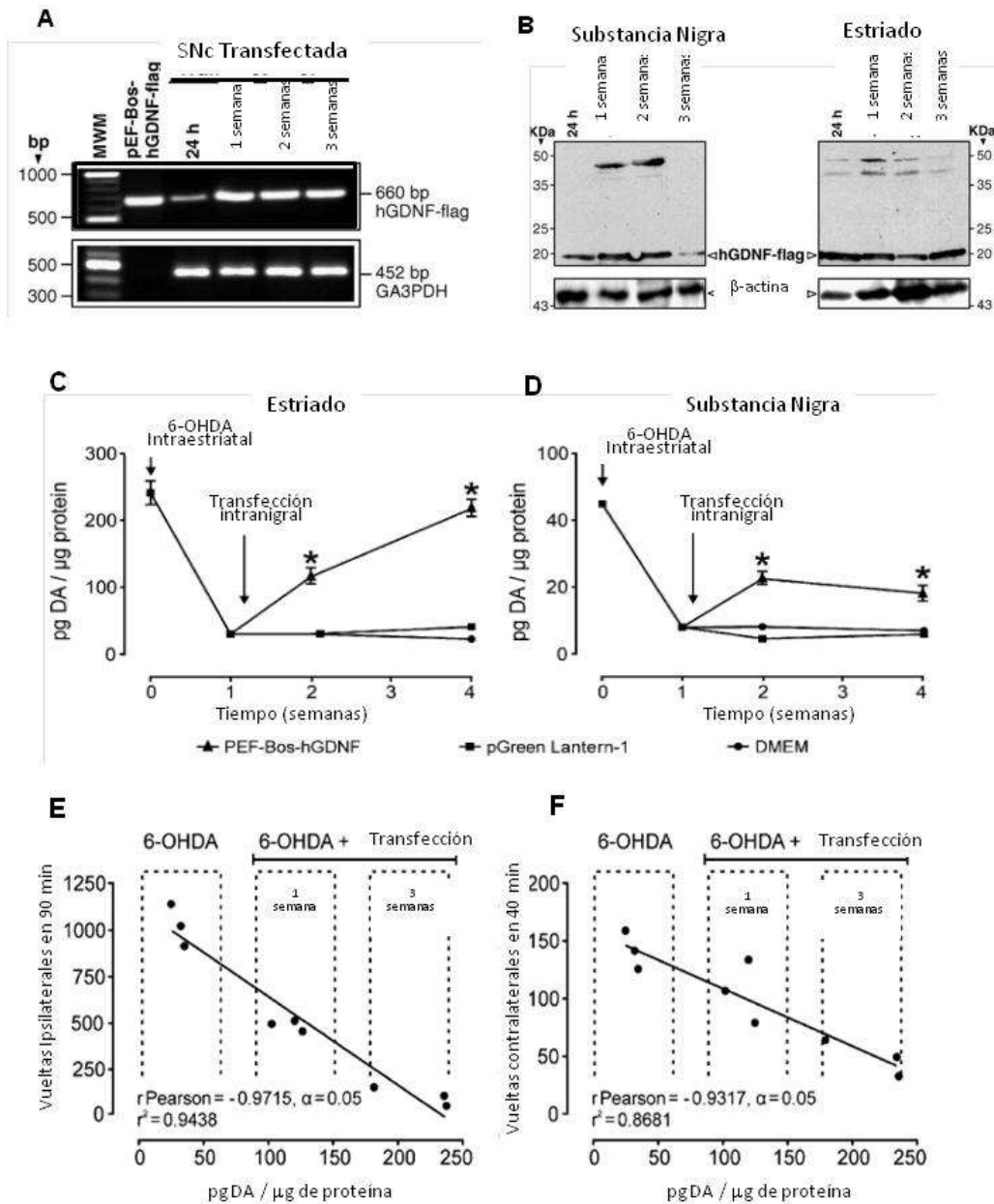


Figura 13. Evaluación de la funcionalidad biológica del NTS-poliplex *in vivo*. A y B) Expresión del transgén hGDNF-flag en la SNc de ratas hemiparkinsonianas después de la transfección intranigral del pDNA pEF-Bos-hGDNF-flag utilizando NTS-poliplex como vector. A: Productos de RT-PCR; B: Expresión de la proteína hGDNF-flag (Western Blot). C-F) Recuperación del contenido de dopamina y su correlación con la remisión hemiparkinsoniana después de la transfección intranigral del pDNA pEF-Bos-hGDNF-flag. C y D: Recuperación parcial del contenido de dopamina; E y F: Análisis de la correlación entre la recuperación de los niveles de dopamina en el estriado y la reducción de la conducta de giros en ratas hemiparkinsonianas con transfección de pEF-Bos-hGDNF-flag. 6-OHDA: 6-Hidroxidopamina; DA: Dopamina; hGDNF: Factor Neurotrófico Derivado de la Glia humano; kDa: kiloDaltones; GA3PDH: Glicerilaldehído 3-fosfato deshidrogenasa³¹

La eficiencia de transfección de un nanovector bajo condiciones establecidas es un parámetro que debe ser reproducible para una línea celular y/o tejido, y por ello es excelente para evaluar el comportamiento de los nanovectores en diversas circunstancias (formulación, almacenamiento, etc.) y la calidad y estabilidad de los mismos.

1.4.2. Forma física y patrones de aglomeración del nanovector

La forma física es el parámetro que indica qué tan íntegro se encuentra el nanovector de una manera directa, por lo que es una de las características más importantes por definir. Esta se determina mediante análisis de TEM, SEM o AFM.

En el caso de los poliplexes, la literatura ha reportado que, durante el acoplamiento electrostático, tras la interacción de las cargas negativas del pDNA con las cargas positivas del polímero utilizado en el poliplex, el pDNA sufre una supercompactación que resulta en la formación de estructuras tipo toroide⁶⁴, pasando por diferentes etapas: a) inicialmente se tiene una estructura circular superenrollada correspondiente al pDNA; b) se forma una especie de cordón similar a una liga que se retuerce; c) hay una compactación de esta estructura, la cual forma círculos más gruesos y pequeños; y d) se presenta una supercompactación que da lugar a estructuras tipo toroide o tubular. La figura 14 ilustra cada una de estas etapas:

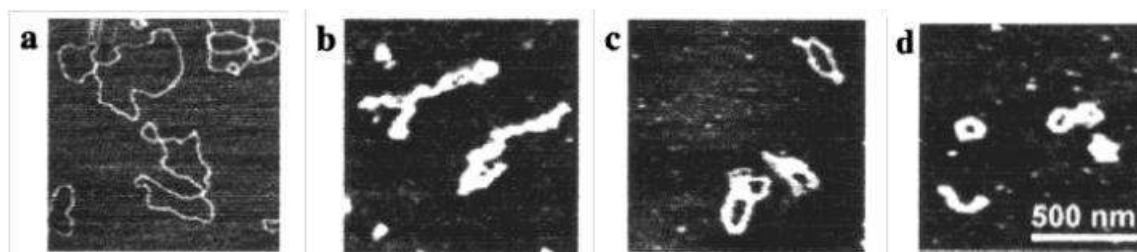


Figura 14. Formación de estructuras tipo toroide. a) plásmido; b) súper enrollamiento del plásmido tras su interacción con las cargas positivas del polímero; c) compactación de la estructura súperenrollada; d) súpercompactación que ocasiona la estructura tipo toroide en poliplexes⁶⁴

Arango-Rodríguez *et al* (2006) publicaron micrografías de microscopía electrónica de transmisión de las diversas etapas de ensamblaje de las nanopartículas de NTS-poliplex. En ellas se puede observar que al adicionar el péptido cariofílico al pDNA, éste comienza a compactarse, presentándose la súper compactación tras la adición del acarreador de neurotensina⁶⁵ (Figura 15).

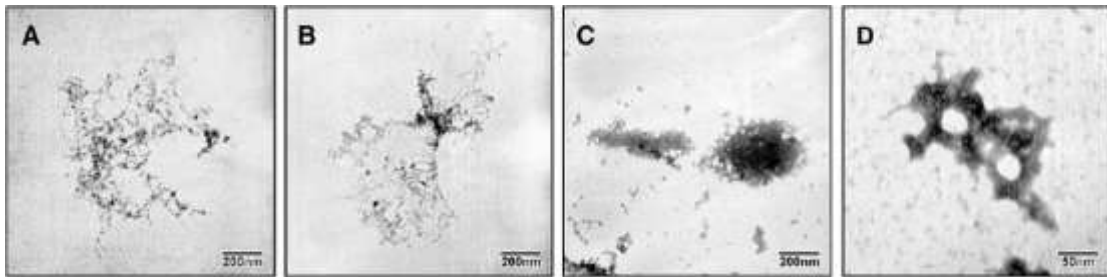


Figura 15. Micrografías de TEM de las etapas de formación del NTS-poliplex. A) pDNA (6 nM); B) 6 nM pDNA más 6 M de péptido cariofílico; C) 6 nM pDNA más 6 M de péptido cariofílico más 1% SFB; D) 6 nM pDNA más 6 M de péptido cariofílico más 1% SFB más la relación molar óptima de acarreador con respecto al pDNA: 1:34 (pDNA:acarreador de neurotensina). *TEM*: Microscopía Electrónica de Transmisión; *pDNA*: plásmido; *SFB*: Suero Fetal Bovino⁶⁵

Diversos estudios han demostrado la eficacia de diferentes polielectrolitos en la compactación del DNA *in vitro* para formar este tipo de estructuras^{64; 66}. La formación del complejo y la condensación del pDNA dependen de las características del polímero, tales como peso molecular y número y densidad de cargas^{64; 66; 67}. El tipo de polímero, en conjunto con la fuerza iónica del vehículo, define también el patrón y velocidad de aglomeración que tendrán los poliplexes, ya que todos tienden a aglomerarse a través del tiempo. En el trabajo de Arango-Rodríguez *et al*⁶⁵, se observa que este patrón de aglomeración se ve influenciado también por la relación molar utilizada pDNA:acarreador de neurotensina (imágenes no mostradas). Este patrón de aglomeración puede aportar información valiosa en cuanto a estabilidad del poliplex; por ejemplo, si hay algún vehículo que logre disgregar las partículas y con esto dar mayor estabilidad al sistema, se verá reflejado en dicho patrón. De igual forma, si hay ruptura o degradación de nanopartículas, este patrón se verá alterado.

1.4.3. Estructura secundaria

La estructura secundaria de los poliplexes es determinante para evaluar su estabilidad y comportamiento. Esta característica generalmente es determinada a través de métodos espectroscópicos, principalmente Dicroísmo Circular (DC) y espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (F.T.-I.R.) Estos ofrecen la ventaja, en comparación con TEM y SEM, de la ausencia de métodos de preparación de la muestra y de la rapidez de la obtención de resultados confiables y reproducibles.

El DC se expresa frecuentemente como la propiedad que poseen los compuestos quirales de absorber la luz a diferentes grados en función de la forma de polarización del haz incidente utilizando un espectropolarímetro. Aunque de un espectro de DC no es posible determinar directamente si las nanopartículas de poliplex mantienen, por ejemplo, su actividad biológica, es posible estimar su correcto ensamblaje, integridad, o cambios conformacionales comparando su espectro de DC con el DC de un control.

La desviación de luz que es efectuada por los componentes de los poliplexes y las nanopartículas ya ensambladas, conlleva a la variación en el patrón de bandeo en un espectro en determinadas longitudes de onda. Esto es debido al cambio estructural que sufren las moléculas después o durante la interacción, como la compactación que lleva a la forma toroide, principalmente (ver apartados anteriores).

En la literatura se ha reportado el patrón de bandeo de un pDNA en diferentes grados de enrollamiento⁶⁸. Para la formación de poliplexes, el pDNA se emplea en su forma súper enrollada. La figura 16 muestra este patrón de bandeo.

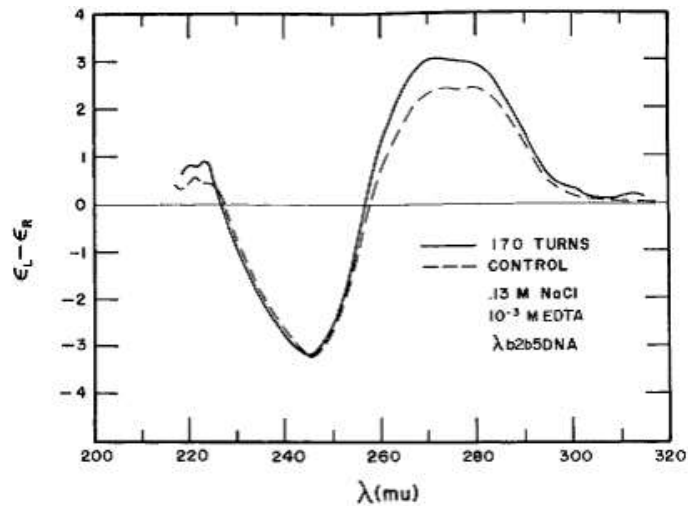


Figura 16. Espectro de Dicroísmo Circular de plásmido. Línea continua: plásmido superenrollado (170 vueltas súper helicoidales negativas); Línea punteada: control; plásmido relajado)⁶⁸

El DC se ha utilizado en el análisis de la estructura secundaria de los poliplexes y sus componentes; por ejemplo, para determinar el efecto de la temperatura durante el proceso de esterilización en autoclave en las partículas⁶⁹, o bien, para evaluar el comportamiento de ácidos nucleicos tras su interacción con diferentes concentraciones o tamaños de polímeros⁷⁰ (Figura 17).

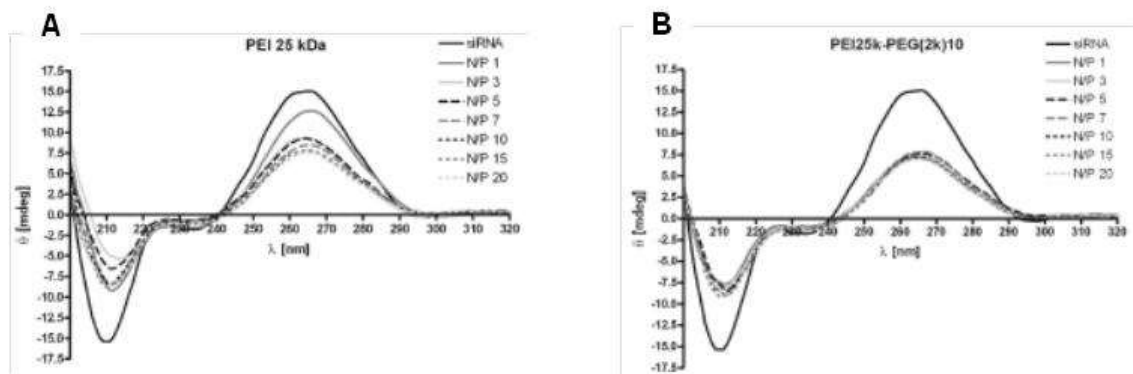


Figura 17. Espectroscopía de Dicroísmo Circular de vectores no virales con polímeros diferentes. A) PEI de 25 kDa a diferentes radios molares Nucleótido/Polímero (NP); B) PEI de 25 kDa acoplado a PEG de 2 kDa (con 10 monómeros)⁷⁰

En las figuras 16 y 17 pueden apreciarse los cambios en el patrón de bandeo de una condición a otra; tanto en cambios simples estructurales (pDNA circular relajado a súper enrollado), como la compactación de RNA de silenciamiento (siRNA) utilizando diferentes polímeros catiónicos a diferentes

concentraciones. Esto hace del DC una metodología útil para caracterizar y evaluar el comportamiento y calidad de los poliplexes.

Por otro lado, la espectroscopía F.T.-I.R. ha sido muy poco utilizada para la caracterización de poliplexes; sin embargo, por sus características, puede ser utilizada como una herramienta alternativa obteniendo los patrones de bandeado del poliplex y de cada uno de sus componentes. Su principal ventaja es que posibilita la obtención de los espectros utilizando muestras liofilizadas.

En este tipo de espectroscopía infrarroja se colectan los espectros con base en mediciones de coherencia de una fuente de radiación, usando medidas basadas en tiempo o espacio de radiación electromagnética u otro tipo de radiación. La espectroscopía infrarroja aprovecha el hecho de que las moléculas absorban frecuencias específicas características de su estructura. Estas absorciones son frecuencias resonantes; por ejemplo, la frecuencia de la radiación absorbida correlaciona con la transición de energía del enlace o grupo que vibra. Y estas energías están determinadas por la forma de las superficies moleculares potenciales de energía, las masas de los átomos y el acoplamiento vibracional asociado a ellas. De este modo, pueden compararse los espectros de cada componente del poliplex y las nanopartículas ensambladas, ya que el cambio en la estructura durante la interacción de los mismos cambia la disposición de los enlaces y grupos funcionales de cada componente y por tanto el patrón de bandeado esperado.

1.4.4. Distribución de tamaño de partícula y potencial zeta

Determinar el tamaño de partícula de los poliplexes es primordial en el caso de los poliplexes, ya que este debe ser reproducible y de él depende, en buena medida, su eficiencia y funcionalidad para ser internalizados por la célula²; 71; 72; 73; 74; 75. Este parámetro puede determinarse mediante AFM, TEM y SEM; sin embargo, para obtener una medición más precisa y una distribución estadística de las poblaciones de los diferentes tamaños que puede haber en una muestra de NTS-poliplex en suspensión por la formación de agregados, la metodología más utilizada es Dispersión Dinámica de Luz (DDL).

El instrumento para efectuar este análisis realiza una correlación entre el tamaño de las partículas y el grado de dispersión de luz proveniente del mismo, calculando también la proporción de los diferentes tamaños presentes en la muestra. A esta proporción se le conoce como polidispersión; mientras más alta es, más heterogénea es una muestra en cuanto a tamaño de partículas⁷⁶. Los gráficos de distribución de tamaños del NTS-poliplex son comparables a los de la figura 18.

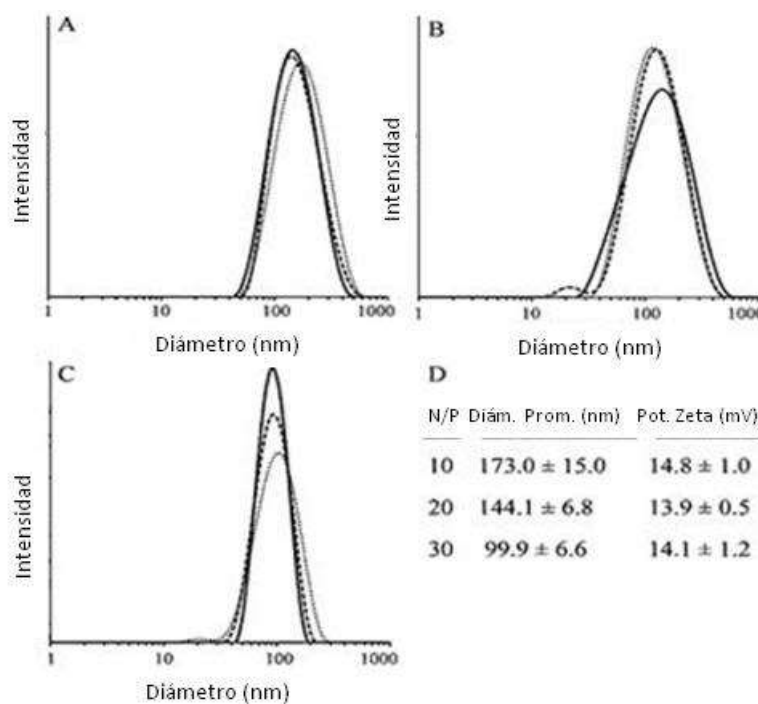


Figura 18. Dispersión Dinámica de Luz y potencial zeta de un polímero con plásmido pUC19 a diferentes proporciones N/P. A) N/P: 10, B) N/P: 20 y C) N/P: 30; con los valores promedio de diámetro. Los datos de potencial zeta representan el promedio y desviación estándar de al menos tres mediciones a cada N/P ratio. N/P: Nitrógeno/Fosfato⁷⁷

La carga de superficie o potencial zeta es un parámetro que indica de manera indirecta la estabilidad de un sistema de poliplexes en suspensión. Ya que al ensamblarse electrostáticamente hay una neutralización de cargas (pDNA: carga de superficie negativa; nanovector: carga de superficie positiva), el potencial zeta podría correlacionarse con la densidad de partículas ensambladas. Es un parámetro cuantitativo y reproducible, que también es de utilidad para la evaluación y el control de calidad de los poliplexes.

El instrumento para determinar este atributo, generalmente es el mismo que determina el tamaño de partícula utilizando una celda particular. La determinación consiste en estimar la movilidad electroforética de las partículas para aplicar después la ecuación de Henry. Esta movilidad se obtiene realizando un experimento electroforético en la muestra y midiendo la velocidad de las partículas utilizando Velocimetría de Laser Doppler⁷⁶.

La determinación de la carga de superficie ha sido ampliamente utilizada para la caracterización de poliplexes^{78; 79; 80; 81; 82; 83}. A continuación se muestra un ejemplo de aplicación:

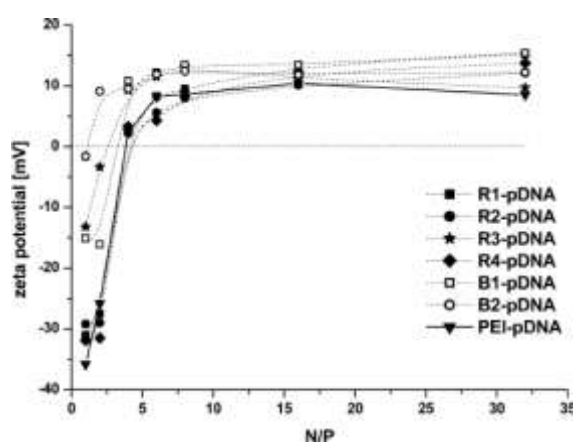


Figura 19. Potenciales zeta de varios poliplexes a diferentes proporciones N/P. El potencial zeta del pDNA desnudo en PBS a una concentración de 0.2 mg/mL fue de -70.3 mV. pDNA: plásmido; PBS: Solución amortiguadora de fosfatos (*Phosphate Buffer Solution*); N/P: Nitrógeno/Fosfato⁷⁸.

En la figura 19 se evidencia el patrón de modificación del potencial zeta en función de la concentración de polímero catiónico. El comportamiento observado sugiere que la proporción óptima N/P es de alrededor de 5 para la mayoría de los poliplexes estudiados en este caso (al dar cargas de superficie más cercanas a cero). Si este ratio aumenta, puede haber una cantidad considerable de polímero catiónico en suspensión.

Por otro lado, el potencial zeta juega un papel importante en la estabilidad y funcionalidad de NPs de poliplex *in vivo*. A pesar de que una carga superficial neutra está correlacionada con una mayor inestabilidad y propensión a agregación de NPs de poliplex en solución^{84; 85; 86}, una carga altamente positiva en las NPs facilita interacciones inespecíficas con proteínas plasmáticas con carga negativa, matriz extracelular y superficie celular; mientras que NPs con

carga altamente negativa pueden ser eliminadas por fagocitosis mediante el receptor a polianiones de los macrófagos⁵.

Es por esto que la neutralización de la carga superficial de poliplexes debe conferir el tiempo suficiente de circulación en torrente sanguíneo para permitir su llegada a tipos celulares específicos utilizando las interacciones ligando-receptor. La neutralización se logra empleando la relación molar óptima plásmido:acarreador; y la tendencia a agregarse y la inestabilidad en suspensión asociadas a un potencial zeta neutro pueden superarse desarrollando tanto una formulación como un proceso de liofilización adecuados.

1.4.5. Ensamblaje (integridad, relaciones molares óptimas, etc.)

Un aspecto fundamental es el desarrollo de técnicas para caracterizar y evaluar el ensamblaje de las nanopartículas, y aunque los parámetros y metodologías anteriores brindan información que permitiría deducir e inducir cómo se está llevando a cabo el ensamblaje o si las partículas permanecen ensambladas (integridad), pueden utilizarse otras herramientas para estudiar de manera más directa este parámetro.

Una metodología de la cual no hay publicaciones previas de aplicación en poliplexes es radioSEC-HPLC, en la cual se obtienen los cromatogramas y tiempos de retención para cada componente del poliplex, tomando lecturas tanto de absorbancia como de radiactividad. Para esto, uno de los componentes debe estar radiomarcado. De este modo es sencillo visualizar si las nanopartículas están ensambladas y la interacción entre sus componentes bajo diferentes condiciones.

Por otro lado, para caracterizar la interacción del pDNA con el PK y el acarreador, y así determinar la relación molar óptima entre ellos, se han utilizado ampliamente los ensayos de retención electroforética^{65; 87; 88; 89; 90}, los cuales se realizan empleando una cámara convencional de electroforesis y cargando muestras con concentraciones crecientes de acarreador o PK con respecto a una concentración constante de pDNA. Se espera ver una retención en la

migración del pDNA a medida que va aumentando la relación molar de estos componentes. A continuación se muestra un ejemplo (Figura 20).

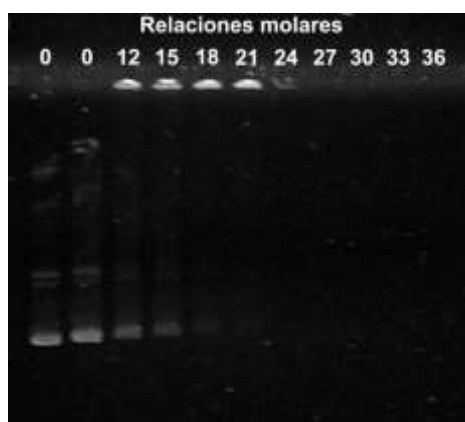


Figura 20. Ensayo de retención electroforética para determinar la relación molar óptima pDNA:acarreador de neurotensina. El primer carril es pDNA únicamente a una concentración de 6 nM. El segundo carril es pDNA más PK a una concentración de 5 M. Carriles 3-11; concentraciones crecientes de acarreador de neurotensina. *pDNA*: plásmido

En la figura 20 se observa un ligero retardo en la migración del pDNA por la adición del PK. Sin embargo, cuando se adiciona el acarreador la migración se retrasa aún más hasta que deja de ocurrir en las concentraciones más altas; e incluso, deja de verse el pDNA a partir de la relación 1:27. Esto es debido tanto al tamaño de los complejos formados como a la neutralización de las cargas. En el caso de las relaciones 1:27 a 1:36, el grado de compactación es tan elevado que impide el intercalamiento del bromuro de etidio y con esto, su visibilidad en presencia de luz UV. Con base en esto y en datos empíricos publicados previamente⁶⁵, la relación molar óptima se encuentra entre 1:21 y 1:27, lo cual puede confirmarse con ensayos de transfección *in vitro*.

1.5. Formulación y liofilización de poliplexes

Una vez caracterizado completamente un sistema y establecidos los parámetros de referencia para su evaluación y control, es posible proceder con el desarrollo de una formulación para el mismo.

Además de las características intrínsecas de los componentes de los complejos, la formulación o vehículo de los poliplexes es un factor importante en

la formación de los mismos, y por consiguiente, en su estructura final, en la eficiencia de transfección y en su estabilidad⁷. Por ejemplo, se ha descrito que a concentraciones salinas crecientes en el vehículo, la tendencia al aumento de tamaño en estos complejos sugiere un grado de interacción disminuido entre los componentes⁶⁷. Sin embargo, en presencia de formulaciones que incluyen glucosa, los complejos se distribuyen en una población más homogénea y son mucho más pequeños que aquellos preparados en solución salina⁹¹. Asimismo, para la administración in vivo, hay estudios que sugieren que el fosfato de sodio es más benéfico como vehículo de inyección en comparación con el cloruro de sodio en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS)⁹².

De manera general, los sistemas no virales de envío de genes presentan una baja estabilidad en suspensión acuosa^{74; 93; 94}; y se ha demostrado que los poliplexes de poli-L-lisina forman agregados que pueden afectar la eficiencia de transfección⁹⁵.

Como alternativa para superar este factor, se ha demostrado que la liofilización confiere estabilidad y vida de anaquel a los complejos DNA-lípido y DNA-polímero utilizando lio-protectores como mono, oligo ó polisacáridos^{94; 96; 97}. Se ha encontrado que las proporciones azúcar/DNA son un parámetro crítico que determina la conservación del tamaño de partícula durante la etapa de congelación en la liofilización de estos complejos^{93; 94; 97; 98}. Estas proporciones dependen de qué tipo de sacárido se utilice, el tipo de polímero que conforma al vector no viral, la dosis efectiva terapéutica y el vehículo. Asimismo, se ha sugerido una concentración mínima de 5% de mono u oligosacáridos para obtener un efecto de lioprotección. Sin embargo, debe considerarse que para su uso clínico, la formulación de partículas debe mantener la isotonicidad, la cual puede verse afectada por la concentración final de azúcares⁹⁹.

Por otro lado, es importante considerar otros factores como el pH; deben incluirse amortiguadores que sean capaces de conservar su función después de la reconstitución de los liofilizados.

Una vez que se ha evaluado el comportamiento y calidad del poliplex en el vehículo desarrollado, se requiere asegurar que la estabilidad del sistema o integridad de las nanopartículas no se vean afectadas después de su administración. Esto puede suceder debido a las cargas que aportan las proteínas del suero, y a la interacción entre las partículas y dichas proteínas. Es

importante asegurarse de que al menos una población importante del poliplex se mantenga íntegra en torrente sanguíneo de modo que pueda efectuar su efecto terapéutico.

Otro aspecto que forma parte fundamental de la evaluación de la formulación es la realización de pruebas de estabilidad. De acuerdo con el marco normativo¹⁰⁰, se recomienda realizar al menos dos tipos de prueba: estabilidad acelerada (condiciones de temperatura y humedad elevadas) y estabilidad a largo plazo (condiciones de temperatura y humedad ambientales, por un tiempo más prolongado). Se debe evaluar la calidad de los reconstituidos almacenados en estas condiciones de acuerdo con los parámetros obtenidos desde la etapa de caracterización. Con base en estas pruebas, es posible determinar si el poliplex en el vehículo desarrollado y liofilizado (si aplica), puede contar con una vida de anaquel considerable para la viabilidad de su comercialización y posterior aplicación en la clínica.

En conclusión, para el uso clínico del NTS-poliplex debe desarrollarse una forma farmacéutica que le confiera estabilidad, asegurando que sus características físicas y biológicas sean las adecuadas para cumplir con su función. Asimismo, esto debe entrar en un esquema regulatorio, dando cumplimiento a lo señalado por las normas vigentes para que este aspecto sea considerado en el dossier correspondiente que será revisado por las autoridades para su registro, sin dejar de tomar en cuenta la viabilidad económica del desarrollo.

1.6. Estudios de biodistribución y toxicidad

Una vez confirmada la funcionalidad y estabilidad del poliplex en la nueva formulación, el siguiente paso consiste en realizar estudios de biodistribución y toxicidad.

Un estudio de biodistribución indica en qué puntos puede haber acumulación, ya sea específica o inespecífica de un poliplex y puede sugerir sus principales vías de eliminación.

En 2014, Hernández *et al* publicaron un estudio donde se administró el NTS-poliplex en DMEM utilizando un pDNA marcado con yoduro de propidio. Después de seis horas de la administración intravenosa, se observaron puntos fluorescentes en las células de órganos con un sistema fagocítico mononuclear, sugiriendo la eliminación del NTS-poliplex no internalizado de manera específica por las células blanco a través de este sistema¹⁰¹.

Por otro lado, Rubio-Zapata *et al* determinaron la expresión del gen de luciferasa, el cual fue administrado en conjunto con el NTS-poliplex en DMEM utilizando un modelo de neuroblastoma murino. Encontraron una sobreexpresión de esta proteína en el tumor, y una muy baja expresión en estómago, intestino y colon, mientras que en el resto de los órganos la presencia de esta proteína fue prácticamente nula (Figura 10B)⁶⁰. Esto era de esperarse, ya que al evaluar la presencia de la proteína sólo se están considerando los órganos transfectados, descartando la acumulación inespecífica.

El estudio de toxicidad debe efectuarse con el NTS-poliplex y con el vehículo únicamente, para descartar que éste pudiera generar algún tipo de reacción adversa por sí solo, o en conjunto con el poliplex.

En el trabajo de Hernández *et al* también se evaluó la seguridad del NTS-poliplex formulado en DMEM tras su administración intravenosa en ratones Balb/c. Se utilizaron marcadores moleculares de daño hepático y renal e inflamación en general. Se observó que el NTS-poliplex no incrementó los niveles séricos de TNF-, interleucina 1, interleucina 6, bilirrubina, aspartato transaminasa y alanina trasaminasa. Sin embargo, sí hubo un incremento en los niveles de amiloide A y fosfatasa alcalina en suero, pero se normalizaron a las 24 horas post-administración. Asimismo, no se encontró inflamación en la inyección local del NTS-poliplex en comparación con la carragenina¹⁰¹.

Existen otros factores que deben ser considerados y evaluados de manera indirecta para el uso clínico de este tipo de vectores, entre los que se encuentran la formación de agregados que pudieran causar taponamientos, la fuerte interacción de los polímeros catiónicos con componentes de la sangre, la unión al sistema retículo endotelial, filtración renal y toxicidad de los polímeros⁸⁵; ¹⁰². Asimismo, se debe descartar que los polímeros de los vectores no virales interactúen con organelos intracelulares, lo que podría desencadenar alteraciones en los mecanismos de transducción de señales involucrados en la

inflamación, diferenciación, proliferación y apoptosis⁷⁰. Son pocos los estudios de toxicidad aguda de vectores no virales que se han realizado. Sin embargo, se han reportado datos de citotoxicidad de algunos polímeros catiónicos diferentes a la PLL debido a la inducción de daño a la membrana celular¹⁰³.

Por otro lado, la unión de proteínas plasmáticas (opsonización) es el primer mecanismo que utiliza el retículo endotelial para reconocer las nanopartículas en circulación. Se ha reportado que los macrófagos, como las células de Kupffer en el hígado, reconocen las nanopartículas opsonizadas vía el receptor *scavenger*. El hígado, bazo y médula ósea son los órganos principales del retículo endoplásmico para la eliminación de nanopartículas¹⁰².

1.7. Procesos de producción de nanovectores no virales

Los vectores no virales, al contener ácidos nucleicos extraídos de la manipulación de organismos vivos, son considerados productos biotecnológicos.

A diferencia de los medicamentos farmacéuticos convencionales, que normalmente se fabrican y controlan usando técnicas físico-químicas reproducibles, los productos biológicos se obtienen con métodos que involucran procesos y materiales biológicos, los cuales tienen una variabilidad intrínseca, es decir el rango y naturaleza de los subproductos son variables. Por esta razón, en la obtención de biológicos es necesario apearse cabalmente a las BPF en todos los pasos del proceso¹⁰⁴. Aunado a esto, la complejidad de la producción de vectores virales se ve aumentada al tratarse de dos o más subprocesos para la obtención de los componentes y el proceso para la obtención del producto final.

Las BPF se definen como: "conjunto de lineamientos y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos farmacéuticos elaborados tengan y mantengan la identidad, pureza, concentración, potencia e inocuidad requerida para su uso"¹⁰⁴. Entre los principios básicos de las BPF se puede citar: la organización y el personal, las instalaciones y el equipamiento, los insumos y su control, la producción y el control de proceso, el aseguramiento de la calidad en la producción y en los laboratorios analíticos, la contratación de

servicios productivos y de ensayo, así como cumplir con la calificación y validación en equipos, procesos y sistemas.

En la Tabla 3 se enlistan los aspectos básicos en la aplicación de las BPF de Biológicos.

Tabla 3. Aspectos básicos en la aplicación de las Buenas Prácticas de Fabricación

ASPECTOS	CUMPLIMIENTO DE LAS BUENAS PRÁCTICAS EN BIOLÓGICOS
Personal	<ul style="list-style-type: none"> - Tener experiencia en la fabricación de biológicos y capacitación en higiene, microbiología, virología, inmunología, veterinaria. - El personal expuesto a organismos vivos o animales no debe pasar hacia locales donde se manipulen otros organismos o productos. <ul style="list-style-type: none"> - Inmunizar con vacunas apropiadas y realizar chequeos médicos periódicos.
Instalaciones y Equipamiento	<ul style="list-style-type: none"> - Contar con un programa de monitoreo ambiental acorde con el producto y a la etapa del proceso, incluyendo los métodos de detección de microorganismos específicos. <ul style="list-style-type: none"> - Para disminuir el riesgo de contaminación cruzada se requiere del uso de instalaciones y equipamientos dedicados y en el caso de las producciones en campaña el empleo de sistemas cerrados. - Las áreas de producción, control de calidad y de manejo con animales deben estar separadas con unidades de aire independiente.
Documentación	<ul style="list-style-type: none"> - Para materiales biológicos se requiere información sobre su fuente, origen, método de fabricación y ensayos aplicados, particularmente los controles microbiológicos.
Materiales*	<ul style="list-style-type: none"> - Procedentes de proveedores evaluados y liberados por control de calidad.
Producción y su control	<ul style="list-style-type: none"> - Control de los bancos celulares y de su estabilidad, procedimientos aprobados. - Determinar la carga microbiana durante las etapas de fermentación y purificación, necesario para prevenir o minimizar contaminantes indeseables, asociados a enzimas bacterianas, endotoxinas, etc. - Establecer los límites de aceptación en dependencia de los requerimientos del producto y la capacidad del proceso para remover o inactivar los contaminantes.
Control de Calidad	<ul style="list-style-type: none"> - Llevar a cabo controles esenciales para la calidad de estos productos, como la remoción del virus, contenido del ADN residual, contenido de proteínas contaminante del hospedero, los cuales no pueden efectuarse en el producto terminado y deben chequearse en una etapa apropiada del proceso.

*En el caso de reactivos biológicos deben estar libres de virus de la encefalopatía espongiforme bovina.

BPFs: Buenas Prácticas de Fabricación¹⁰⁴

Hay rasgos distintivos en la fabricación de biológicos/biotecnológicos; estos se enlistan y detallan a continuación¹⁰⁴:

- *Es una industria altamente regulada*, basada en el cumplimiento de guías y normativas de diferentes organismos como son: Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), Organización Mundial de la Salud (OMS), *International Conference of Harmonization* (ICH), *Food and Drug Administration* (FDA), Comisión Federal para la Prevención de Riesgos Sanitarios (Cofepris) y *European Medicines Agency* (EMA). Estas reglamentaciones están relacionadas con los aspectos que se deben garantizar en la industria para cumplir con las BPF, buenas prácticas en los laboratorios de control y en las buenas prácticas clínicas, entre otros.
- *Requiere que el personal tenga un alto nivel profesional y técnico*, el cual se enfrenta a tecnologías novedosas basadas en aspectos científico-técnicos que involucra diferentes áreas del conocimiento: Genética, Microbiología; Bioquímica, Química, Ingeniería, Ciencias Farmacéuticas, Automatización, entre otros.
- *Existe un alto nivel de inversiones*. Para poder llevar a cabo la fabricación de estos productos se debe contar con instalaciones clasificadas, con sistemas de aire, agua y vapor, así como el equipamiento adecuado que cumplan las etapas de calificación y validación. Además, deben cumplir con las mejoras tecnológicas que le impone el estado del arte en esta industria.
- *Variabilidad intrínseca de los procesos*. Estos productos se obtienen a partir de materiales biológicos, lo cual introduce al proceso y al control una mayor variabilidad. De ahí la necesidad de disponer de un control estadístico y el cumplimiento de los puntos críticos del proceso, además de mantener el estado validado de estos. Es necesario un conocimiento profundo de la sustancia activa y su fórmula farmacéutica, y que se cumpla con los atributos de calidad del producto.
- *Requiere de un gran número de animales*. En el caso de las pruebas de experimentación y control de calidad que están relacionadas con los ensayos biológicos (potencia y seguridad) se necesitan animales, por ejemplo, curieles, ratones, conejos, que deben mantenerse bajo seguimiento

de salud y en instalaciones adecuadas para este trabajo. Desde hace algunos años se trabaja en la sustitución y la correlación de las técnicas biológicas por otros métodos analíticos (mencionados previamente), con vistas a disminuir el número de animales a utilizar en el control de calidad de estas producciones¹⁰⁵.

- *Requiere de la liberación lote a lote para la comercialización.* El establecimiento por parte de las agencias reguladoras de efectuar a liberación lote a lote, obligatoria para las vacunas y los productos derivados de la sangre y eventualmente para otras formas farmacéuticas, es propia de la producción de biológicos. Esta forma de trabajo ha constituido una vía de disminuir los riesgos propios de la producción de estos medicamentos¹⁰⁶.

El proceso de producción de un poliplex consistiría en dos subprocesos (uno para la obtención de pDNA y otro para la obtención del polímero funcionalizado) y un proceso final para el ensamblaje de los componentes. Todo lo anterior debe ser considerado, principalmente para la obtención de pDNA y el NTS-poliplex. A la fecha, no se han reportado procesos de esta índole para la producción de vectores no virales. Por lo tanto, este diseño y su desarrollo sería un trabajo pionero en el campo.

2. JUSTIFICACIÓN

Tanto la EP como el cáncer representan importantes problemas de salud pública. En ambos casos se requieren alternativas de tratamiento que sean más específicas, seguras, eficaces, y accesibles que las actuales. En modelos animales, se ha demostrado que el NTS-poliplex es un tratamiento potencial para dichos padecimientos que cumple con estas características. Sin embargo, a la fecha no se ha desarrollado una formulación apta para su uso clínico (con base en la lista de excipientes aprobados por la FDA para formulaciones parenterales¹⁰⁷); y, por su tendencia a la formación de agregados, tiene una estabilidad muy baja que requiere de la preparación al momento de la administración.

Por lo tanto, para llevar a la clínica este sistema, se requiere de una serie de actividades de “transición” entre investigación académica y aplicación clínica, entre las cuales están el diseño de formulaciones, el desarrollo de metodologías para su caracterización y evaluación, y la implementación de procesos para su obtención “hechos a la medida” al tratarse de un sistema sin precedentes en el ámbito clínico. Para lograr esto, se requiere de un trabajo interdisciplinario que exige la innovación en áreas como la farmacéutica, la toxicología, la biología molecular, la bioingeniería, la biotecnología, la física, etc.

Por lo tanto, este trabajo, al ser pionero en el desarrollo de nuevas tecnologías, puede ser de gran utilidad en futuros desarrollos para el uso clínico de otros poliplexes y/o sistemas similares.

Los resultados de todas estas actividades son la base para garantizar la seguridad y efectividad del NTS-poliplex para la realización de estudios preclínicos y clínicos posteriores que conlleven a una vinculación exitosa entre academia e industria / sector salud.

3. HIPÓTESIS

Si el NTS-poliplex se formula en un vehículo seguro y adecuado para su liofilización y conserva sus características, entonces se obtendrá un sistema eficaz y estable pre y post-administración, con vida de anaquel que permitirá, a largo plazo, su uso clínico y comercialización, estimando un proceso rentable y escalable de producción bajo BPFs.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Desarrollar una forma farmacéutica que permita la aplicación del NTS-poliplex en la clínica y su comercialización estimando un proceso rentable y escalable de producción bajo BPF.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Caracterizar las nanopartículas de NTS-poliplex obtenidas a nivel experimental

- Determinar las características físicas y biológicas principales del NTS-poliplex
- Establecer parámetros que sirvan como referencia para la evaluación del comportamiento y calidad del NTS-poliplex

4.2.2. Desarrollar una formulación para el uso clínico de las nanopartículas de NTS-poliplex

- Diseñar formulaciones prototipo
- Evaluar las características y comportamiento del NTS-poliplex en los prototipos de formulación
- Diseñar y desarrollar un proceso para la liofilización del NTS-poliplex
- Evaluar las características y comportamiento del NTS-poliplex reconstituido
- Probar la estabilidad acelerada y a largo plazo de los liofilizados
- Evaluar la integridad post-administración de los reconstituidos

4.2.3. Evaluar la seguridad del NTS-poliplex en la forma farmacéutica final

- Analizar la biodistribución del NTS-poliplex en el nuevo vehículo
- Determinar la toxicidad del vehículo y de las nanopartículas formuladas en éste
- Explorar posibles vías de depuración de las nanopartículas de NTS-poliplex

- 4.2.4. Proponer el diseño de un proceso de producción de NTS-poliplex que sea escalable y adaptable a BPF considerando su rentabilidad
- Proponer el diseño de un proceso escalable y BPF de obtención de pDNA, considerando controles de proceso
 - Proponer el diseño de un proceso escalable y BPF de síntesis de acarreador de neurotensina, considerando controles de proceso
 - Proponer el diseño de un proceso escalable y BPF para el ensamblaje del pDNA, PK y acarreador de neurotensina, considerando controles de proceso y calidad

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Síntesis de acarreador de neurotensina y ensamblaje del NTS-poliplex

PF (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGSAKKK-COOH) y PK (Ac-MAPTKRKGSCPGAAPNKPK-COOH) se mandaron sintetizar con RSSynthesis. La NTS y la PLL hidroclicorada (30-70 KDa) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El LC-SPDP se adquirió de Thermo Scientific. El acarreador de neurotensina se sintetizó utilizando LC-SPDP como agente entrecruzador siguiendo el procedimiento reportado previamente^{87; 90}. El plásmido pEGFP-N1, que contiene el gen que codifica para GFP (Clontech), se amplificó y purificó utilizando el Kit MaxiPrep Kit, Qiagen de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los componentes del NTS-poliplex se disolvieron en DMEM (GIBCO, Invitrogen. Número de catálogo: D1145), que en este caso es la Formulación Experimental (EF25), o en DMEM con la concentración de glucosa ajustada a 100 o a 280 mM (EF100 y EF280 respectivamente); o en los prototipos de formulación (PF25, PF100 y PF280), que tienen la siguiente composición: 136 mM NaCl, 3.7 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM NaH₂PO₄ y 25, 100 ó 280 mM glucosa respectivamente; pH 7.4. Las nanopartículas de NTS-poliplex se obtuvieron adicionando por goteo solución de PK suspendido en DMEM o en las

formulaciones prototipo a una solución de pDNA. La concentración final (Cf) de PK fue de 5 M y la de pDNA fue de 6 nM. Esta mezcla se homogeneizó utilizando un vortex Genie 2 (Scientific Industries), a 900 rpm por 30 min. Posteriormente, el acarreador de neurotensina suspendido en *Phosphate Buffer Solution* (PBS) se adicionó lentamente. Su Cf fue de 144 nM, de acuerdo con la relación molar óptima pDNA:acarreador de neurotensina predicha por ensayos de retención electroforética como se reportó previamente por Arango-Rodríguez⁶⁵. La mezcla se homogeneizó vortexeando a 900 rpm por 30 min.

5.2. Determinación de funcionalidad biológica y eficiencia de transfección *in vitro*

La línea celular N1E-115 (ATCC CRL-2263) es proveniente de neuroblastoma murino y cuenta con una alta densidad de NTSR1, por lo cual es utilizada para realizar las pruebas biológicas con NTS-poliplex. Se cultivó en DMEM suplementado con SFB 10% a 37 °C y 5% de CO₂. El NTS-poliplex formulado en DMEM o en el prototipo de vehículo se adicionó a pozos que contenían un 50% de confluencia. Se incubaron por una hora a 37 °C y 5% de CO₂. Las preparaciones de NTS-poliplex se retiraron y se adicionó DMEM suplementado con 10% de SFB. Los pozos se incubaron bajo las mismas condiciones durante 48 h. Para la determinación de funcionalidad biológica, las células se fijaron a cubreobjetos con paraformaldehído 4% y los núcleos se tiñeron con Hoechst 10 mM. Estos cubreobjetos se montaron en portaobjetos utilizando 1.5 L de Vectashield (Vector Laboratories) y se sellaron con barniz de uñas transparente. Los portaobjetos se examinaron con un microscopio de epifluorescencia Leica DMIRE2 (Leica Microsystems) utilizando el filtro A para Hoescht 33258 y el filtro K3 para GFP. Las imágenes se digitalizaron con una cámara Leica DC300F (Leica Microsystems). De manera alternativa, para determinar la eficiencia de transfección, el medio de incubación se retiró y las células se trataron con solución Pucks y se lavaron y resuspendieron en PBS pH 7.4. Se transfirieron a tubos para citometría de flujo y se analizaron a una emisión a 519 nm (FL1) en un Citómetro FACSScan Cytometer (Bekton Dickinson), equipado con un láser de Argón (488 nm).

5.3. Determinación de funcionalidad biológica *in vivo*

Animales:

Se utilizaron Ratas Wistar macho (peso entre 210-230 g). Fueron expuestas a ciclos de 12 h de luz – oscuridad a una temperatura de 20-22 °C y humedad de 55%, y agua y comida *ad libitum*. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal del CINVESTAV-IPN (autorización No. 109-02), certificado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA; NOM-062-ZOO-1999 y NOM-087-ECOL-1995). Se hizo lo posible por minimizar el sufrimiento animal y el número de animales utilizados se redujo al mínimo en el diseño experimental.

Las ratas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de anestesia (ketamina, 120 mg – xilazina, 9 mg, por kg de peso corporal) en 0.9% de solución salina (Pisa Agropecuaria), y se colocaron en un aparato de estereotaxia modelo 51600 (Stoelting). Se inyectaron 2 µL de NTS-poliplex en DMEM o en el prototipo ($n = 3$ ratas respectivamente), o de DMEM (control negativo; $n = 3$ ratas). Se utilizaron las siguientes coordenadas para la inyección: AP, +2.5 mm del punto medio interaural; ML, +2.0 mm de la línea media; DV, -6.7 mm de la dura madre. El flujo de inyección fue de 1 µL/6 min utilizando una bomba de microperfusión modelo KDS100L (KD Scientific). Después de la cirugía, las ratas recibieron antibiótico y analgésico y se hospedaron individualmente en el bioterio hasta su uso.

Se realizaron cortes histológicos de los sitios de transfección utilizando el microtomo (Leica) y se observaron al microscopio confocal para su análisis.

5.4. Microscopía Electrónica de Transmisión

Las muestras de NTS-poliplex preparadas en DMEM o en los prototipos de vehículo, cuyas Cfs fueron: pDNA: 6 nM, PK: 5 M, acarreador de neurotensina: 144 nM, se mezclaron con un volumen de acetato de uranilo al 1.5%. Se transfirió una gota de esta mezcla a rejillas de cobre de malla 100 previamente tratadas con una solución al 2% de formvar (SPI-CHEM) y cubiertas con una película delgada de carbón. La gota se mantuvo en la rejilla de cobre durante 1

minuto, y se enjuagó con agua bi-destilada. Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM-1400, a 80 kV de voltaje de aceleración, en el Laboratorio Nacional de Servicios Externos del Cinvestav-IPN.

5.5. Microscopía Electrónica de Barrido

Se prepararon las muestras de NTS-poliplex en DMEM o en el vehículo desarrollado y se colocaron en un dispositivo portamuestra (hierro-aluminio), el cual se trató con cinta adhesiva de ambos lados (#5085 SPI-AB-Cu). Las muestras se secaron en una cámara de vacío (TM 1.0 Desiccator cabinet; Bel-Art Products) por dos horas a temperatura ambiente. Las micrografías se tomaron en el Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) utilizando un microscopio electrónico de emisión de campo de barrido (Zeiss-Auriga-39-16) con los siguientes parámetros: Voltaje de aceleración, 2 kV; distancia de trabajo, 3.8 mm; apertura, 7.5 m; y un detector de electrones secundarios.

5.6. Dispersión Dinámica de Luz

Las muestras de NTS-poliplex preparadas en DMEM o en el vehículo prototipo (Cfs: pDNA: 6 nM, KP: 5 M, acarreador de neurotensina: 144 nM) se transfirieron a una celda capilar Malvern DTS1060 para análisis de dispersión dinámica de luz Malvern Zetasizer Nanoseries 3600 y NanoTrac Wave, MicroTrac. Los parámetros del Procedimiento Standard de Operación en el software fueron: Administrador de Dispersante: agua; Administrador de materiales: proteína; Viscosidad de la Muestra: agua; Duración de la medición: automática (3 mediciones); Duración de la Medición: automática; Cálculo de resultados: propósitos generales (*“general purpose”*). La distribución de tamaño por intensidad se ajustó a la función de correlación por los algoritmos del software del instrumento Zetasizer.

5.7. Movilidad electroforética

El potencial zeta de las muestras de NTS-poliplex preparadas en DMEM o en la formulación prototipo (Cfs: pDNA: 6 nM, KP: 5 M, acarreador de neurotensina: 144 nM), se determinó por Movilidad Electroforética y Velocimetría Laser Doppler utilizando el instrumento Malvern Zetasizer Nanoseries 3600. Las muestras se colocaron en una celda capilar Malvern DTS1060 y se analizaron. Se realizaron las corridas con las siguientes especificaciones para el software: Dispersante: agua; 3 Repeticiones; función de Smoluchowski: 1.5; Administrados de materiales: proteína; Viscosidad: agua.

5.8. Dicroísmo Circular

Las muestras de NTS-poliplex preparadas en PF25 (Cfs: pDNA: 6 nM, KP: 5 M, acarreador de neurotensina: 144 nM) se colocaron en una celda de espectrosil para DC con un paso óptico de 0.1 cm. Se analizaron con un espectropolarímetro (Jasco J815) bajo las siguientes condiciones: rango de escaneo: 203 a 300 nm; paso de campo: 2 nm; velocidad de escaneo: 50 nm/min; tiempo de espera entre corridas: 1 sec; amplitud de bandeo: 5 nm; 3 corridas; modo estándar (100 mdeg).

5.9. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

Las muestras de NTS-poliplex preparadas en PF25 (Cfs: pDNA: 6 nM, KP: 5 M, acarreador de neurotensina: 144 nM) se colocaron en un portaobjetos y éste se introdujo a un desecador para obtener un polvo, el cual se introdujo en el compartimento para muestra de un espectroscopio infrarrojo *Spectrum 400* marca Perkin Elmer. Las muestras se analizaron en el rango de longitudes de onda de 4000 a 500 nm.

5.10. Protocolo de Liofilización

Los viales de dos mililitros para liofilización que contenían muestras de NTS-poliplex o vehículos se introdujeron en un sistema Labconco Benchtop Freeze Dry System. Las muestras se congelaron a -70 °C por 3 h a presión atmosférica y el ciclo de liofilización fue el siguiente: -50 °C por 1 h, -35 °C por 14 h (0.08

mbar de presión); 0 °C por 1 h (0.08 mbar de presión), 20 °C por 5 h (0.04 mbar de presión). Después de la liofilización, los viales se cerraron bajo vacío y se almacenaron a 4 °C hasta su reconstitución. La reconstitución se llevó a cabo utilizando agua inyectable.

5.11. Radio SEC-HPLC

El PK radiomarcado consistió en el péptido TAT-RGD (NH₂-RKKRRQRRRGGC[c(RGD_DYK)-3-succinimidopropionilamida]-G-C(Acm)-G-C(Acm)-CONH₂(N₂S₂-RKKRRQRRRc(RGDyK))) acoplado a tecnecio (Tc)^{99m} (actividad específica: 6.4 GBq/μmol). Este es un péptido con señal de localización nuclear y previamente, se realizaron pruebas de retención electroforética y de transfección obteniéndose resultados equivalentes a los obtenidos con el PK descrito anteriormente. Para el radioSEC-HPLC, el pDNA, el Tc^{99m}-PK radiomarcado y las muestras de NTS-poliplex preparadas en el vehículo prototipo (Cfs: pDNA: 6 nM, KP: 5 M, acarreador de neurotensina: 144 nM) se analizaron en un instrumento Waters HPLC Acquity utilizando una columna Protein-Pak 300 SW (Waters); y agua a 1 mL/min como fase estacionaria y móvil, respectivamente. Para monitorear la estabilidad del complejo y el ensamblaje del PK radiomarcado, el pDNA y el acarreador de neurotensina, se acopló el detector Waters Photodiode UV-Vis a un detector de radiactividad gamma para HPLC (Nikyang). Los datos de absorbancia y cpm se procesaron con el software OriginLab para obtener los cromatogramas correspondientes y los tiempos de retención de cada componente y del NTS-poliplex.

6. RESULTADOS

Las características del NTS-poliplex y los resultados observados en modelos animales de EP y en algunos tipos de cáncer lo convierten en una alternativa para el tratamiento potencial de estos padecimientos. Es por esto que se planteó el objetivo de llevar a cabo los primeros pasos para la realización de

una vinculación exitosa academia-industria. Por tanto, en el presente trabajo se realizó, en primer lugar, la caracterización de las nanopartículas de NTS-poliplex, la cual permitió establecer parámetros de referencia para la evaluación de formulaciones y obtener un prototipo de forma farmacéutica inyectable.

Posteriormente se realizaron pruebas de estabilidad de los liofilizados a diferentes condiciones de almacenamiento para establecer su vida de anaquel.

Con el objetivo de determinar la integridad de los reconstituidos tras su interacción con suero (simulando la post-administración), se determinó la estructura física y el ensamblaje de las nanopartículas utilizando suero fetal bovino y humano, respectivamente.

Posteriormente se realizaron estudios de biodistribución y toxicidad y se obtuvieron resultados preliminares de una vía de eliminación de las partículas.

Por último, se propuso un proceso de producción escalable, rentable y compatible con BPF, del cual se lograron avances experimentales en cuanto a la producción de pDNA y de acarreador.

6.1. Formulación del NTS-poliplex

Como primer paso para comenzar con la caracterización del NTS-poliplex, se procedió a establecer formulaciones prototipo con la finalidad de obtener una caracterización conjunta, comparando el comportamiento y atributos de las nanopartículas en DMEM y en los prototipos.

En primer lugar se establecieron los componentes que conferirían las características deseables en la forma farmacéutica final del NTS-poliplex. Considerando las composiciones del DMEM, del líquido cefalorraquídeo y plasma humano, se eligieron los componentes de los prototipos de formulación para el NTS-poliplex (tomando en cuenta la fuerza iónica aportada por las cargas de los diversos electrolitos que los componen). En las siguientes tablas se enlista la composición en suero de electrolitos y carbohidratos simples, así como del DMEM utilizado (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Composición electrolítica y variables fisicoquímicas del líquido cefalorraquídeo y plasma¹⁰⁸.

	LCR	Plasma
Densidad específica	1.007	1.025
Osmolaridad (mOsm/kg H ₂ O)	289	289
Ph	7.31	7.41
Sodio (mEq/L)	141	140
Potasio (mEq/L)	2.9	4.6
Calcio (mEq/L)	2.5	5.0
Magnesio (mEq/L)	2.4	1.7
CO ₂ (mM)	1.5	1.24
Cloro (mEq/L)	124	101
Bicarbonato (mEq/L)	21	23
Glucosa (mg/100 mL)	61	92
Proteínas (mg/100 mL)	28	7000
Albúmina	23	4430
Globulina	5	2270
Fibrinógeno	0	300

Tabla 5. Composición del Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

COMPONENTE	[g/L]	[mM]
Sales inorgánicas		
Cloruro de Calcio	0.2	0.59
Nitrato Férrico • 9H ₂ O	0.0001	3 x 10 ⁻⁴
Sulfato de Magnesio (anhidro)	0.09767	0.69
Cloruro de Potasio	0.4	2.3
Bicarbonato de Sodio	3.7	19.3
Cloruro de Sodio	6.4	39.5
Fosfato de Sodio Monobásico (anhidro)	0.109	0.79
Amino Ácidos		
L-Arginina • HCl	0.084	0.4
L-Cystina • 2HCl	0.0626	0.32
Glicina	0.03	0.4
L-Histidina • HCl • H ₂ O	0.042	0.2
L-Isoleucina	0.105	0.8
L-Leucina	0.105	0.8
L-Lisina • HCl	0.146	0.8
L-Metionina	0.03	0.2
L-Fenilalanina	0.066	0.4
L-Serina	0.042	0.4
L-Treonina	0.095	0.8
L-Triptófano	0.016	0.08
L-Tirosina • 2Na • 2H ₂ O	0.6351	2.4
L-Valina	0.094	0.8
Vitaminas		
Cloruro de Colina	0.004	0.03
Ácido Fólico	0.004	0.01
<i>myo</i> -Inositol	0.0072	0.04
Niacinamida	0.004	0.03
D-Ácido Pantoténico (hemicalcio)	0.004	0.009
Piridoxina • HCl	0.004	0.02
Riboflavina	0.0004	0.001
Tiamina • HCl	0.004	0.01
Otros		
D-Glucosa	4.5	25
Adicionar		
L-Glutamina	0.584	4

Asimismo, se tomó en cuenta la inocuidad de cada componente seleccionado, sin comprometer la rentabilidad de la formulación. La tabla 6

resume las sustancias consideradas para la formulación de los prototipos de vehículo de acuerdo con los atributos buscados.

Tabla 6. Componentes y atributos buscados en la formulación del NTS-poliplex

EXCIPIENTE	FUNCIÓN	EJEMPLOS	SUBSTANCIA SELECCIONADA	REFERENCIA(S)
Estabilizador	Evitar la degradación	Surfactantes, azúcares, sales, polioles	Glucosa, NaCl, KCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ , NaH ₂ PO ₄	92; 110; 111
Solubilizador	Proveer buena solubilidad evitando la formación de agregados	Sales, surfactantes	NaCl, KCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ , NaH ₂ PO ₄	67; 75; 96; 97; 110; 112
Amortiguador	Conservar el pH	Fosfatos, citratos, aminoácidos	NaH ₂ PO ₄	92; 107; 113; 114
Modificadores de tonicidad	Proveer isotonicidad	Sales, sacáridos, polioles, polímeros	NaCl, Glucosa	99; 115
Crio- y lioprotector	Protección en el proceso de liofilización	Sacáridos, polioles, polímeros, aminoácidos	Glucosa	107; 113; 115
Proveedores de volumen	Proveer la estructura adecuada de la "torta" del liofilizado	Sacáridos, polioles, aminoácidos	Glucosa	114; 115

* **Negritas:** Grupos o moléculas seleccionados para el prototipo de formulación.

Como resultado del análisis, y con el propósito de evaluar el efecto de la glucosa en la estabilización del sistema de nanopartículas de NTS-poliplex, se diseñaron 3 formulaciones (Tabla 7).

Tabla 7. Prototipos de formulaciones a pH 7.4 para las nanopartículas de NTS-poliplex.

COMPUESTO	PROTOTIPO DE FORMULACIÓN		
	PF25	PF100	PF280
	CONCENTRACIÓN (mM)		
NaCl	136	136	136
KCl	3.7	3.7	3.7
CaCl ₂	1.2	1.2	1.2
MgCl ₂	1	1	1
NaH ₂ PO ₄	1	1	1
Glucosa	25	100	280

La concentración de 25 mM de glucosa es equivalente a 0.45% (m/v); 100 mM equivale a 1.8% (m/v) y 280 mM a 5% (m/v). Se eligieron estas tres concentraciones para determinar si las propiedades físicas y la funcionalidad de las nanopartículas del NTS-poliplex se ven afectadas por la concentración de glucosa, de acuerdo con publicaciones anteriores^{71; 99}.

Las nanopartículas de NTS-poliplex en todas las formulaciones prototipo presentaron un aspecto homogéneo, incoloro y transparente, sin partículas visibles en suspensión.

El siguiente paso fue determinar la osmolaridad de cada formulación. Los datos obtenidos se compararon con los valores para solución isotónica de referencia, y para el DMEM conteniendo las concentraciones de glucosa correspondientes a cada formulación. La tabla 8 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 8. Osmolaridades de los prototipos de formulación y de DMEM (formulación experimental) suplementado con diferentes concentraciones de glucosa (EF25, EF100 y EF280, respectivamente)

VEHÍCULO	OSMOLARIDAD MEDIA (mOsm/L)
Solución fisiológica estándar	289.2
EF25	283
EF100	349.5
EF280	480.6
PF25	280.6
PF100	340.9
PF280	501.2

Los datos arrojados demuestran un aumento significativo de la osmolaridad en las soluciones con glucosa 100 y 280 mM en comparación con los datos de la solución isotónica y del DMEM con la concentración basal de glucosa (25 mM). Por tanto, esto se atribuye exclusivamente a la glucosa, y sugiere que la concentración establecida de sales es isotónica y por lo tanto segura para su aplicación clínica. Asimismo, la concentración basal de glucosa no aporta un aumento significativo en la osmolaridad, por lo que esta concentración puede considerarse segura para el organismo.

6.2. La funcionalidad biológica *in vitro* del NTS-poliplex se ve afectada por la concentración de glucosa en el vehículo

El siguiente paso fue determinar si el NTS-poliplex en las formulaciones propuestas es capaz de transfectar células N1E-115. Ésta línea celular se caracteriza por contar con una alta densidad de receptores NSTR1^{116; 117}, y es la que se utiliza en el laboratorio para evaluar la eficiencia de transfección del NTS-poliplex. Al mismo tiempo, se determinó en qué proporción se da esta tasa de transfección con las nanopartículas de NTS-poliplex utilizando los prototipos de formulación en comparación con DMEM, y de qué manera la osmolaridad tan elevada de las concentraciones más altas de glucosa repercute en la transfección (e incluso viabilidad) de dichas células.

En primer lugar se realizaron ensayos de transfección y se obtuvieron micrografías utilizando un microscopio de epifluorescencia. En el caso de los ensayos correspondientes a PF100 y PF 280 se observó la muerte del total de las células, debido al choque osmótico provocado por su alta osmolaridad (datos no mostrados). En el caso de las nanopartículas en PF25, se observó una tasa de transfección comparable a la del NTS-poliplex en EF25 (Figura 21A).

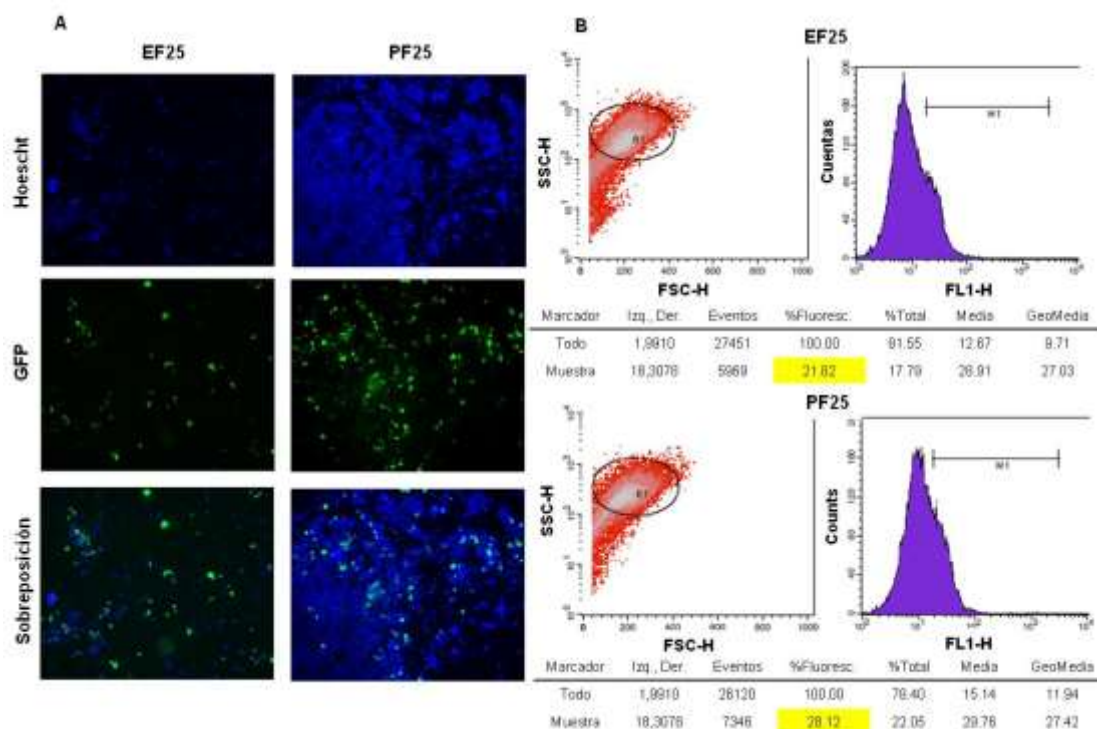


Figura 21. Funcionalidad biológica del NTS-poliplex en PF25 en comparación con EF25. A) Micrografías de epifluorescencia; células transfectadas con NTS-poliplex /pEFGP-N1. La fluorescencia fue documentada utilizando un microscopio Leica DMIRE2 con el filtro de 460-500 nm (fluorescencia azul) y 510 nm (fluorescencia verde). B) Gráficas representativas de citometría de flujo y resultados de eficiencia de transfección

Con el fin de obtener de manera cuantitativa la eficiencia de transfección se realizaron análisis de citometría de flujo (Figura 21B). La eficiencia de transfección del NTS-poliplex en EF25 fue de $22.13 \pm 3.1\%$ ($n = 6$) y en PF25 fue de $27.92 \pm 2.3\%$ ($n = 6$). El análisis estadístico de las medias independientes utilizando la prueba paramétrica *t de student* arrojó un valor de $P < 0.05$, indicando así que hay diferencia significativa entre ambos grupos experimentales. Por lo tanto, se demuestra así que el NTS-poliplex en PF25 es capaz de transfectar la línea celular N1E-115 con una mayor eficiencia de transfección en comparación con EF25.

Asimismo, la concentración de glucosa en PF25 es segura para la línea celular; sin embargo, las concentraciones de 100 y 280 mM de glucosa no son seguras, ya que ocasionan un choque osmótico en las células y por tanto, el NTS-poliplex en estos vehículos pierde su funcionalidad biológica.

6.3. El NTS-poliplex es capaz de transfectar *in vivo* utilizando PF25

Para verificar que la funcionalidad del NTS-poliplex en PF25 también se reproduce *in vivo*, se realizó un procedimiento de transfección en células dopaminérgicas de la SNc de ratas Wistar, las cuales se caracterizan por expresar la más alta densidad de NTSR1 en el cerebro¹³. En la figura 22 se presentan las micrografías obtenidas de los cortes analizados en el microscopio confocal (trabajo realizado por el M. en C. Armando Espadas Álvarez).

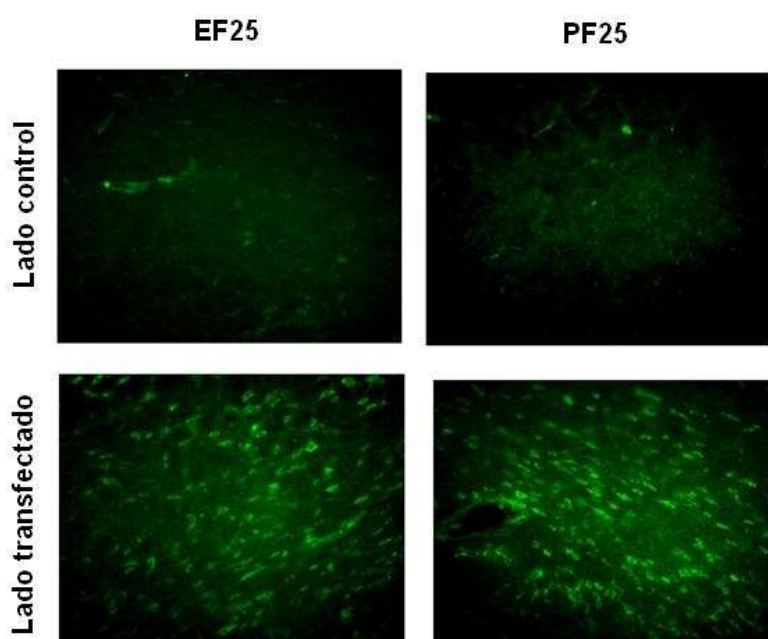


Figura 22. Micrografías confocales de la SNc de ratas Wistars sin transfección (control negativo) y transfectadas con las nanopartículas de NTS-poliplex /pEFGP-N1 formuladas en EF25 ó PF25

Se puede observar que, al igual que *in vitro*, *in vivo* el NTS-poliplex en PF25 es capaz de transfectar las neuronas dopaminérgicas de manera comparable a cuando se encuentra formulado en EF25. Cabe mencionar que se realizaron las transfecciones utilizando PF100 y PF280; sin embargo, no se observó transfección.

6.4. Efectos de la concentración de glucosa en el vehículo sobre la forma física y el patrón de aglomeración del NTS-poliplex

El siguiente paso consistió en evaluar las modificaciones de la estructura física por efecto de la formulación y la concentración de glucosa presente en cada fórmula. Se realizaron análisis de TEM de muestras de NTS-poliplex preparadas en EF25 y en PF25 y PF280. Asimismo, se incluyeron muestras adicionando 1% de SFB (concentración utilizada durante la transfección *in vitro*) con el objetivo de evaluar el efecto de la glucosa en esta interacción sobre la estructura del NTS-poliplex (Figura 23).

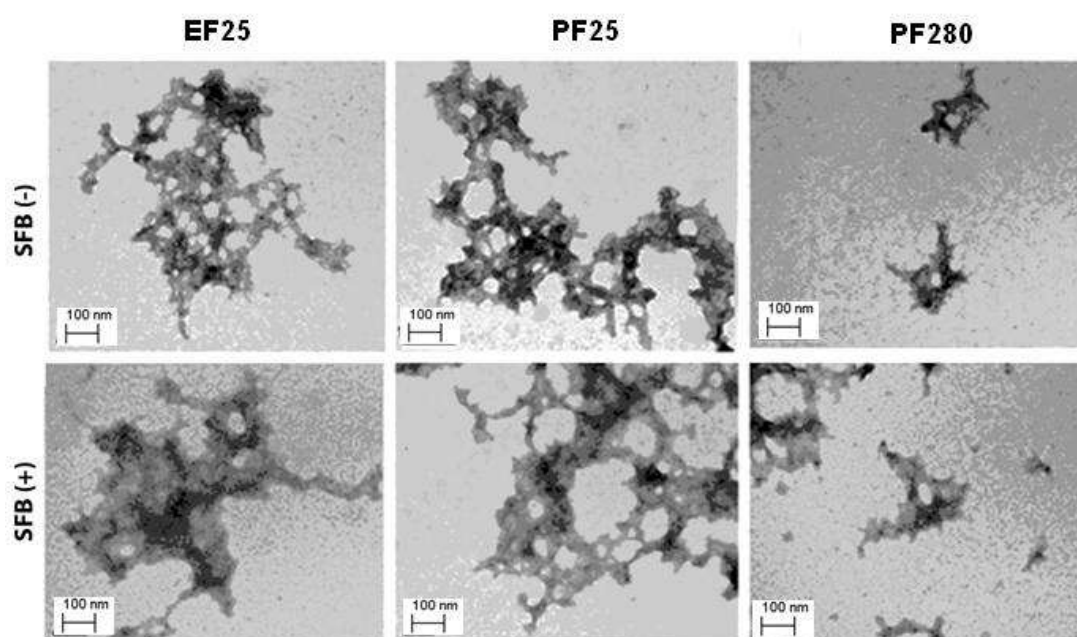


Figura 23. Micrografías representativas del análisis por microscopía electrónica de transmisión del NTS-poliplex formado en EF25 o en PF25, en ausencia (-) o en presencia (+) de SFB. *DMEM*: Dulbecco's Modified Eagle Medium; *SFB*: Suero Fetal Bovino. El SFB se adicionó en el momento del ensamblaje; una vez ensambladas, las nanopartículas se colocaron inmediatamente en las rejillas pretratadas para TEM

En primer lugar, puede confirmarse la estructura tipo toroide de las nanopartículas de NTS-poliplex, de acuerdo con la literatura^{64; 65; 118}. Se observa además, la tendencia a formar aglomerados de diversos tamaños, los cuales pueden también estar dados por formas intermedias tipo barra¹¹². Esta asociación podría ser causada por la falta de neutralización de cargas de algunas nanopartículas, al tener la poli-L-lisina una muy alta densidad de cargas positivas.

Se ha reportado que proporciones elevadas de sacárido/pDNA aportan estabilidad (y, a la postre, crio- y lioprotección) al sistema^{72; 99; 119}.

Lamentablemente, las concentraciones elevadas de glucosa no son viables para el uso clínico, como se demostró en los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Puede observarse también que el suero no influye en la morfología final ni en el patrón de aglomeración de las nanopartículas; aunque su presencia en el complejo pDNA-PK pueda influir en facilitar una compactación previa a la adición del acarreador de acuerdo con lo reportado previamente por Arango-Rodríguez *et al*⁶⁵.

Por otro lado, el patrón de aglomeración, la forma y el tamaño del NTS-poliplex en EF25 y PF25 son comparables. En ambos casos su tamaño oscila entre los 100 y 150 nm, formando aglomerados de diversos tamaños que pueden llegar a tener hasta aproximadamente 0.5 μm de diámetro.

6.5. La morfología del NTS-poliplex en EF25 y PF25 es comparable

Para confirmar lo observado en TEM y obtener imágenes tridimensionales de la estructura del NTS-poliplex, se realizaron análisis de SEM (Figura 24). Cabe mencionar que a partir de este punto se trabajó únicamente con PF25, debido a la inviabilidad de las concentraciones mayores de glucosa para su uso clínico.

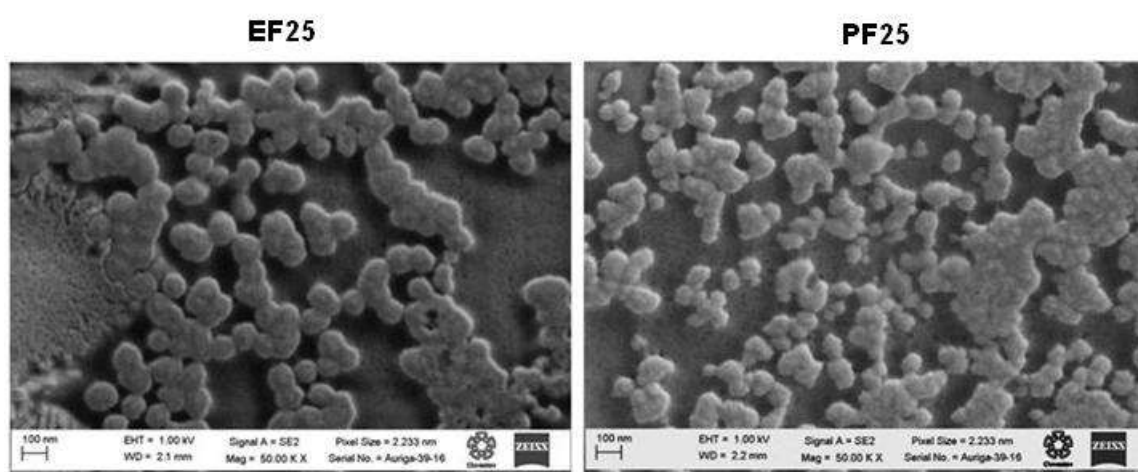


Figura 24. Micrografías representativas del análisis morfométrico de las nanopartículas de NTS-poliplex en EF25 ó PF25 utilizando un microscopio electrónico de barrido

Se puede confirmar el tamaño observado de las nanopartículas en TEM (de 100 a 150 nm) para ambos vehículos, y que la estructura de las nanopartículas en ambas formulaciones es comparable.

6.6. Efecto del vehículo propuesto en el tamaño y la carga de superficie de las nanopartículas de NTS-poliplex

Con el objetivo de establecer parámetros cuantitativos para la evaluación del comportamiento de las nanopartículas de NTS-poliplex en EF25 y PF25, se determinaron el tamaño de partícula y la carga de superficie.

Para determinar el tamaño de partícula y distribución del NTS-poliplex se realizaron análisis de DDL. Por otro lado, empleando el mismo equipo (Zeta Sizer Nano Series) se determinó la carga de superficie (potencial zeta) de las nanopartículas, mediante la técnica de movilidad electroforética por VLD (Figura 25).

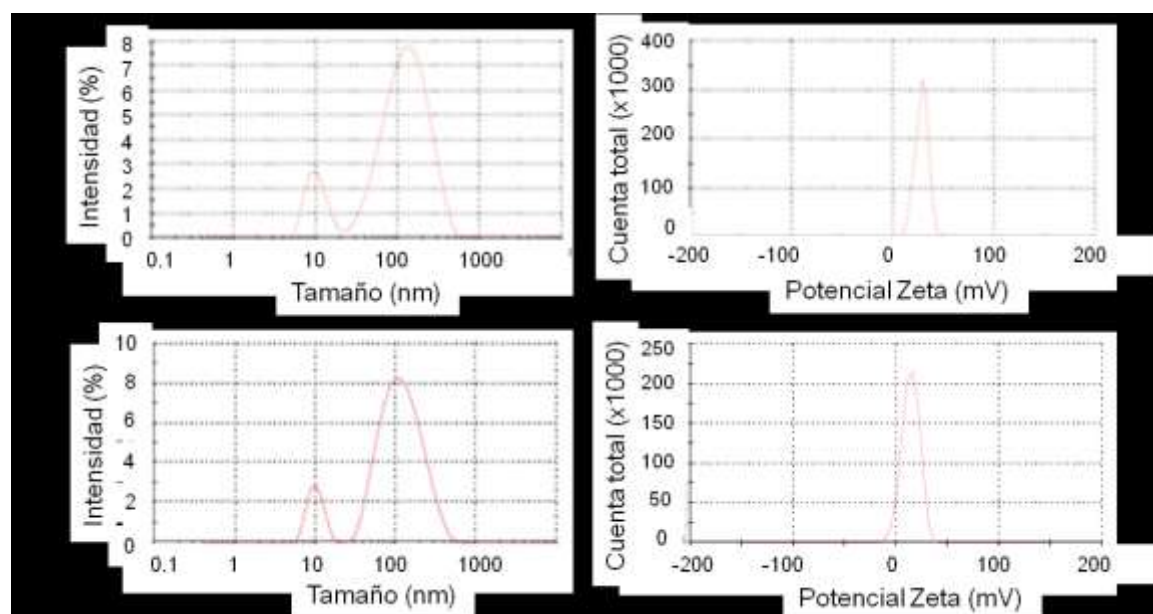


Figura 25. Distribución del tamaño y potencial zeta de las nanopartículas de NTS-poliplex preparadas en DMEM o en la formulación glucosa 25 mM. Se utilizó un Zeta Sizer Nano Series 3600

Se puede observar que hay una distribución normal en el tamaño de las nanopartículas de NTS-poliplex, siendo comparable el comportamiento en EF25

y PF25. Se realizaron tres repeticiones del análisis por muestra, y fue un total de seis muestras de cada medio. El tamaño promedio de las partículas de NTS-poliplex en EF25 fue de 142.8 nm, y en PF25 de 141.7 nm (con base en la población con mayor intensidad) (Figura 25). No hubo diferencia significativa entre los tamaños del NTS-poliplex en ambas formulaciones ($P > 0.05$; *t* de *Student*). Los índices de polidispersión (Pdl) promedio fueron 0.59 y 0.55 para EF25 y PF25, respectivamente; no hay diferencia significativa ($P > 0.05$; *t* de *Student*). Esto confirma lo observado en TEM y SEM en cuanto a tamaño y patrones de aglomeración.

Utilizando el instrumento *Nanotracs Wave*, el cual se fundamenta también en la DDL, se realizaron corridas de determinación del tamaño de las nanopartículas de NTS-poliplex preparadas en PF25 (Figura 26). El instrumento se programó definiendo una forma de partícula no esférica.

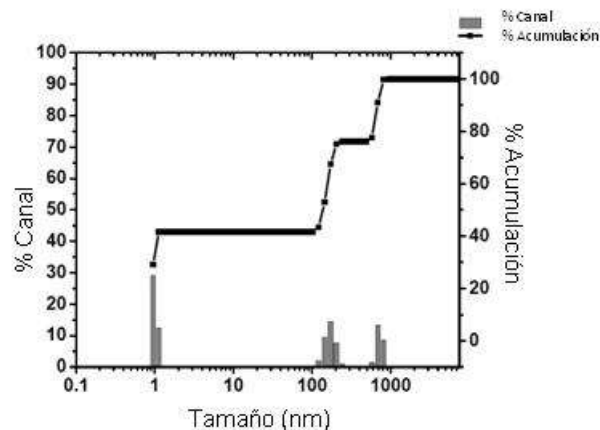


Figura 26. Distribución de tamaño de nanopartículas de NTS-poliplex por Dispersión Dinámica de Luz mediante el instrumento *Nanotracs Wave*

Se observan tres poblaciones con tamaños de en promedio 1, 150 y 700 nm; la población mayoritaria corresponde a 110 nm aprox (Figura 26). Esto confirma los datos obtenidos del ZetaSizer Nano Series 3600. Las partículas de NTS-poliplex forman aglomerados que pueden llegar incluso a la micra de diámetro, teniendo un tamaño individual aproximado de 150 nm. La población de 1 nm se atribuye a un artificio.

En cuanto al potencial zeta, el valor promedio en EF25 fue de 25.3 mV, mientras que en la formulación se observa un desplazamiento hacia el cero: 14.1

mV (Figura 25). En este caso el análisis estadístico arrojó una diferencia significativa en estos valores ($n = 6$; $P < 0.05$; prueba t de *Student*). Esto puede deberse a que la formulación aporta una fuerza iónica adecuada para el ensamblaje por interacción electrostática.

6.7. Caracterización de la estructura secundaria por las técnicas de Dicroísmo Circular (DC) y Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

Los resultados anteriores confirmaron que no hay diferencia significativa en la forma física, tamaño y funcionalidad biológica entre el NTS-poliplex formulado en PF25 con respecto al preparado en EF25.

Por otro lado, es importante determinar también su estructura secundaria, ya que es una herramienta adicional para evaluar el comportamiento y el ensamblaje de las nanopartículas, y los métodos e instrumentos para su determinación pudieran ser más adaptables a un futuro control rutinario de calidad. Se utilizaron dos metodologías para lograr este objetivo: DC y FT-IR.

En primer lugar se obtuvieron los espectros de CD del pDNA a la concentración 6 nM y 30 nM en las cuales se ensamblan las nanopartículas para su uso *in vitro* e *in vivo*, respectivamente (Figura 27A). El patrón de bandeo observado en el espectro de pDNA corresponde al que ha sido reportado previamente para concentraciones similares en el mismo rango de longitud de onda⁶⁸. Los espectros del resto de los componentes del NTS-poliplex se muestran en la Figura 27B.

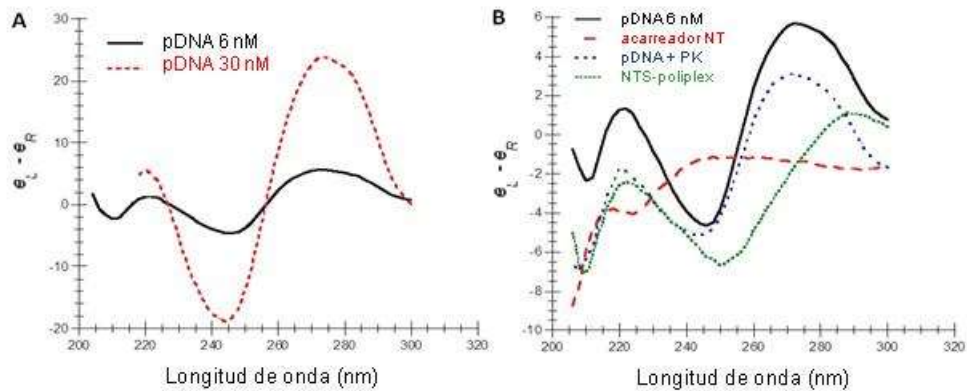


Figura 27. Dicroísmo circular de las nanopartículas de NTS-poliplex y sus componentes. A) Espectros superpuestos del pDNA (pEGFP-N1) a la concentración de 6 nM y 30 nM. B) Espectros superpuestos del pDNA (pEGFP-N1 6 nM), acarreador de neurotensina, complejo pDNA-PK y NTS-poliplex

El espectro correspondiente al acarreador de neurotensina muestra un pico positivo de baja intensidad alrededor de los 215 nm. Este pico es comparable al patrón observado en el plegamiento “random coiled” que presentan fragmentos de proteína, péptidos y polímeros^{120; 121}. Este comportamiento es el esperado, ya que al estar constituido por una columna de homopolímero, no hay interacciones entre los grupos funcionales de sus aminoácidos de forma que existan estructuras secundarias características de las proteínas, como la alfa hélice o beta plegada.

El desplazamiento de bandas en el espectro de NTS-poliplex muestra la interacción entre sus componentes (Figura 27B). Cabe mencionar que estos ensayos fueron realizados únicamente con PF25, ya que los componentes de EF25 presentaron sus propios patrones de bandeado que causaron interferencia para los fines perseguidos. Esto es una ventaja adicional de la formulación propuesta, ya que permite el uso de metodologías alternativas para la evaluación de la calidad de las nanopartículas de NTS-poliplex.

Como complemento de los resultados anteriores, los componentes individuales del NTS-poliplex y las nanopartículas en PF25 se secaron al vacío y se analizaron por F.T.-I.R. Cabe mencionar que en este estudio se utilizó un péptido cariofílico alterno llamado TAT-RGD. Este tiene características muy similares en cuanto a peso y composición del péptido cariofílico utilizado en los ensayos previos. Para confirmar su equivalencia se realizaron ensayos de

retardamiento y retención electroforéticas con el péptido TAT-RGD, los cuales arrojaron resultados comparables a los obtenidos con el péptido cariophilico anterior (resultados no mostrados). Este cambio se hizo por cuestiones de practicidad y en común acuerdo con el equipo del laboratorio de Materiales Radiactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), donde se realizó este ensayo. Los espectros de F.T.-I.R. se presentan en la figura 28:

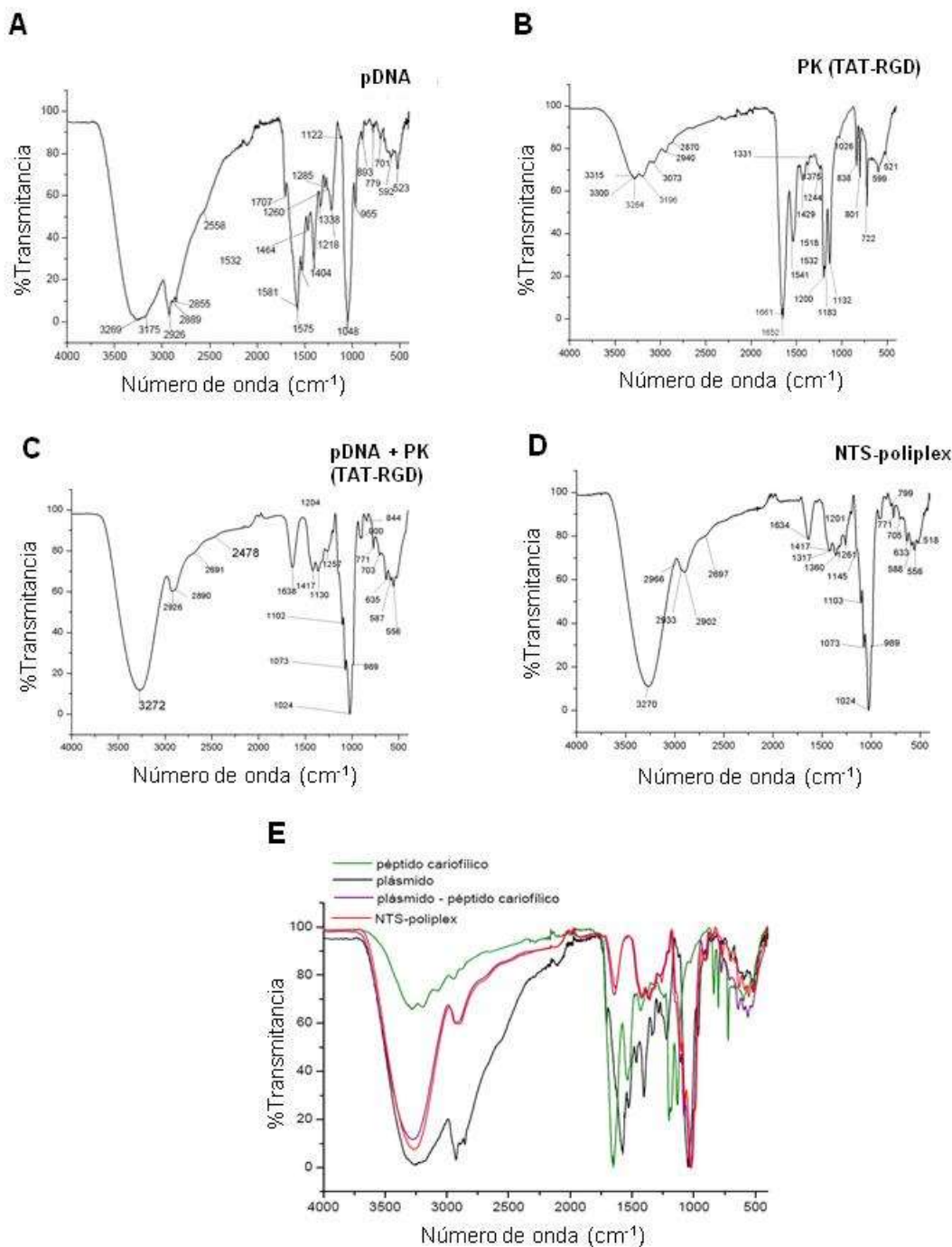


Figura 28. Espectros de F.T.-I.R. de las nanopartículas de NTS-poliplex y sus componentes. A) pDNA; B) Péptido cariofilico radiomarcado ^{99}Tc -TAT-RGD; C) Interacción de pDNA con ^{99}Tc -TAT-RGD; D) NTS-poliplex (pDNA+ ^{99}Tc -TAT-RGD+acarreador de neurotensina); E) Sobreposición de A-D. F.T.-I.R.: Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier; PK: Péptido cariofilico

Los espectros del pDNA y del péptido cariofilico TAT-RGD presentan las bandas esperadas para cada grupo presente en ellos, de acuerdo con la figura 29 y la tabla 9:

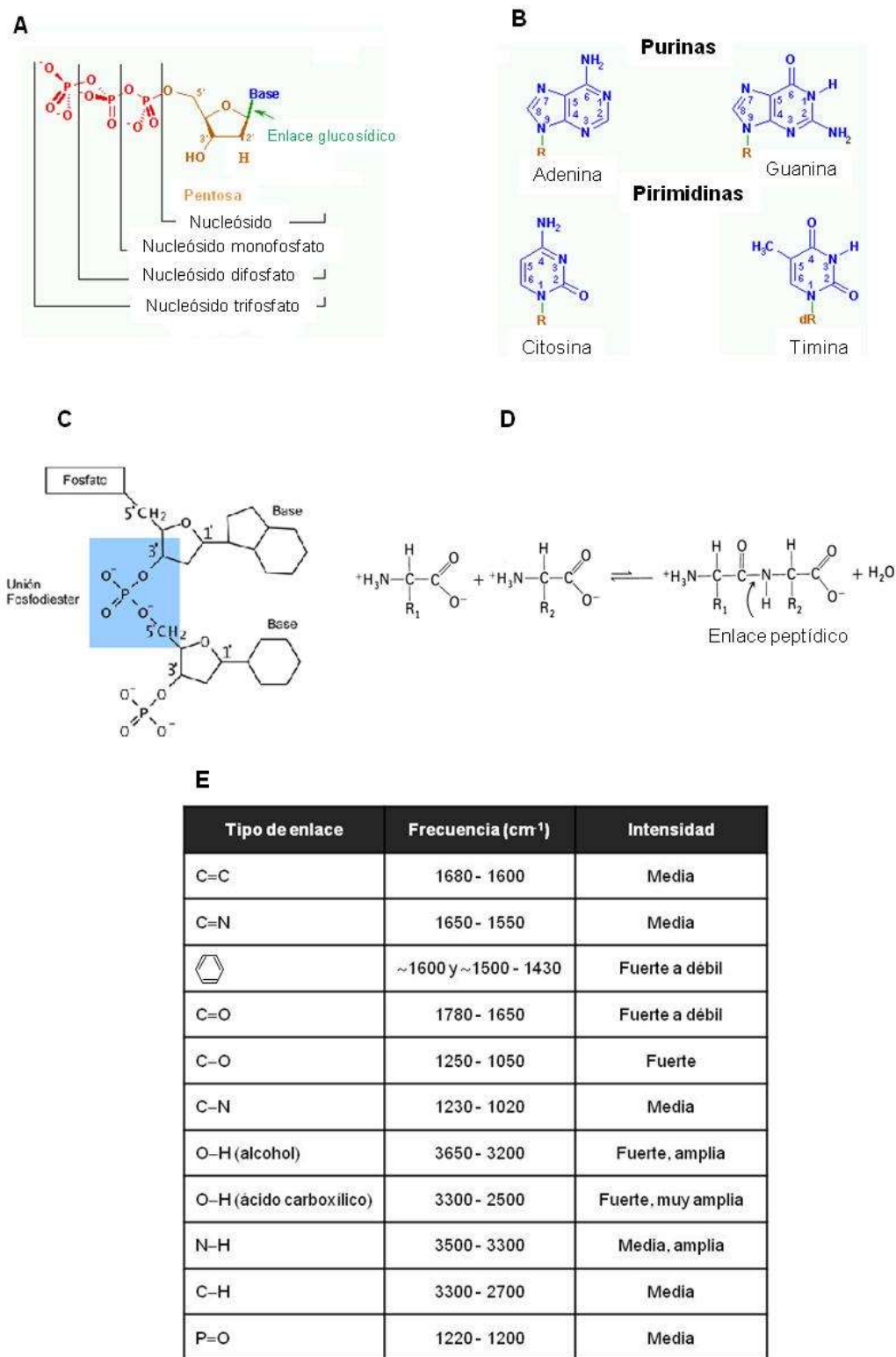


Figura 29. Grupos funcionales identificados por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (F.T.-I.R.) presentes en los componentes de las nanopartículas de NTS-políplex. A) Grupos funcionales presentes en cada nucleótido de pDNA; B) Estructura y grupos funcionales presentes en las bases púricas y pirimídicas que conforman los nucleótidos. C) Cada nucleótido se une entre sí mediante enlaces fosfodiéster; D) Grupos funcionales presentes en el acarreador de neurotensina y en los péptidos fusogénico, cariofílico y neurotensina; E) Tabla de frecuencias a las que absorbe cada grupo funcional¹²². *Nucleótido* = Nucleosido trifosfato

Tabla 9. Interpretación de bandas de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier del NTS-políplex y sus componentes de acuerdo con el número de onda y los grupos funcionales correspondientes^{122; 123}

GRUPOS FUNCIONALES (VIBRACIONES)	DESIGNACIÓN	pDNA	PK (TAT-RGD)	pDNA – PK (TAT-RGD)	NTS-políplex
Tensión N-H	Amida	-	3315	-	-
Tensión OH	Alcohol	3269	-	3272	3270
Tensión N-H	Amida	-	3300	-	-
Tensión N-H	Amida	-	3284	-	-
Tensión N-H	Amida	3175	3196	-	-
Tensión N-H	Amida	-	3073	-	-
Tensión C-H	Metilo	-	-	-	2966
Tensión C-H	Metilo	2926	2940	2926	2933
Tensión C-H	Metilo	2889	2870	2890	2902
Tensión C-H	Aldehído	2855	-	2691	2697
Tensión C=O	Cetona	1707	-	-	-
Tensión C=O	Amida	-	1661	-	-
Tensión C=O	Amida	-	1652	1638	1634
Flexión N-H	Amida	1581	-	-	-
Tensión C-N	Amida	-	-	1417	1417
Tensión C-N	Amina (arilo)	-	-	-	1317
Flexión N-H	Amida	1575	-	-	-
Flexión N-H	Amina	-	1541	-	-
Flexión O-H	Ácidos carboxílicos	1404	1429	-	-
CNestir (40%), NH (30%), C-C (30%), C-O	Amida	-	1375	-	-
C-H	Flexión en plano	-	-	-	1360
Tensión C-N	Amina primaria aromática	1338	-	-	-
Tensión C-N	Amina secundaria	1285	1244	1257	1261
P=O	Fosfatos	1218	1200	-	1201
Tensión C-O	Alcohol	-	1183	1130	1145
Tensión C-C	Cetona	1122	1132	1102	1103
Tensión C-N	Aminas (alquilo)	-	-	1073	1073
Tensión C-N	Aminas (alquilo)	1048	1026	1024	1024
Tensión C-S	-	965	-	989	989
Flexión C-H	Alquenos (disustitución – 1,1)	893	-	900	-
Flexión N-H	Aminas	-	838	844	-
Flexión N-H	Aminas	-	801	-	-
Flexión C-H	Aromáticos (meta)	779	-	-	799
Flexión C-H	Aromáticos (orto)	-	-	771	771
NH, C-N	Amida	-	722	-	-
Flexión C-H	Alquenos (disustituido – Z)	701	-	703	705
-	-	-	-	635	633
CO, CN	Amida	592	599	587	588
Flexión C-C-C	-	-	-	556	556
Flexión C-C-C	-	523	521	-	518

Una vez que el pDNA y el péptido cariofílico interactúan, se modifica el patrón de bandeo debido a la compactación del pDNA. Así desaparecen los bandeos de algunos enlaces, ocasionado por el espacio limitado que tienen para emitir las vibraciones.

La adición de acarreador a este complejo no modifica de manera significativa el patrón de bandeo. Sólo se puede percibir un cambio ligero en la intensidad de las bandas en la región de 800 a 500 cm^{-1} . Esto concuerda con lo visto en DC y podría estar relacionado con la cantidad de moles y aporte al peso molecular final de cada componente en el ensamblaje del NTS-poliplex.

6.8. Diseño del proceso de liofilización del NTS-poliplex

Con el fin de conferir estabilidad y así una vida de anaquel prolongada al sistema NTS-polyplex, se desarrolló un proceso de liofilización.

En la literatura se han reportado diversas condiciones para la liofilización lipoplexes y otros poliplexes. De acuerdo con ella, además de la formulación, el parámetro crítico para la conservación de las nanopartículas después de dicho proceso es, en primer lugar, la congelación, seguida por la velocidad de calentamiento en la etapa de sublimación, y por último la presión utilizada en la sublimación y desorción.

Una vez ensambladas las nanopartículas, es importante que inmediatamente sean congeladas, con el fin de inmovilizarlas y así evitar al máximo la formación de agregados. La temperatura de congelación debe ser lo suficientemente baja para asegurar que durante la sublimación no haya lugar para la formación de formas coloidales. La velocidad baja de calentamiento para la sublimación también contribuye a este propósito¹²⁴.

Se realizaron diversas pruebas empleando el liofilizador FreeZone Triad Dry System, de Labconco. Con base en la evaluación de las características de los liofilizados, se establecieron las siguientes condiciones de liofilización para las nanopartículas de NTS-poliplex (Tabla 10).

Tabla 10. Condiciones de liofilización para las nanopartículas de NTS-poliplex

PARÁMETROS	CONDICIONES DE CONGELACIÓN	CONDICIONES DE SUBLIMACIÓN	CONDICIONES DE DESORCIÓN		
			-35	0	20
Temperatura (°C)	-80	-50	-35	0	20
Presión (mbar)	Atmosférica	0.08	0.04		
Tiempo (h)	3	1	14	1	5
Velocidad de calentamiento (°C/min)	-----	0.5	0.5	0.5	0.5

La Figura 30 presenta el diagrama del proceso de liofilización bajo las condiciones mostradas en la Tabla 10.

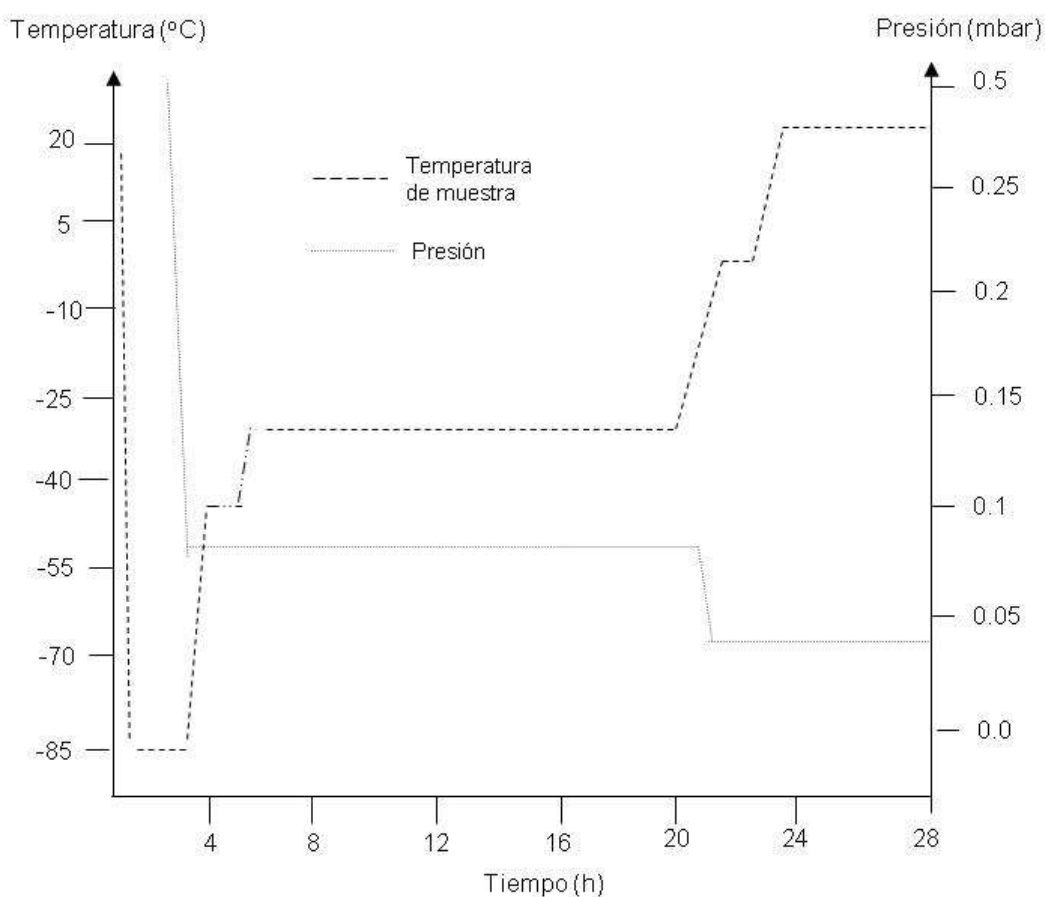


Figura 30. Diagrama del proceso estandarizado de liofilización para el NTS-poliplex

La apariencia de los liofilizados de las nanopartículas NTS-poliplex en PF25 fue una torta de polvo fino color blanco; en el caso de EF25 fue una torta de polvo fino color anaranjado. Los polvos presentaron un tiempo promedio de reconstitución de 9 s y una humedad relativa <1%, determinada por el método

Karl Fisher. Una vez reconstituidos, estos liofilizados presentaron una apariencia cristalina (EF25 color bugambilia; PF25 incoloro), sin sólidos en suspensión (Figura 31).

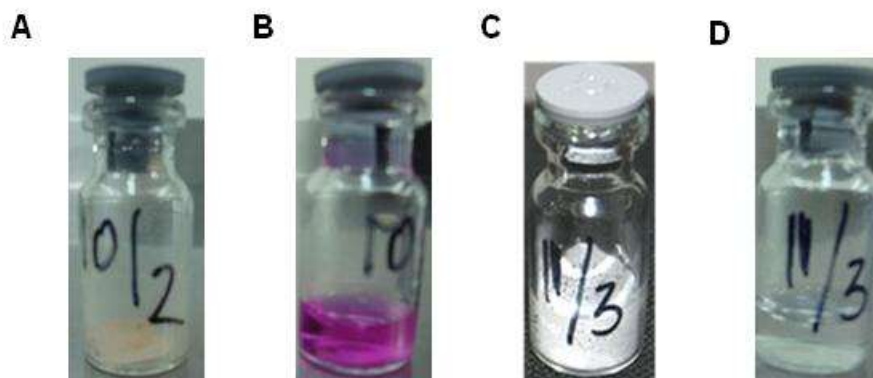


Figura 31. Apariencia de los liofilizados y reconstituidos de las nanopartículas de NTS-poliplex en EF25 y PF25. A) EF25; B) EF25 reconstituido; C) PF25; D) PF25 reconstituido

En cuanto al pH, se realizaron determinaciones a cada solución antes de iniciar el proceso de liofilización. En el caso de las nanopartículas de NTS-poliplex formulado en EF25 el pH fue de 8.5, confirmado por el color buganvilia del indicador contenido en EF25 (DMEM), ya que al acidificarse torna a un color amarillo. Para las muestras de NTS-poliplex en PF25, el pH fue de 7.4. Estos valores se conservaron después de la reconstitución, lo que indica que el fosfato monobásico de potasio es un buen amortiguador para la solución, lo cual resulta conveniente en cuanto a seguridad y costo de la formulación.

6.9. Efectos del proceso de liofilización sobre la funcionalidad biológica del NTS-poliplex

Después de obtener los liofilizados, el siguiente paso consistió en evaluar la funcionalidad biológica y eficiencia de transfección del NTS-poliplex reconstituido. Para esto, se realizaron ensayos de transfección utilizando la línea celular N1E-115 descrita anteriormente, la cual fue transfectada con las nanopartículas reconstituidas de NTS-poliplex conteniendo pEGFP-N1 (Figura

32 A, B). Asimismo, se administró NTS-poliplex reconstituido en la SNc de ratas Wistar para confirmar la funcionalidad biológica *in vivo* (Figura 32C).

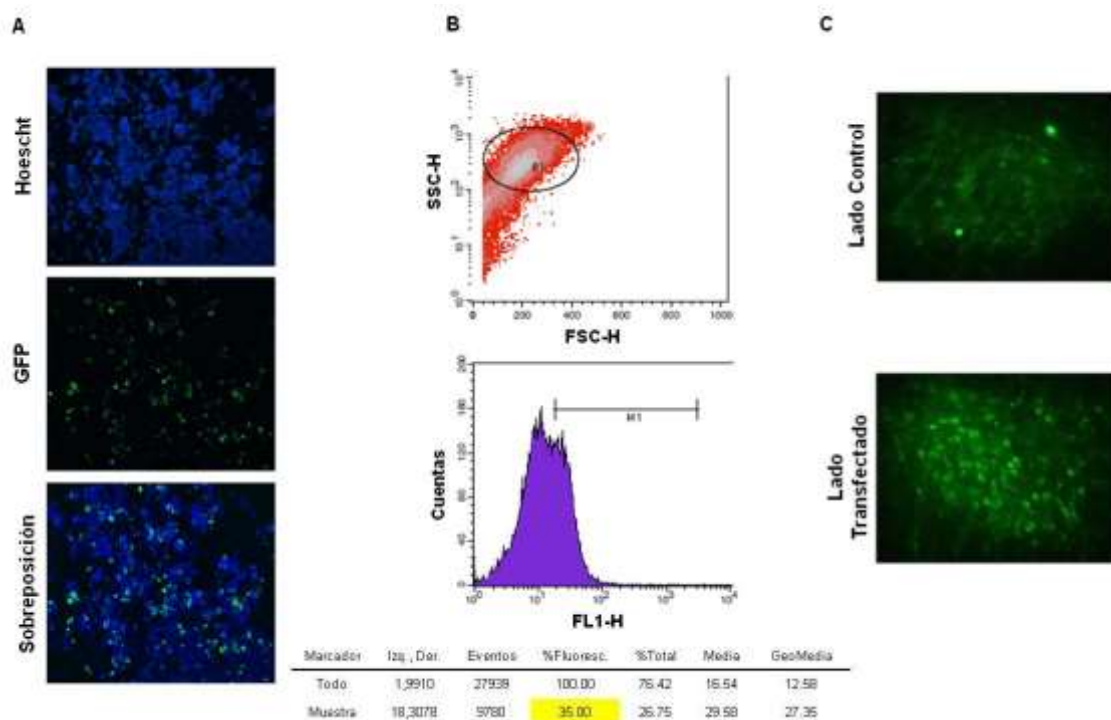


Figura 32. Funcionalidad biológica *in vitro* e *in vivo* de las nanopartículas de NTS-poliplex preparado PF25 y reconstituido con agua inyectable después de 2 días post-liofilización. A) Micrografías representativas de cultivos de células N1E-115 transfectadas con pEGFP/NTS-poliplex y observadas por microscopía de epifluorescencia. B) Gráficas representativas de la eficiencia de transfección del NTS-poliplex reconstituido. Los valores basales de las células N1E-115 sin transfectar son de $2.22 \pm 0.5\%$ (datos no mostrados). C) Micrografías de cortes de la SNc control o transfectada con NTS-poliplex reconstituido. Lado control: Inyección de PF25 reconstituido. Las muestras se formularon en PF25, se liofilizaron y después de 2 días de anaquel se reconstituyeron con agua inyectable

Las imágenes en la figura 32A muestran que las nanopartículas de NTS-poliplex reconstituido son capaces de transfectar células N1E-115 de manera semejante al recién preparado. Con el fin de obtener datos cuantitativos de eficiencia de transfección, se utilizó en otro ensayo citometría de flujo. La figura 32B muestra las gráficas correspondientes.

Se confirmó que el NTS-poliplex reconstituido es funcional. La eficiencia de transfección fue de $34.78 \pm 3.96\%$ ($n = 6$). Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$; *t* de Student) al comparar con la eficiencia de transfección del NTS-poliplex recién preparado en PF25 ($27.92 \pm 2.3\%$). Estos datos confirman que el

NTS-poliplex en PF25 conserva su capacidad para transfectar después de la reconstitución, con una eficiencia de transfección comparable e incluso mayor que el NTS-poliplex recién preparado (Figura 21B).

6.10. Efecto del proceso de liofilización sobre la forma física de las nanopartículas de NTS-poliplex

El siguiente paso consistió en comparar la estructura física de las nanopartículas de NTS-poliplex después del proceso de liofilización, así como su patrón de aglomeración. Para esto se utilizó TEM (Figura 33); y esto permitió hacer una correlación de estos dos parámetros con la eficiencia de transfección determinada.

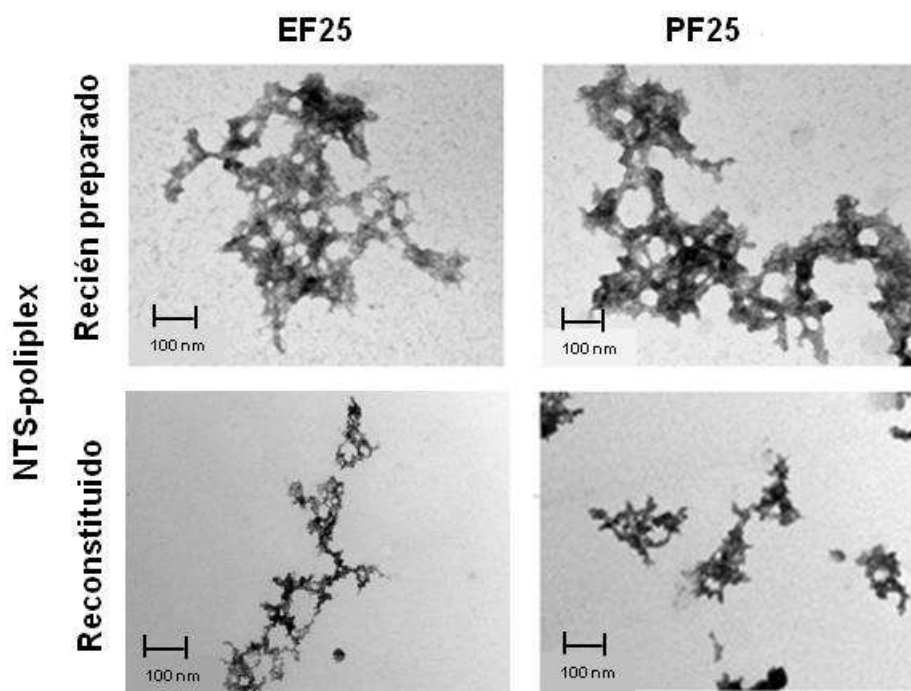


Figura 33. Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de NTS-poliplex de reciente preparación en EF25 o en EF25 y reconstituidos con agua inyectable después de 2 días de anaquel

Las imágenes de TEM muestran que las nanopartículas de NTS-poliplex conservan su morfología y tamaño después de la reconstitución tanto en EF25 como en PF25 (Figura 33). Sin embargo, en el caso de las muestras reconstituidas se observa una mayor dispersión de las partículas, por lo que el

patrón de aglomeración se vio modificado. Este hecho tiene alta relevancia, ya que la inmovilización (congelación inmediata) y liofilización del NTS-poliplex previnieron la formación de grandes agregados en las muestras. Derivado de esto, se puede deducir que la conservación de la estructura y los patrones de aglomeración observados correlacionan con la mejora en la eficiencia de transfección correspondiente a los reconstituidos.

6.11. Efectos del proceso de liofilización sobre el tamaño de partícula y potencial zeta de las nanopartículas de NTS-poliplex

El siguiente objetivo consistió en determinar el tamaño de partícula y carga de superficie del NTS-poliplex en PF25, liofilizado y reconstituido. La figura 34 presenta las gráficas correspondientes a la distribución de ambos atributos.

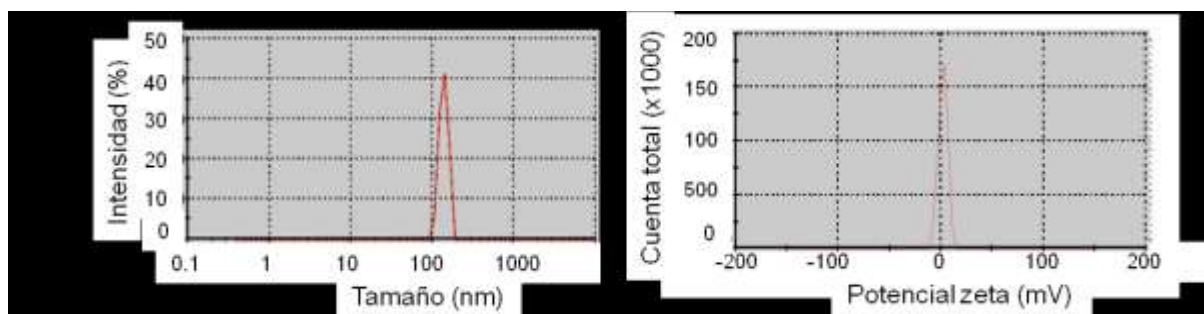


Figura 34. Gráficos representativos de distribución de tamaño de partícula y potencial zeta del NTS-poliplex formulado en PF25, liofilizado y reconstituido en agua inyectable. A) Tamaño de partícula; B) Potencial Zeta

En el caso del NTS-poliplex preparado en PF25, liofilizado y reconstituido, el diámetro promedio de las nanopartículas fue de 138.5 nm y el valor promedio del potencial zeta fue de 0.2 mV ($n = 6$).

No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$; prueba *t* de Student) con respecto al tamaño correspondiente al NTS-poliplex recién preparado en PF25 (Figuras 25 y 34). Sin embargo, el Índice de Polidispersión (Pdl) para las muestras recién preparadas fue de 0.59 y para las reconstituidas de 0.47. Se encontró diferencia significativa entre ambos grupos ($P < 0.05$; *t* de Student's), lo que sugiere una población más homogénea y por tanto, una mayor estabilidad

de las nanopartículas de NTS-poliplex reconstituido, lo cual correlaciona con los resultados de TEM y citometría de flujo.

En cuanto al potencial zeta, se encontró diferencia significativa en comparación con las muestras de NTS-poliplex recién preparado ($P < 0.05$; t de *Student's*). El descenso (cercano a cero) en el potencial zeta de las muestras reconstituidas puede atribuirse a la ausencia de componentes libres (sin ensamblar) y por tanto, a una mayor interacción de los mismos y la consecuente neutralización de cargas.

Estos resultados indican que PF25, en conjunto con el proceso de liofilización desarrollado confieren protección a las nanopartículas de NTS-poliplex favoreciendo además la homogeneidad en el tamaño de partícula.

6.12. La estructura secundaria del NTS-poliplex en PF25 se conserva después de la liofilización

Para determinar posibles cambios en la estructura secundaria del NTS-poliplex reconstituido debido al proceso de liofilización, se obtuvieron espectros de dicroísmo circular. Se compararon los patrones de bandeo de muestras de NTS-poliplex recién preparado y reconstituido (Figura 35).

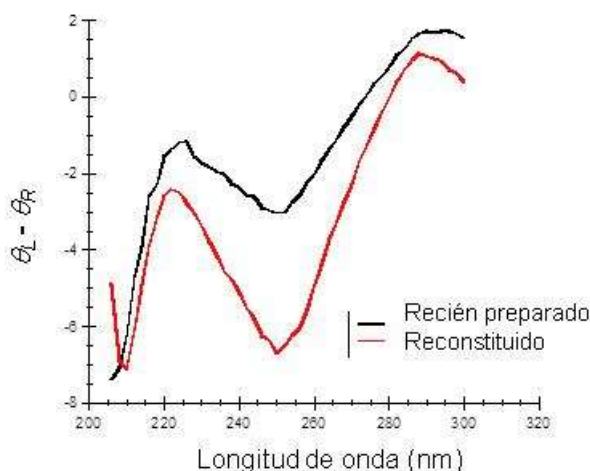


Figura 35. Análisis de DC (Dicroísmo Circular) de las nanopartículas de NTS-poliplex preparadas en PF25 y reconstituidas con agua inyectable de liofilizados de 2 días de anaquel

Los patrones de bandeo en ambos casos son comparables. Las bandas en 220, 250 y 290 nm se conservan después de la reconstitución de los liofilizados, lo que indica que la estructura secundaria de las nanopartículas no se ve alterada por el proceso de liofilización (Figura 35). La diferencia en la intensidad de miligrados en el espectro de los reconstituidos con respecto al correspondiente a las nanopartículas de preparación reciente podría deberse al cambio en los patrones de aglomeración que se evidenciaron en los análisis de TEM, DDL y potencial zeta.

6.13. Efecto de la interacción con SFB sobre la forma física de las nanopartículas de NTS-poliplex reconstituidas

Una vez que se confirmó que las nanopartículas de NTS-poliplex preparado en PF25 conservan sus características físicas y biológicas después del proceso de liofilización, el siguiente objetivo fue determinar la estabilidad de los reconstituidos de NTS-poliplex a diferentes tiempos de interacción con Suero Fetal Bovino (SFB). Esto se hizo con el fin de obtener algún parámetro de comparación preliminar de comportamiento de las nanopartículas reconstituidas tras la administración sistémica, ya que el suero en general contiene una vasta cantidad de proteínas que contienen cargas que pudieran alterar la estructura del NTS-poliplex. Se prepararon 5 muestras de NTS-poliplex de acuerdo con la tabla 11 y se analizaron por TEM. En la figura 36 se muestran las micrográficas correspondientes a cada muestra.

Tabla 11. Muestras y condiciones para la prueba de integridad en suero fetal bovino

NÚMERO / IDENTIFICACIÓN	CONCENTRACIÓN	CONDICIÓN
1. Plx 01	1 X	Sin suero (control) (0 minutos)
2. Plx 02	5 X	Sin suero (control) (0 minutos)
3. Plx 03	5 X	Suero (5 minutos)
4. Plx 04	5 X	Suero (30 minutos)
5. Plx 05	5 X	Suero (60 minutos)

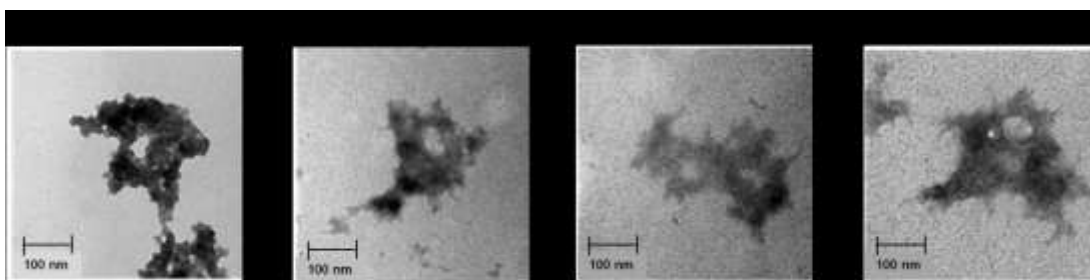


Figura 36. Micrografías representativas del NTS-poliplex reconstituido a diferentes tiempos de interacción con Suero Fetal Bovino (SFB)

Las micrografías muestran que las nanopartículas reconstituidas de NTS-poliplex conservan su integridad física. No se observa la formación de agregados grandes aún después de 60 minutos de interacción con SFB.

6.14. Efecto de la interacción con suero humano sobre la integridad de las nanopartículas de NTS-poliplex reconstituidas

Para confirmar la integridad del NTS-poliplex para uso clínico tras 15 minutos de interacción con suero humano, se utilizó radioSEC-HPLC. Se obtuvieron los cromatogramas para el plásmido pEGFP-N1, para el péptido cariofílico radiomarcado ($^{99m}\text{Tc-KP}$), el complejo pEGFP-N1/ $^{99m}\text{Tc-KP}$ y para las nanopartículas radiomarcadas de NTS-poliplex registrando la absorbancia y la radioactividad en serie (Figura 37A-D).

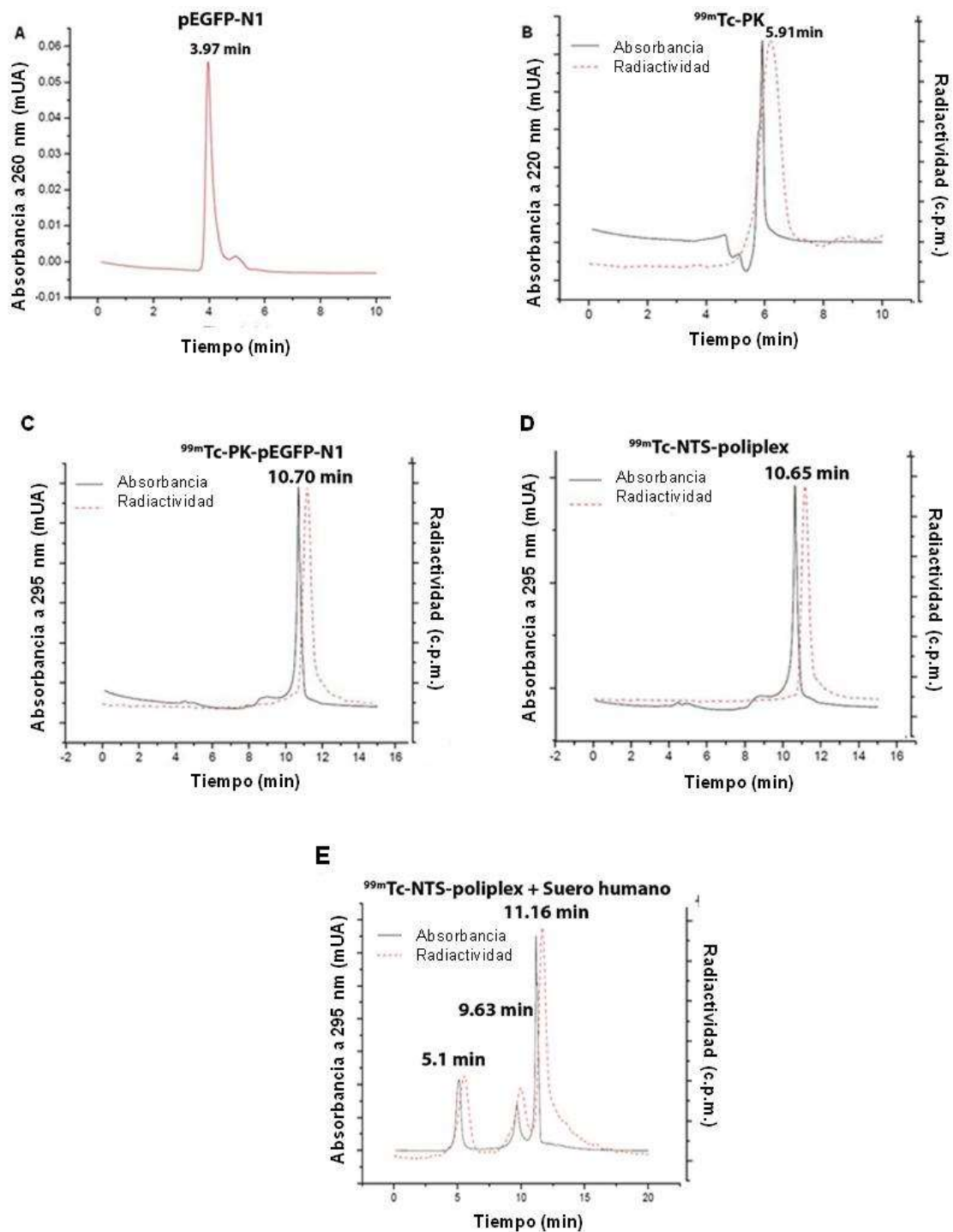


Figura 37. Cromatogramas de radioSEC-HPLC del NTS-poliplex, sus componentes y de las nanopartículas en presencia de suero humano. A) pDNA (pEGFP-N1); B) Peptido cariofílico ^{99m}Tc-TAT-RGD; C) Complejo pDNA / ^{99m}Tc-TAT-RGD; D) ^{99m}Tc-NTS-poliplex; E) ^{99m}Tc-NTS-poliplex después de 15 min de interacción con suero humano. Flujo: 1 ml/min; Fase móvil: agua. Se utilizaron dos detectores en serie: el Waters Photodiode UV-Vis para la absorbancia y el detector de radiactividad gamma para HPLC (Nikyang). *mUA*: miliUnidades de Absorbancia; *c.p.m.*: cuentas por minuto

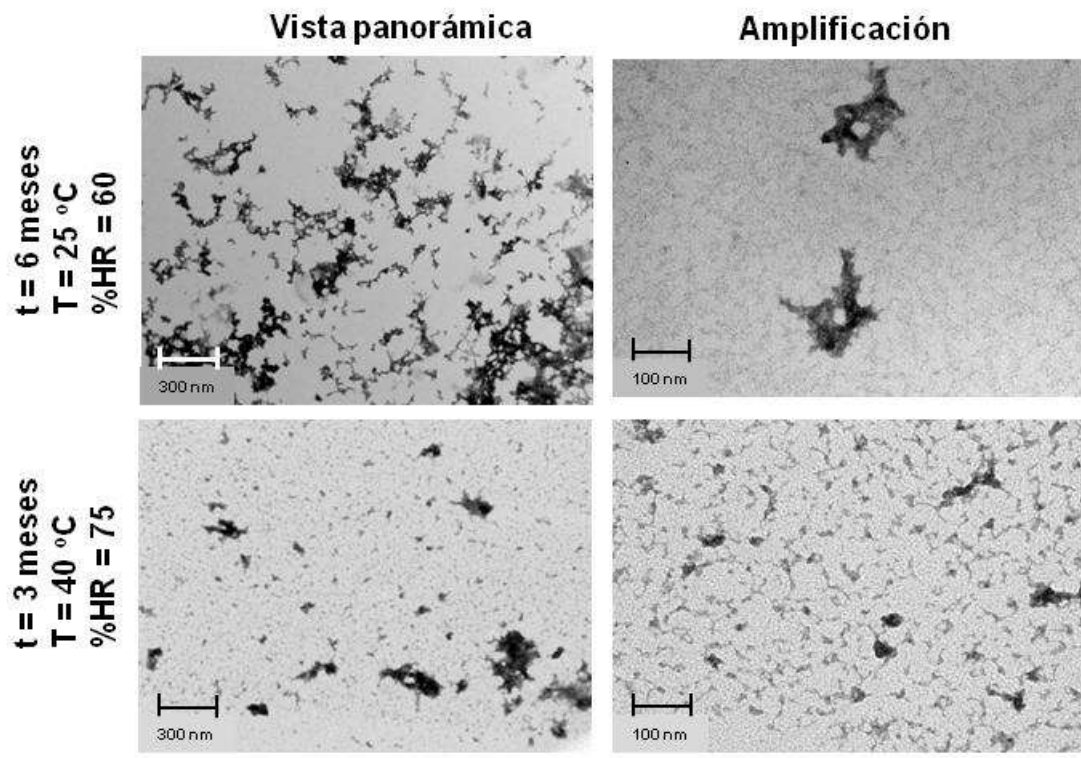
Se observa un ligero desplazamiento entre los picos de absorbancia y radiactividad debido al tiempo que tarda la muestra en llegar al segundo detector

(radiactividad). En los cromatogramas del péptido cariofílico radiomarcado y los complejos puede apreciarse la coincidencia de los picos de absorbancia y radiactividad, lo que confirma la interacción del péptido cariofílico radiomarcado con el pDNA y el acarreador de neurotensina.

Una vez caracterizados los tiempos de retención del NTS-poliplex, el complejo pDNA-PK y los componentes, se realizaron las corridas de radioSEC-HPLC de las nanopartículas después de 15 min de interacción con suero humano. El cromatograma revela que hay una población de nanopartículas de NTS-poliplex que permanece intacta. Sin embargo, hay otras dos poblaciones de pesos moleculares más altos que podrían representar complejos de nanopartículas con proteínas séricas (Figura 37E).

6.15. Pruebas de estabilidad acelerada y a largo plazo de los liofilizados de nanopartículas de NTS-poliplex en PF25

Confirmada la estabilidad de las nanopartículas de NTS-poliplex en suero, el siguiente objetivo consistió en determinar la estabilidad de los liofilizados de NTS-poliplex en PF25 a diferentes tiempos (3 y 6 meses) de condiciones de temperatura y humedad relativa (25 °C y 60% ó 40 °C y 75% respectivamente) para así establecer el tiempo de vida de anaquel. Para ello, se analizó la integridad física y biológica de los liofilizados utilizando TEM (Figura 38A) y ensayos de transfección con citometría de flujo (Figura 38B).



B

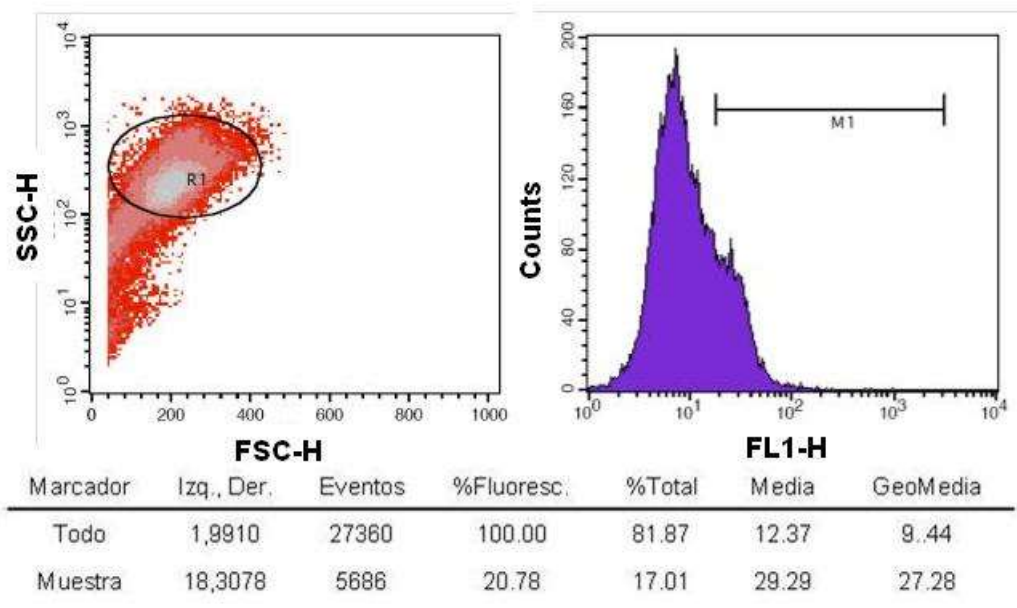


Figura 38. Estabilidad acelerada y a largo plazo de los liofilizados de NTS-poliplex. A) Micrografías representativas de microscopía electrónica de transmisión de muestras de NTS-poliplex almacenadas bajo diferentes condiciones; *HR*: Humedad relativa. B) Histogramas representativos de citometría de flujo de los ensayos de transfección in vitro usando muestras de NTS-poliplex correspondientes a 6 meses de almacenamiento a 25 °C y 60% de HR

El análisis de TEM (Figura 38A) muestra restos de NTS-poliplex en las muestras que se almacenaron tres meses a 40 °C y 75% de HR, sugiriendo la

degradación de las nanopartículas. Esta idea puede respaldarse por los resultados en los ensayos de transfección, donde no se detectó transfección bajo estas condiciones (datos no mostrados). Sin embargo, después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C y 60% HR, el NTS-poliplex fue capaz de transfectar células N1E-115 a una eficiencia de $20 \pm 5.1\%$ ($n = 6$). La eficiencia de transfección disminuyó aproximadamente 10% (Figura 38B) en comparación con la eficiencia de transfección del NTS-poliplex recién preparado y muestras recién liofilizadas (ver Figura 32B).

Estos hallazgos confirman que, gracias a PF25 y al proceso de liofilización, el NTS-poliplex cuenta con una vida considerable de anaquel bajo condiciones que no exigen sistemas complejos y costosos de almacenamiento.

6.16. Biodistribución de las nanopartículas reconstituidas de NTS-poliplex

Uno de los mayores desafíos del presente trabajo fue demostrar que después de una administración intravenosa la formulación permite que las nanopartículas de NTS-Polyplex sólo sean endocitadas de manera selectiva en los órganos que tienen el receptor a neurotensina.

En conjunto con el Instituto de Investigaciones Nucleares (ININ), en el laboratorio de diseño de radiofármacos, a cargo de la Dra. Guillermina Ferro-Flores y con la participación de las Dras. Clara Leticia Santos y Blanca Ocampo, del mismo grupo y de la Dra. Dalia Vásquez, del área de Nanotecnología de Psicofarma, se diseñó y realizó un estudio piloto de biodistribución del NTS-poliplex utilizando un péptido cariofilico radiomarcado con ^{99m}Tc para la formación de las nanopartículas de NTS-poliplex. Las partículas con este péptido se administraron por vía intravenosa a ratones Balb/c y se estudio su biodistribución en cuatro tiempos diferentes (0.5, 1, 6 y 24 h; $n = 3$ por tiempo). Se sacrificó cada grupo a los tiempos correspondientes. Se extrajo sangre, corazón, pulmón, hígado, bazo, riñones, estómago, intestino grueso y delgado y cerebro de cada individuo (Figura 39).

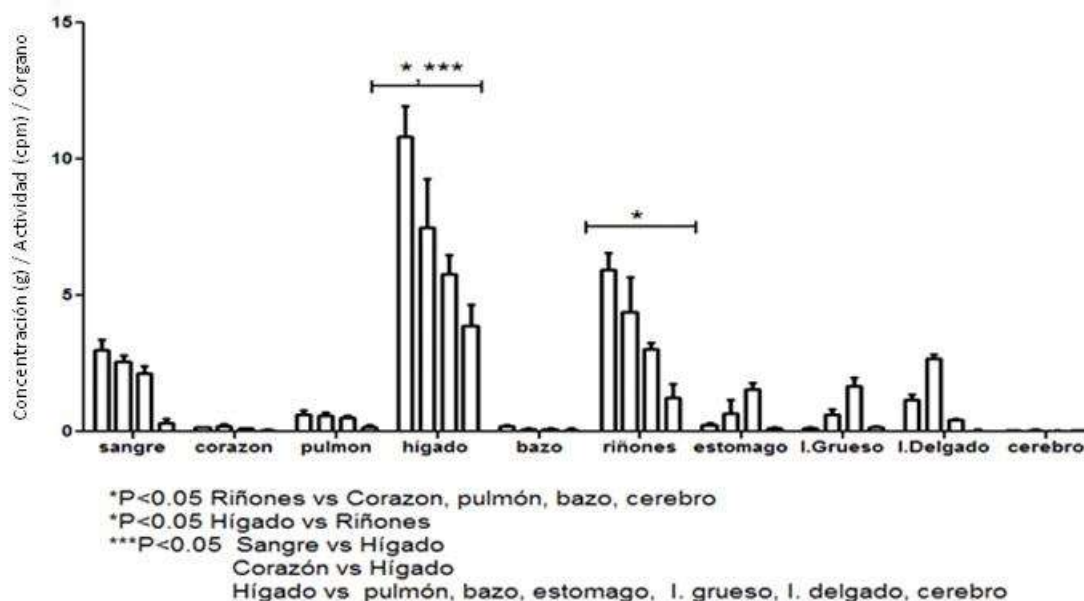


Figura 39. Estudio de biodistribución de las nanopartículas de NTS-poliplex conteniendo el ^{99m}Tc -KP a las 0.5, 1, 6 y 24 horas (barras en orden respectivo para cada órgano). La concentración está expresada en g (gramos) y la actividad en cpm (cuentas por minuto).

Estos resultados indican que la radiactividad presente en las muestras es suficiente para ser detectada y dar seguimiento a las nanopartículas de NTS-poliplex en el organismo hasta 24 h post-administración (hasta que prácticamente decae toda la radiactividad del isótopo). Asimismo, se confirma que:

- Las nanopartículas de NTS-poliplex no atraviesan barrera hematoencefálica.
- Hay presencia de nanopartículas de NTS-poliplex en el tracto gastrointestinal. Esto concuerda con la presencia del NTSR1 reportada en estos órganos, aunque en baja densidad¹³.
- A las 24 horas prácticamente desaparecen las nanopartículas de NTS-poliplex (a confirmar con modelo).
- Hay una alta densidad de nanopartículas de NTS-poliplex en hígado y riñones. Esto se atribuye a que estos órganos cuentan con células del sistema fagocítico mononuclear; y en el organismo, son los que juegan un papel primordial en la depuración, por lo que la radioactividad en ellos decrece en función del tiempo.

6.17. Evaluación de la toxicidad de las nanopartículas de NTS-poliplex formuladas en PF25

Ya que se observó la mayor concentración de nanopartículas de NTS-poliplex se detectó en el hígado y los riñones en comparación con los otros órganos estudiados, se procedió a realizar estudios para determinar la toxicidad que pudieran generar el vehículo y/o el NTS-poliplex en estos órganos.

Para esto, se fabricaron lotes de NTS-poliplex liofilizado (30 nM de pDNA; 25 M de PK y 720 nM), los cuales, en colaboración con la Dra. Dalia Vásquez y el grupo del Dr. Daniel Martínez Fong, fueron administrados vía el seno venoso retro-oftálmico a ratones Balb/c durante 10 días seguidos, y se evaluó la toxicidad una vez terminado el tratamiento y 20 días después de la aplicación de la primera dosis. Se incluyeron dos grupos control (negativo): uno al cual se aplicó el mismo esquema de administración con vehículo, y otro con solución salina. Asimismo, se generaron dos grupos modelo para el control positivo de daño hepático y renal administrando tetracloruro de carbono (CCl₄) y cisplatino (CIS) respectivamente. Se obtuvieron muestras donde se analizaron diferentes pruebas bioquímicas de daño hepático o renal (Figura 40).

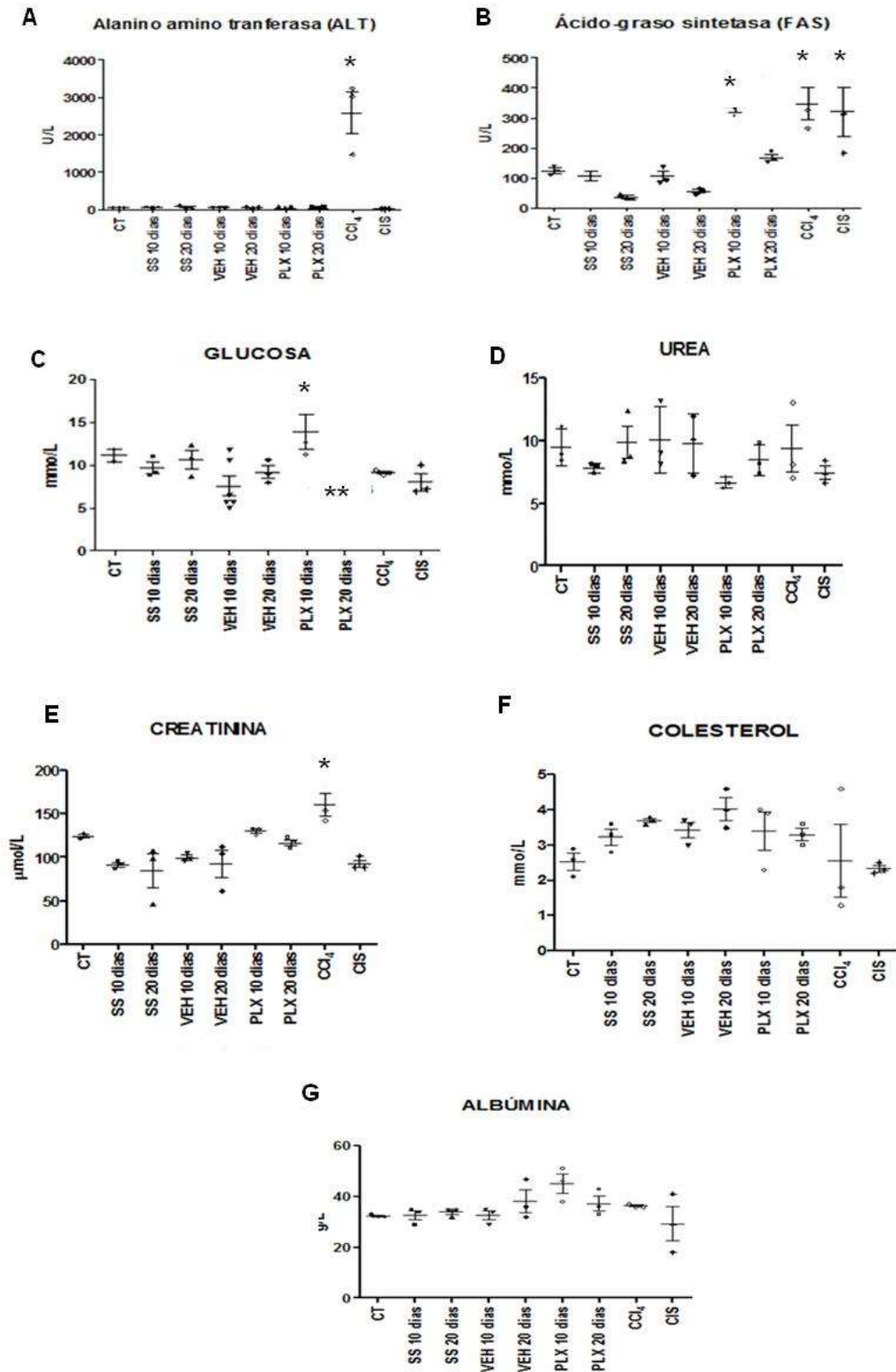


Figura 40. Marcadores de toxicidad hepática y renal en ratones Balb/C inyectados intravenosamente con nanopartículas de NTS-poliplex en su forma clínica. A) Alanino amino transferasa; B) Ácido graso sintetasa; C) Glucosa; D) Urea; E) Creatinina; F) Colesterol; G) Albúmina. * $P < 0.05$ en comparación con el control CT (animal sin tratamiento); ** $P < 0.05$ con NTS-poliplex 10 días. ANOVA; *t* de Student

En el caso del marcador de daño hepático ALT (alanina transaminasa), no se presentan alteraciones en los grupos administrados con PF25 ni con las nanopartículas de NTS-poliplex (Figura 40A). Sin embargo, en los casos de FAS (ácido graso sintetasa) y glucosa, se observa una alteración a los 10 días de tratamiento con las nanopartículas de NTS-poliplex (Figura 40B y C); no así a los 20 días (10 de recuperación), lo que indica que este daño es reversible en este intervalo de tiempo.

Los niveles de urea, creatinina, colesterol y albúmina no sufrieron alteraciones ni en el grupo al que se administró las nanopartículas de NTS-poliplex ni al que se administró únicamente PF25 (Figura 40D-G).

Por otro lado, por medio de un laboratorio tercero se realizaron análisis histopatológicos de cortes de hígado y riñones del grupo de 10 días post-administración (Figura 41).

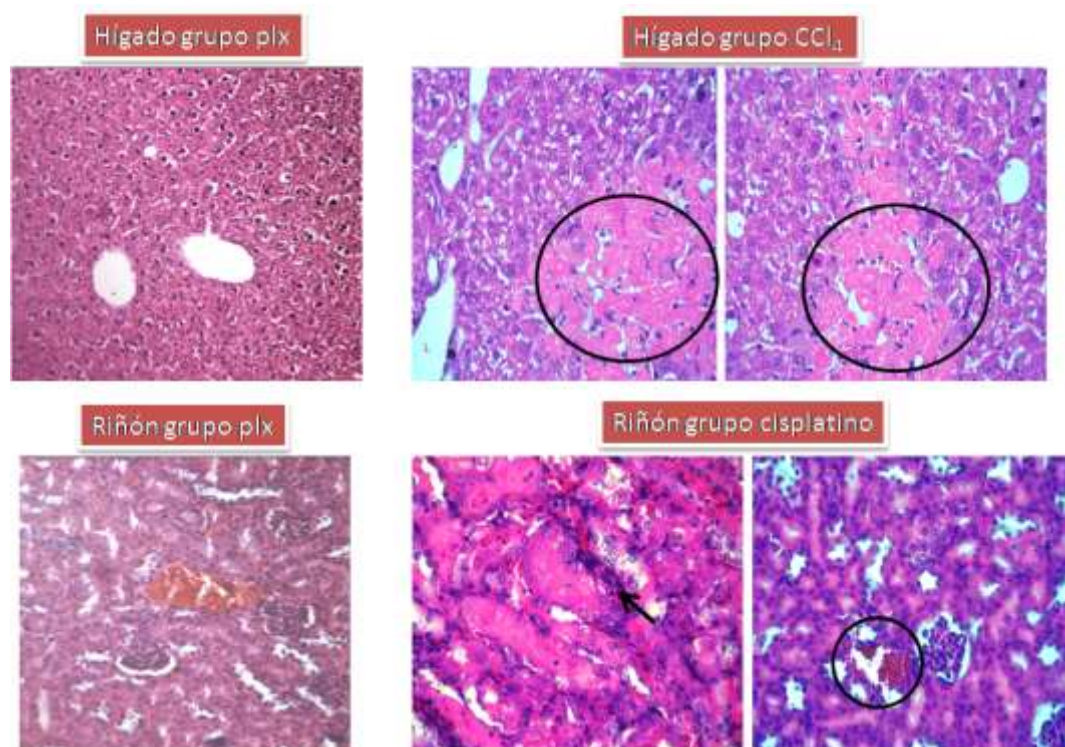


Figura 41. Micrografías representativas de estudios histopatológicos de hígado y riñón tras la administración de las nanopartículas de NTS-poliplex resuspendido en PF25. Se utilizó el CCl₄ y el cisplatino como controles positivos. *p/x*: nanopartículas de NTS-poliplex. Los círculos y la flecha indican alteraciones de la citoarquitectura

Estos resultados sugieren en términos generales que la forma farmacéutica desarrollada no es tóxica y que las nanopartículas de NTS-poliplex en la misma tampoco lo es. Los escasos parámetros que se alteraron al término del tratamiento se restablecieron después de 10 días de recuperación en el grupo de NTS-poliplex, por lo que el poco daño que pudiera generarse es reversible. Esto se confirma con los estudios de histopatología, en donde no se detectan alteraciones en los tejidos de hígado y riñones después de 10 días de recuperación (Figura 41).

6.18. Depuración de las nanopartículas de NTS-poliplex

Para determinar si la presencia de las nanopartículas de NTS-poliplex en riñones (Figura 39) conlleva a su eliminación a través de la orina, y si éstas se eliminan de manera íntegra, se diseñó y realizó un ensayo en ratones Balb/c en el laboratorio de radiofármacos del ININ, en colaboración con el grupo de la Dra. Guillermina Ferro. A estos ratones se les administraron las nanopartículas de NTS-poliplex al cual se integró el péptido radiomarcado con ^{99m}Tc . Se trabajaron 3 grupos ($n = 3$ ratones por grupo) y, se obtuvieron muestras de orina directamente de la vejiga a los 5 min, 30 min y 60 min post-administración para determinar la presencia de radioactividad por SEC-HPLC (Figura 42).

En el caso del grupo que se sacrificó a los 5 min, no se encontró la presencia de nanopartículas de NTS-poliplex radioactivas u otras especies radiomarcadas en los cromatogramas. La presencia de las nanopartículas de NTS-poliplex radioactivo se detecta en orina a los 30 min post-administración (Figura 42A); se observa un tiempo de retención (en absorbancia y radiactividad) que corresponde al determinado previamente para el complejo (Figura 37D), y este resultado es comparable con el correspondiente a los 60 min post-administración (Figura 42B).

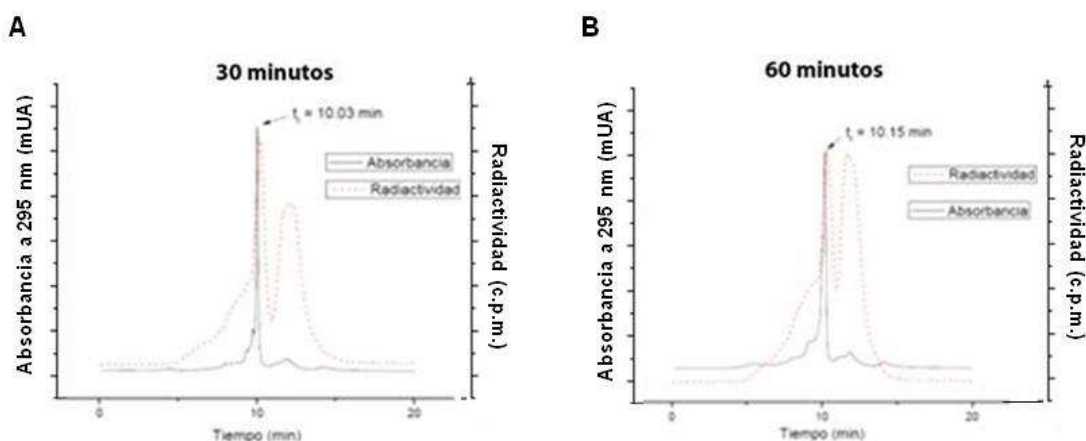


Figura 42. Cromatogramas de SEC-HPLC que muestran la presencia de las nanopartículas de NTS-poliplex en orina a los dos tiempos estudiados postadministración. A) 30 min; B) 60 min

Estos resultados sugieren que el NTS-poliplex, o al menos una parte del mismo, se elimina íntegro a través de la orina. Esto resulta muy favorable, ya que facilita el estudio de farmacocinética y se abate el riesgo de interacción/acumulación de los componentes en órganos periféricos, lo que podría aumentar la probabilidad de eventos adversos.

6.19. Desarrollo del proceso escalable de producción (realizado en las instalaciones del laboratorio de biotecnología de Psicofarma)

El conjunto de los resultados presentados son indicativos de que el prototipo de formulación tiene una alta viabilidad de ser un producto de uso clínico. Así, se procedió a diseñar una propuesta de proceso escalable y adaptable a BPF para la producción de las nanopartículas de NTS-poliplex, considerando también la rentabilidad del mismo.

El primer paso consistió en la elaboración de un diagrama de flujo, en el cual, se establecen las operaciones unitarias del proceso de producción de plásmido, del proceso de síntesis de acarreador y del ensamblaje de las nanopartículas de NTS-poliplex (Figura 43).

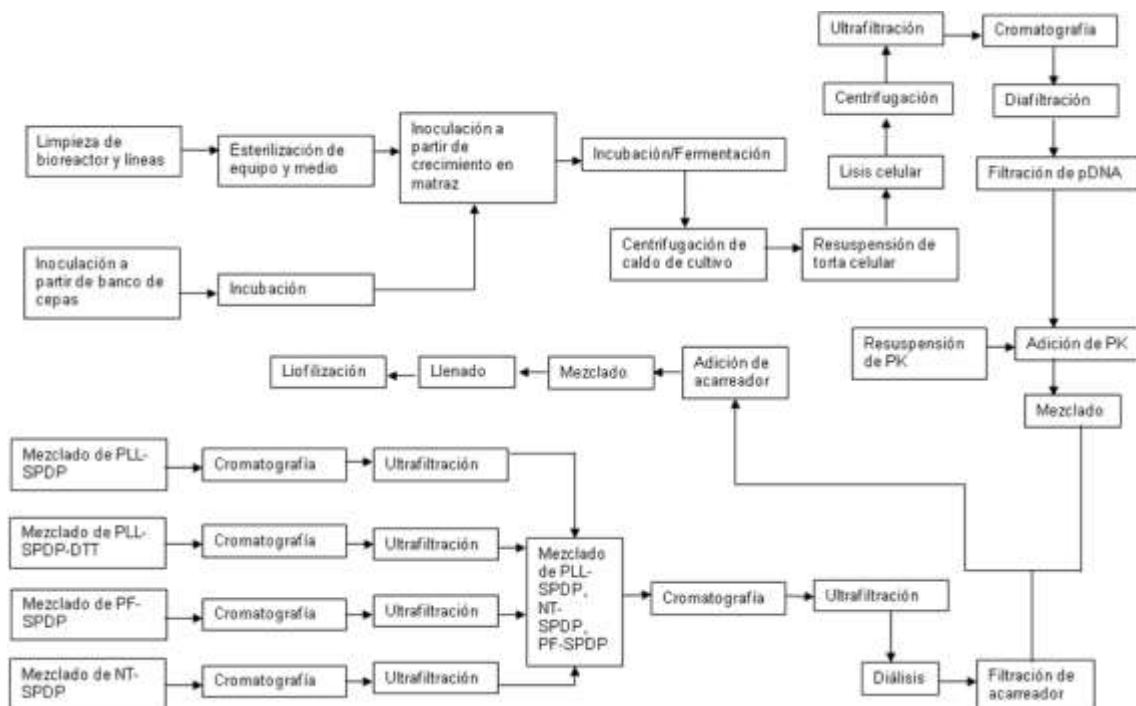


Figura 43. Diagrama de flujo de producción de NTS-poliplex.

A continuación, se detallarán de manera más específica cada uno de estos procesos.

6.20. Estandarización del proceso de obtención de pDNA

La obtención de pDNA es un proceso biotecnológico que implica el cultivo de la bacteria *E. coli*. De manera previa a las operaciones descritas para este proceso en el diagrama de flujo, una cepa de esta bacteria se transformó, es decir, internalizó el pDNA de interés. Una vez que se identificaron las colonias de bacterias que internalizaron el pDNA, se generó un banco maestro y un banco de trabajo, a partir de los cuales, se tomaron inóculos para la propagación de esta bacteria en un medio de cultivo apropiado y utilizando un biorreactor, con el fin de obtener una gran cantidad del pDNA de interés.

6.20.1. Determinación del medio de cultivo óptimo para la propagación de pDNA

Para esta fase se eligió el pDNA pEGF-N1 y el primer objetivo fue elegir un medio apropiado que aporte los nutrientes necesarios obtener una mayor cantidad de pDNA. Es por esto que se realizaron pruebas utilizando cuatro diferentes medios para la propagación: LB, TB, SOC y PDM¹²⁵. El medio LB es el más utilizado para la propagación de bacterias por su simplicidad y buen rendimiento; los medios TB y SOC son medios enriquecidos que generan una mayor cantidad de biomasa; y el medio PDM se ha utilizado para la obtención de un mayor rendimiento de pDNA por unidad de biomasa¹²⁶.

Se realizaron cinéticas de crecimiento en matraz de la cepa DH5 α de la bacteria *E. coli* transformada (proporcionada por el laboratorio del Dr. Martínez-Fong) en cada uno de los medios de cultivos mencionados (Figura 44). La transformación se realizó utilizando el pDNA pML1 (plásmido Maria Lindhal 1), donado también por el laboratorio del Dr. Martínez Fong. Este plásmido contiene el gen que codifica para hGDNF, y es el que se utilizaría para la producción del medicamento final.

Las fermentaciones se monitorearon tomando muestras a diferentes tiempos para la determinación de densidad óptica, biomasa; y concentración y rendimiento de pDNA (Figura 44). La determinación de densidad óptica se realizó utilizando un espectrofotómetro a 600 nm. La determinación de biomasa se realizó por peso seco en charolas de aluminio, secando las muestras toda la noche a 100 °C. Se utilizó esta temperatura para asegurar la ausencia de humedad en las muestras y obtener así el peso seco de biomasa (Figura 44B). Para la determinación de la concentración de pDNA, éste se aisló de las diferentes muestras y se cuantificó por espectrofotometría a 260nm. Con esta concentración se estimó el rendimiento volumétrico, dado por la masa de pDNA (g) por L de medio de cultivo (Figura 44C). Asimismo, se estimó el rendimiento específico ($\mu\text{g pDNA} / \text{mg de célula}$) con base en el peso seco de la biomasa con respecto al tiempo (Figura 44D) y con base en los μg de pDNA obtenidos por mL (densidad óptica 600 nm) (Figura 44 E). Las cinéticas de densidad óptica y biomasa, en correlación con las correspondientes a los rendimientos volumétrico y específico para las fermentaciones con cada medio de cultivo sugieren que el

medio PDM es el más adecuado para obtener un mayor rendimiento de pDNA por fermentación, lo que reduce costos de producción.

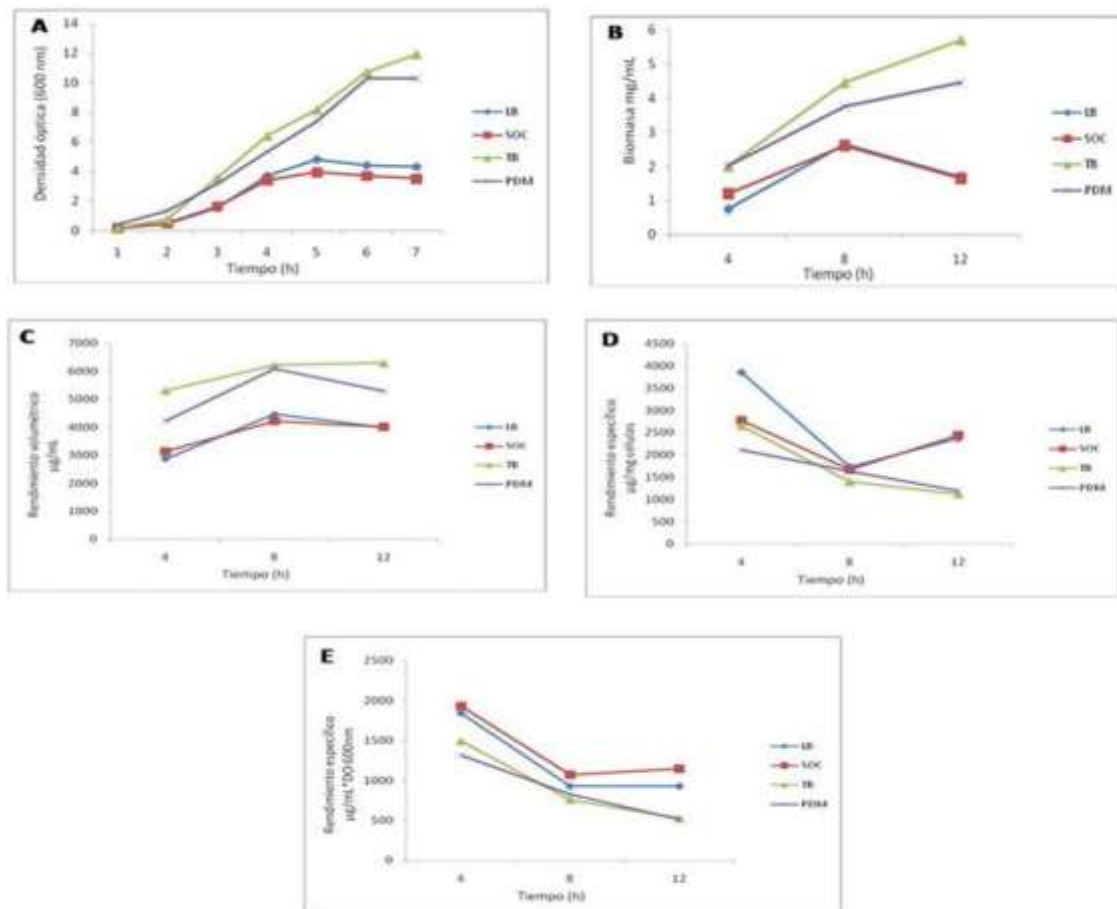


Figura 44. Determinación de biomasa y rendimiento específico de pDNA con diferentes medios de cultivo durante el crecimiento de *E. coli* transformada con el plásmido pML1. A) Cinética de 12 h de crecimiento; B) Biomasa (mg/mL) con respecto al tiempo; C) Rendimiento volumétrico de pDNA (µg/mL) con respecto al tiempo; D) Rendimiento específico µg pDNA / mg de célula con respecto al tiempo; E) Rendimiento específico µg pDNA / mL D.O. 600

Con el objetivo de analizar la integridad del pDNA purificado, se migraron 5 µL de cada muestra en geles de agarosa al 1% durante 45 min a 80 V. La figura 45 muestra la integridad del pDNA purificado mediante un kit comercial a escala laboratorio para los cuatro medios de cultivo empleados (por duplicado) y del control (pDNA previamente purificado y cuantificado, proporcionado por el laboratorio del Dr. Martínez-Fong). El tamaño esperado del pDNA pEGF-N1 es de 5.9 kpb. Las bandas cuya migración es mayor corresponden a formas súper-

enrolladas del pDNA; las bandas superiores corresponden a formas lineales o circulares. La relación A260/280 promedio fue de 1.79.

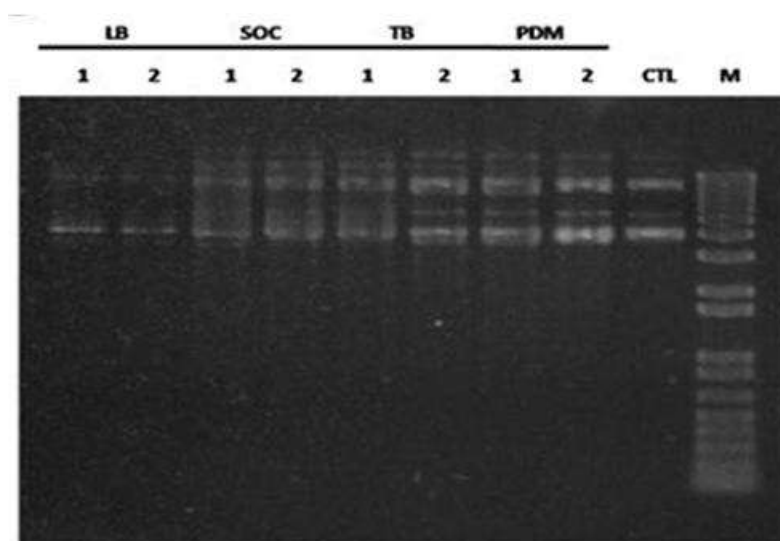


Figura 45. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos purificados a partir de los diferentes cultivos en los medios LB, SOC, TB, y PDM. 1 y 2: corrimiento de cada muestra de pDNA por duplicado. CTL = control positivo (pML1 donado por el Dr. Daniel Martínez Fong). M = marcadores de peso molecular de 1 kpb

Debido a que el medio PDM provee lo necesario para generar una mayor cantidad de biomasa y obtener una mayor productividad de plásmido íntegro, éste se utilizó en la siguiente etapa que consistió en la estandarización de las condiciones de fermentación en bioreactor de 5 L.

6.20.2. Estandarización de las condiciones de fermentación en biorreactor para la propagación de pDNA

Después de la selección de medio de cultivo óptimo para la propagación de pDNA, se estandarizó el proceso de fermentación en bioreactor de 5 L marca Sartorius. Para esto, se realizaron fermentaciones en lote y lote alimentado (en conjunto con la M. en C. Mirna Olivia González Martínez) para evaluar el comportamiento de la cepa y establecer el tipo de cultivo más conveniente. Una vez extraído el caldo de cultivo del fermentador se distribuyó en botellas para su

centrifugación, o bien, se concentró por microfiltración la biomasa. La Figura 46 presenta las cinéticas y rendimientos más representativos.

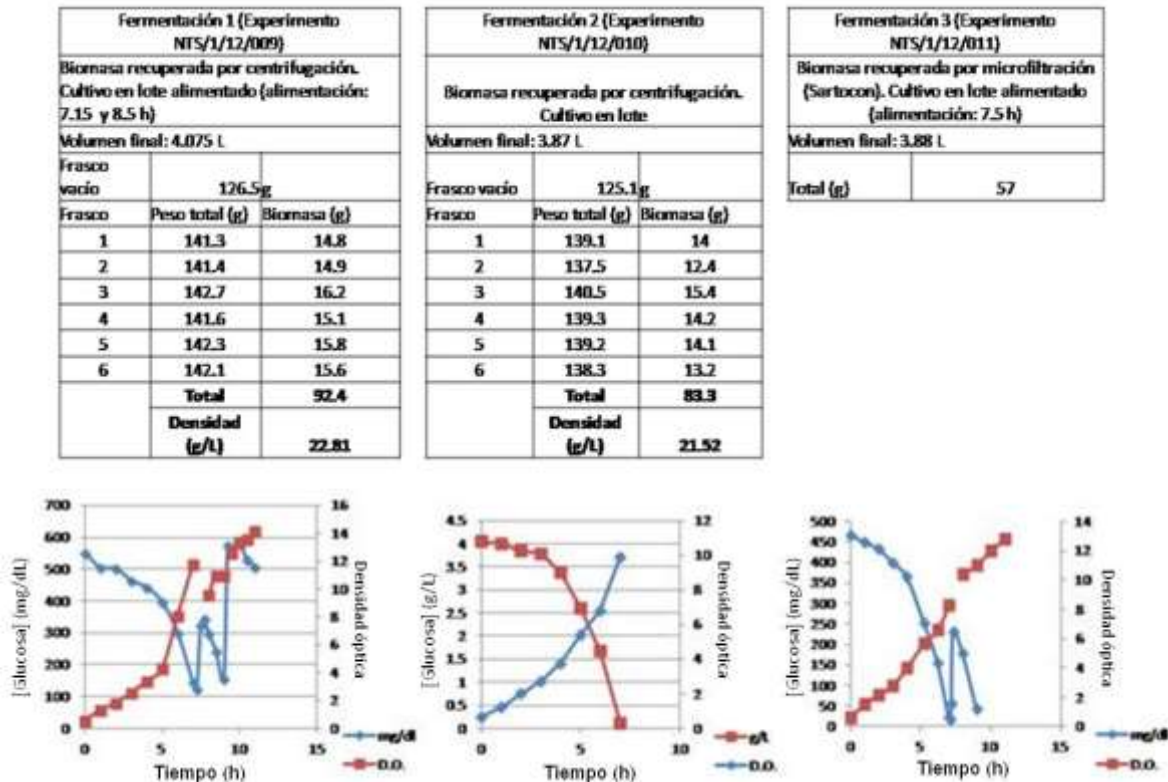


Figura 46. Cinéticas de fermentación en bioreactor de 5 L en lote y lote alimentado para la propagación de pDNA. *mg/dL; g/L*: concentración de glucosa (monitoreada por método enzimático); *D.O.*: densidad óptica a 600 nm

En las cinéticas de crecimiento puede observarse que el cultivo en lote es suficiente para la obtención de cantidades de biomasa comparables (en relación con el cultivo en lote alimentado) utilizando la centrifugación para concentrar la biomasa. En el caso de la recuperación por microfiltración se obtiene una menor cantidad de biomasa (87.85 g en promedio vs 57 g). Además, la cantidad de agua y tiempo para preparar y enjuagar el sistema es sumamente considerable, lo que hace poco rentable el proceso. Con base en esto, se estableció que el tipo de cultivo más conveniente de propagación de pDNA en fermentador de 5 L es en lote y la recuperación de biomasa por centrifugación es la más rentable. Asimismo, debido a los rendimientos de fermentación y purificación, no es necesario el escalamiento a fermentación de 30 L.

6.20.3. Estandarización del proceso de purificación de pDNA

Una vez estandarizada la cantidad de biomasa a obtener en el proceso de fermentación se procedió a estandarizar el proceso de purificación de pDNA (en conjunto con la IBQ. Julia Tejas Hernández), utilizando un equipo de FPLC (General Electric).

Los botones celulares se resuspendieron en un buffer alcalino y se adicionó posteriormente un volumen de solución de lisis, para concluir con la adición de una solución de neutralización (con pH ácido). Se centrifugó el producto y se realizó una ultrafiltración del sobrenadante antes de pasar por tres pasos de cromatografía; a saber: 1) intercambio iónico; 2) exclusión molecular; 3) fase reversa. La Figura 47 presenta los cromatogramas representativos para cada etapa.

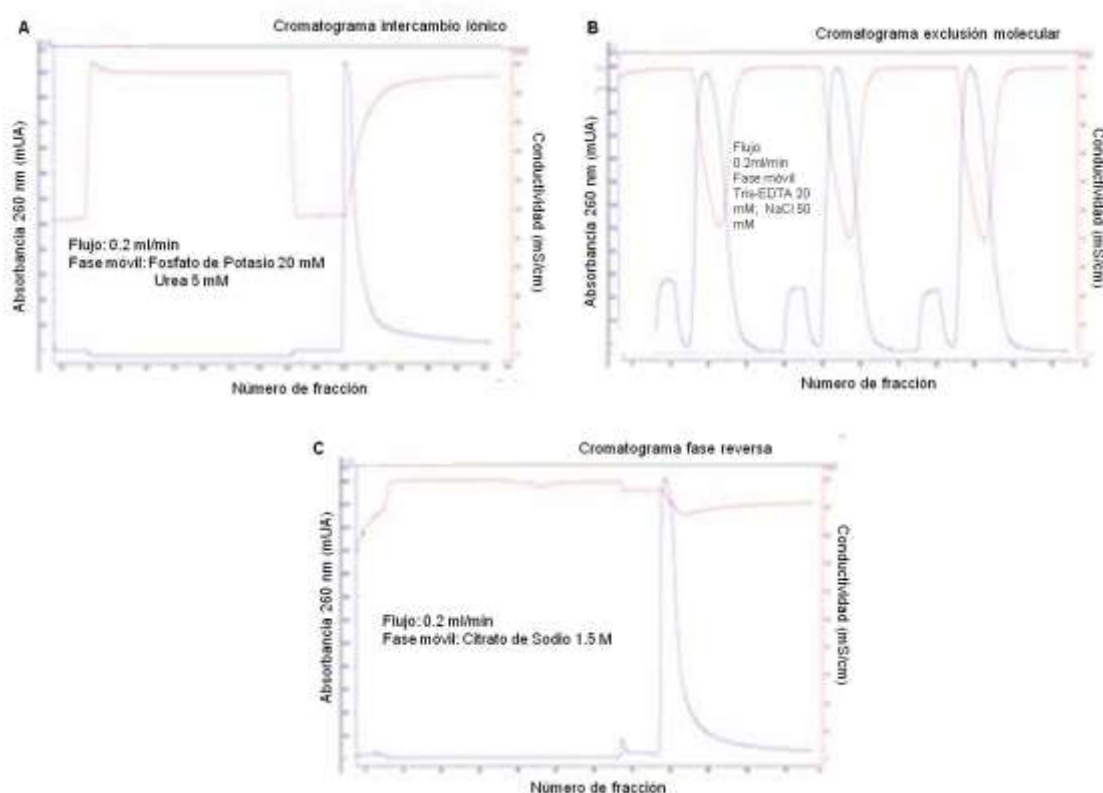


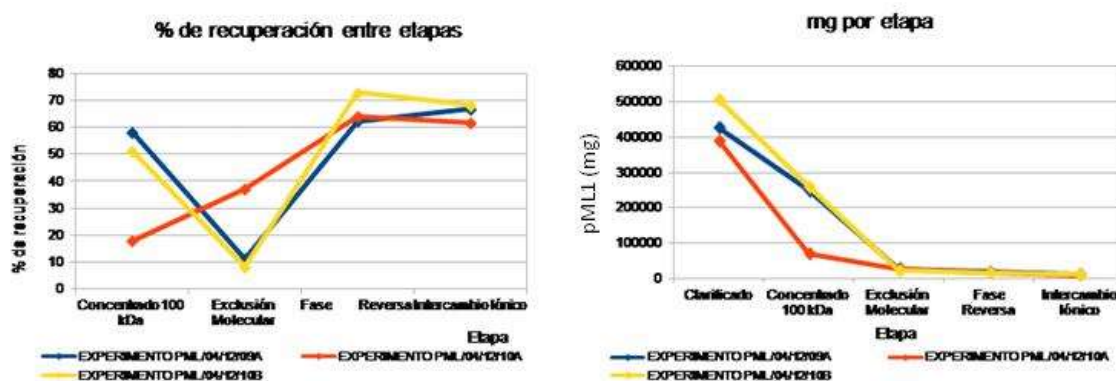
Figura 47. Proceso escalable de purificación de pDNA pML1. A) Cromatograma representativo de intercambio iónico; B) Cromatograma representativo de exclusión molecular; C) Cromatograma representativo de fase reversa. *mUA*: miliUnidades de Absorbancia; *mS/cm*: miliSiemens/cm

Se recolectaron las fracciones correspondientes al único pico arrojado por la cromatografía de intercambio iónico y se realizaron varias inyecciones en

la columna de exclusión molecular, en donde se recuperaron las fracciones correspondientes al pico de las moléculas más pesadas (pDNA), desechándose los picos correspondientes a los componentes más ligeros (RNA). Estas fracciones se inyectaron en la columna de fase reversa, donde se obtuvo el pDNA. Finalmente, se determinaron las cantidades promedio de pDNA (pML1) y los porcentajes de recuperación por etapa de purificación en tres lotes diferentes, partiendo de la misma masa de pasta celular (Tabla 12).

Tabla 12. Cantidades del pDNA pML1 y porcentajes de recuperación en las etapas intermedias y final.

PROMEDIO 3 LOTES				
Muestra	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)	µg totales	% recuperación entre etapas
Clarificado	890.43	495	441129.17	N/A
Concentrado 100 kDa	2712.2	72.67	938421.47	42.43
Exclusión Molecular	230.93	109	25199.3	18.92
Fase Reversa	270.87	61.33	16600	66.39
Intercambio iónico	291.17	38.33	10866.87	65.5
g de pasta	17			



Nota: el producto del experimento PML/04/12/10A proviene del lote que fue concentrado por microfiltración después de la fermentación

Figura 48. Cantidades y rendimientos obtenidos en el proceso de purificación de tres lotes de pML1

En la figura 48 se observa que la cantidad total de pDNA obtenido a partir de biomasa concentrada por microfiltración es menor que en el lote proveniente

de la concentración por centrifugación. Con base en esto y en la gráfica del porcentaje de recuperación entre etapas, se dedujo que durante la operación de microfiltración el esfuerzo de corte puede afectar la integridad del pDNA. Por otro lado, las cantidades y porcentajes de recuperación son reproducibles entre lotes (provenientes de cultivos centrifugados).

En resumen, se obtuvo lo siguiente:

- Un cultivo en lote en fermentador de 5 L arroja en promedio 87.85 g de biomasa (pasta celular).
- Del proceso de purificación se obtienen en promedio 655.75 $\mu\text{g/g}$ de pDNA, a partir de 17 g de pasta celular. Cabe mencionar que la pureza del pDNA se analizó por electroforesis en gel de agarosa y por espectrofotometría (así como la cuantificación) y fue satisfactoria en ambos casos (datos no mostrados).
- De un lote de fermentación pueden obtenerse hasta en promedio 55.74 mg de pDNA, el cual se utiliza en un rango de concentraciones de 6 a 30 nM, y los lotes de nanopartículas finales serían de en promedio 150 mL.

La cantidad obtenida de plásmido en cada lote rinde en promedio para aproximadamente 5 lotes de acarreador (con el rendimiento actual; ver apartado siguiente), obteniendo un total de 300 viales con 500 μL c/u (tratamiento de EP) ó 100 viales con 1.5 mL c/u (para tratamiento de cáncer) por lote de nanopartículas de NTS-poliplex (liofilizadas). Con base en estos rendimientos se concluye que no es necesario el escalamiento a fermentador de 30 L ni a columnas de mayor tamaño.

Las presentaciones para ambos tratamientos fueron calculadas con base en las dosis terapéuticas encontradas en modelos animales^{31; 60; 61} y en la “Guía para estimar la dosis inicial segura para terapéuticos en voluntarios adultos sanos” de la FDA¹²⁷. El ajuste se realizó tomando como base la cantidad de plásmido administrada y modificando el volumen administrado, no así la concentración de nanopartículas. El tamaño mencionado de lotes es suficiente para estudios clínicos y producción inicial.

6.21. Estandarización del proceso de síntesis de acarreador de Neurotensina

El siguiente paso consistió en desarrollar y estandarizar un proceso adaptable a BPF y escalable para la producción de acarreador de NTS, utilizando las mismas cantidades de reactivos que se utilizan a nivel laboratorio. Este es el primer paso para escalar el proceso a largo plazo, en función de los requerimientos de mercado y el valor agregado del producto.

La síntesis de acarreador comienza con el acoplamiento de la poli-L-lisina (PLL) con el agente entrecruzador succinimidil 3-(2-piridilditiopropionato) de cadena larga (LC-SPDP). Para esto, se disuelven 25 mg de PLL en 2 mL de solución PBS para columna (Na_2HPO_4 17.42 mM, KH_2PO_4 2.58 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaN_3 0.02%) y se mezclan con 7.5 mg de LC-SPDP disuelto en 30 L de Dimetil Sulfoóxido (DMSO) mediante agitación en vortex a 2750 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. Esta reacción genera un enlace covalente entre ambos reactivos formando un conjugado PLL-SPDP, el cual tiene un tamaño de 52.043 kDa (Figura 49) y es separado de la fracción correspondiente a N-Hidroxisuccinimida por cromatografía de exclusión molecular (Figura 52A). Las fracciones correspondientes al conjugado se concentran por centrifugación al vacío para obtener 1 mL. Para generar una especie altamente reactiva que pueda acoplarse con el péptido fusogénico y la neurotensina, se realiza una segunda reacción para la reducción de este conjugado, tal como se muestra en la Figura 49. Esta reacción se realiza mezclando el mL de PLL-SPDP con 24 mg de diotreitól (DTT) disueltos en PBS para columna, bajo las mismas condiciones de agitación descritas anteriormente.

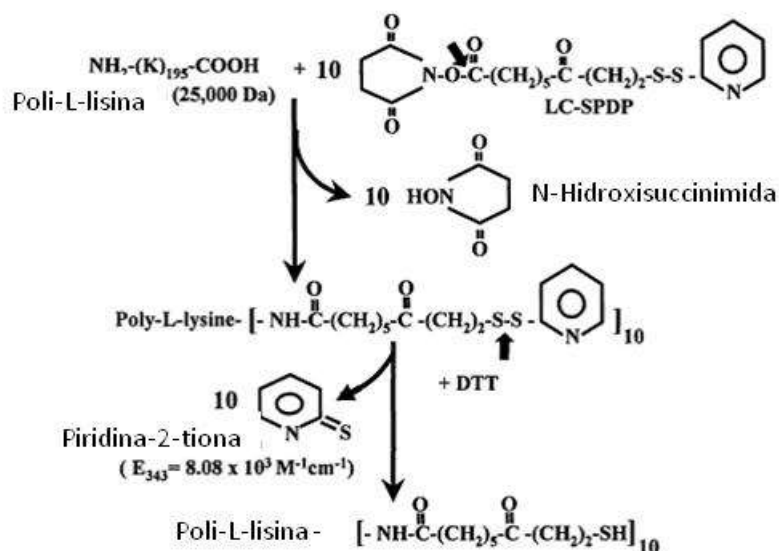


Figura 49. Reacción de conjugación de poli-L-lisina (PLL) y succinimidil 3-(2-piridilditiopropionato) de cadena larga (LC-SPDP), y generación del complejo altamente reactivo PLL-SPDP-SH mediante la reducción del conjugado PLL-SPDP⁸⁷.

El tamaño del complejo reducido PLL-SPDP-SH es de 50.613 kDa, el cual es purificado por cromatografía de exclusión molecular. Las fracciones correspondientes a este tamaño se recolectan, desechando las fracciones del pico correspondiente a la piridina-2-tiona (Figura 52B). Las fracciones del conjugado PLL-SPDP-SH se concentran por ultrafiltración hasta obtener 0.8 mL.

Posteriormente, se realizan las reacciones de acoplamiento del entrecruzador SPDP con el péptido fusogénico (PF) y la neurotensina (NT) respectivamente. En la figura 50 se ejemplifica el mecanismo de estas reacciones. El conjugado PF-SPDP se obtiene mezclando 8.1 mg de PF disueltos en 2 mL de PBS para columna con 2.5 mg de LC-SPDP disuelto en 30 L de DMSO, mediante las condiciones de agitación descritas. El conjugado NT-SPDP se obtiene mezclando 10 mg de NT disueltos en 2 mL de PBS para columna con 5 mg de LC-SPDP disueltos en 30 L de DMSO, aplicando las mismas condiciones de agitación. Los conjugados PF-SPDP y NT-SPDP se aíslan del subproducto H-Hidroxisuccinimida mediante cromatografía de exclusión molecular. El tamaño del conjugado PF-SPDP es de 3.317 kDa y el del conjugado NT-SPDP es de 2.419 kDa; mientras que el peso de la N-Hidroxisuccinimida es de 114 Da (Figuras 52C y 52D). Las fracciones

recolectadas de ambos complejos se concentran por ultrafiltración para obtener 0.6 mL de cada uno.

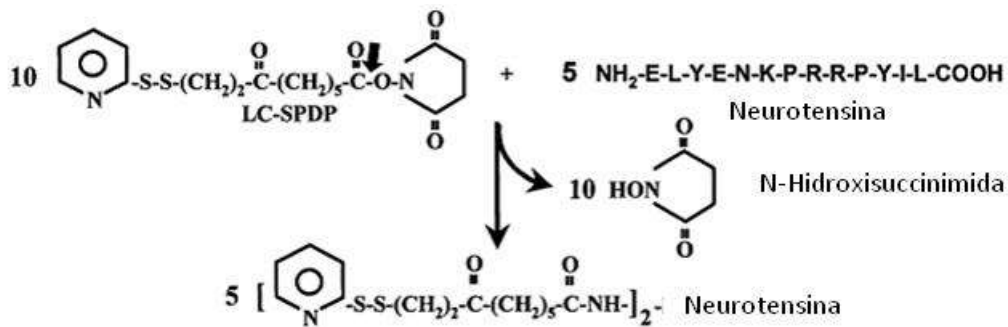


Figura 50. Reacción de acoplamiento del complejo succinimidil 3-(2-piridilditiopropionato) de cadena larga (LC-SPDP) con neurotensina (NT) (NT-SPDP), mediante la formación de un enlace covalente y la liberación de N-Hidroxisuccinimida⁸⁷.

Una vez generados y aislados los complejos PLL-SPDP-SH, PF-SPDP Y NT-SPDP, se realiza la reacción para generar el acarreador de neurotensina, mezclando estos tres conjugados (obteniendo un total de 2 mL de mezcla de reacción), bajo las condiciones de agitación descritas previamente. En la Figura 51 se ejemplifica el acoplamiento del complejo NT-SPDP con PLL-SPDP-SH. El mismo mecanismo ocurre entre el complejo PF-SPDP y PLL-SPDP-SH.

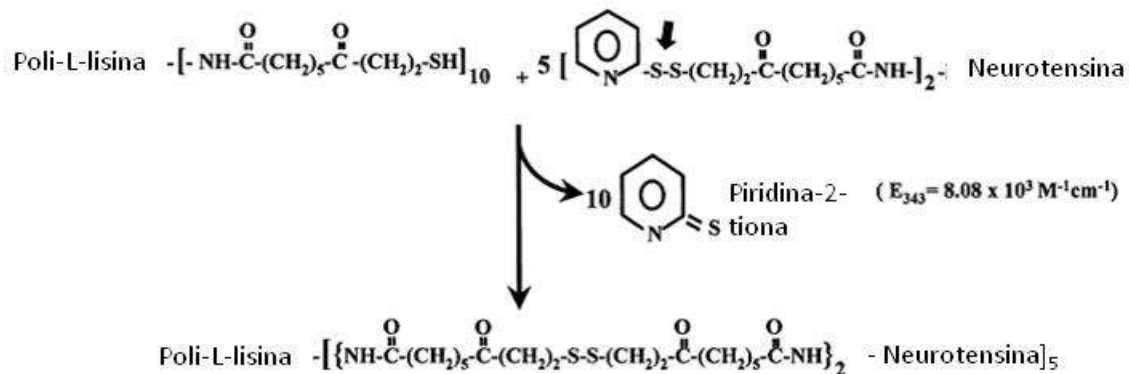


Figura 51. Reacción de acoplamiento del complejo NT-SPDP con el conjugado PLL-SPDP-SH mediante la formación de enlaces covalentes y la liberación de piridina-2-tiona⁸⁷.

El complejo PLL-PF-NT tiene un peso de 113.5 kDa, y es separado de la piridina-2-tiona mediante cromatografía de exclusión molecular (Figura 52E), previa corrida de una curva de calibración para identificar las fracciones correspondientes al complejo (Figura 52F). Posteriormente, este es concentrado por centrifugación al vacío hasta obtener 1 mL.

Estos procedimientos se realizan en el laboratorio del Dr. Martínez Fong mediante cromatografía por gravedad. Para fines de escalamiento y BPF, el proceso se desarrolló en el instrumento de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) Akta Purifier (LG), en el laboratorio del área de Biotecnología de Psicofarma, S.A. de C.V. Las gráficas presentadas corresponden a las obtenidas en este equipo, y las columnas de exclusión molecular correspondientes. Estas son comparables a las obtenidas de manera manual a partir de la cromatografía por gravedad^{65; 87}.

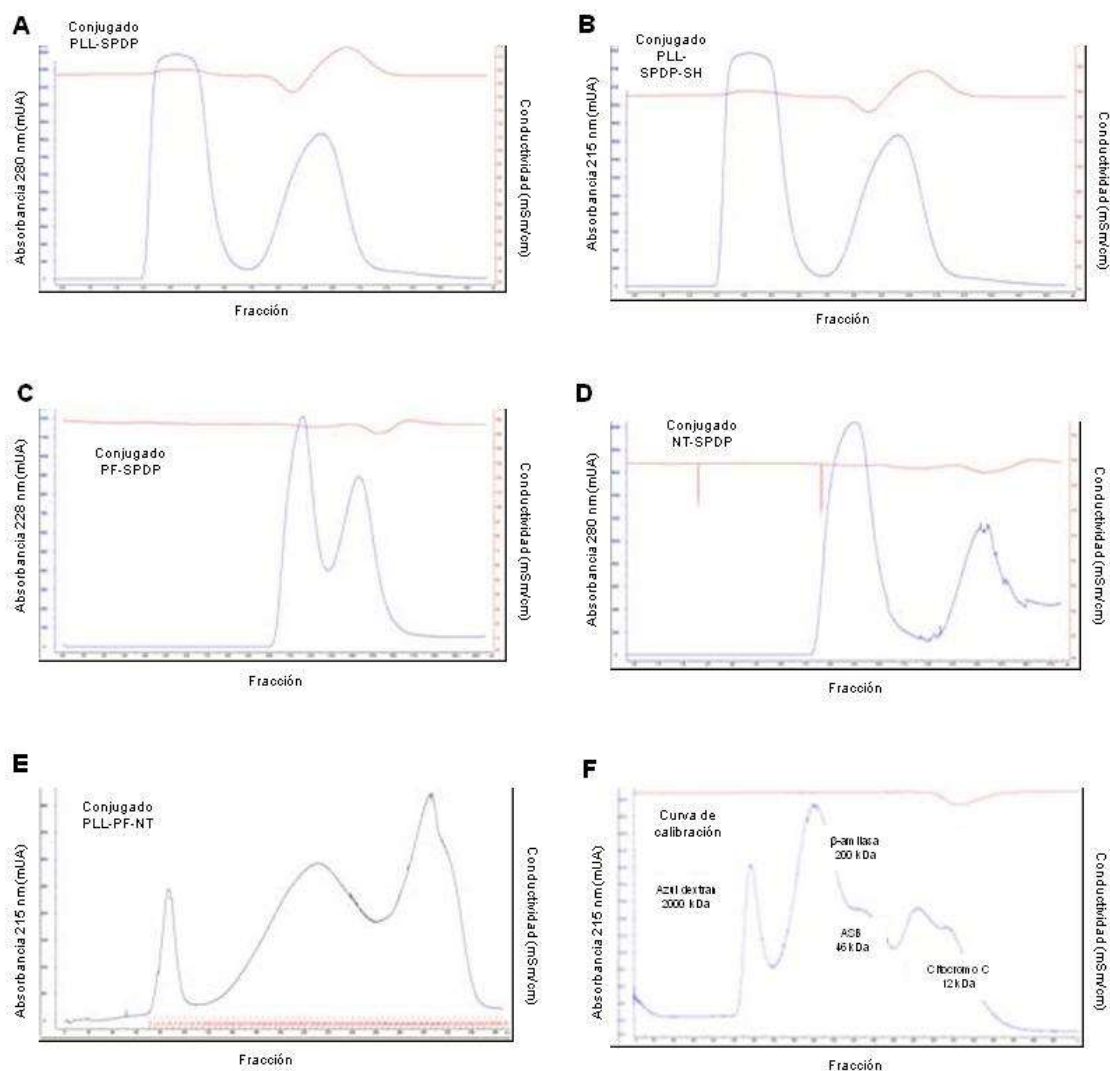


Figura 52. Cromatogramas representativos de la purificación de cada reacción de conjugación. A) PLL-SPDP; B) PLL-SPDP-SH; C) NTS-SPDP; D) PF-SPDP; E) NTS-SPDP/PF-SPDP/PLL-SPDP-SH; F) Curva de calibración (estándares de pesos moleculares para la purificación del conjugado final). Flujo (A, B, E y F): 1 mL/min; Flujo (C y D): 0.2 mL/min. Fase móvil: Na₂HPO₄ 17.42 mM, KH₂PO₄ 2.58 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1.0 mM, pH 7.2. Límite de exclusión de columna (A, B): 6 kDa; C: 1.5 kDa; D: 0.7 kDa; (E y F): 1500 kDa. ASB: Albúmina de Suero Bovino

El paso final de la producción de acarreador de neurotensina es la eliminación de guanidina, ya que la fase móvil empleada para su aislamiento la contiene en una concentración 2 M. La remoción de guanidina debe asegurarse para su uso clínico debido a que es un agente tóxico. A nivel laboratorio esto se realiza mediante diálisis por membrana inmersa en buffer de fosfatos. Con el fin de implementar la eliminación de guanidina de manera escalable y en cumplimiento con BPF, se realizaron pruebas empleando para ello FPLC de exclusión molecular, y como fase móvil la formulación PF25 (Figura 53). Se

utilizó un detector de longitud de onda variable, con el cual se determinó la absorbancia a 215 nm para visualizar las fracciones correspondientes al pico del acarreador de NTS (pico azul) y la conductividad para detectar la guanidina (pico rojo).

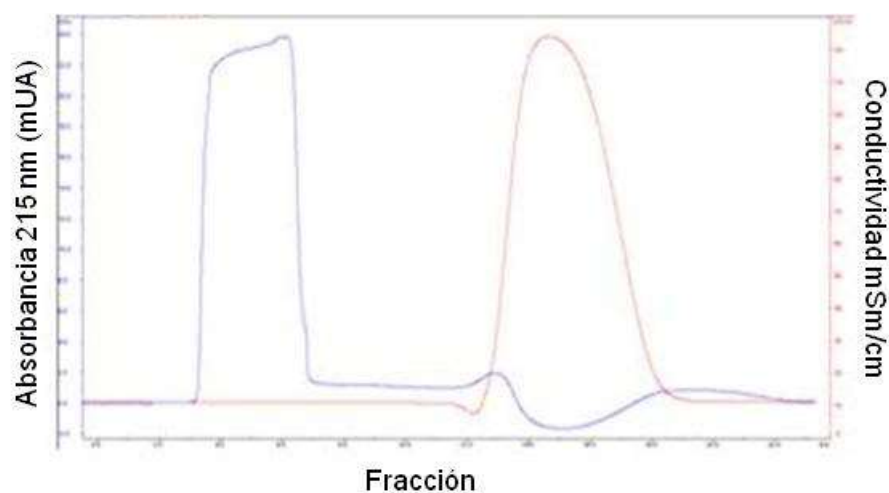


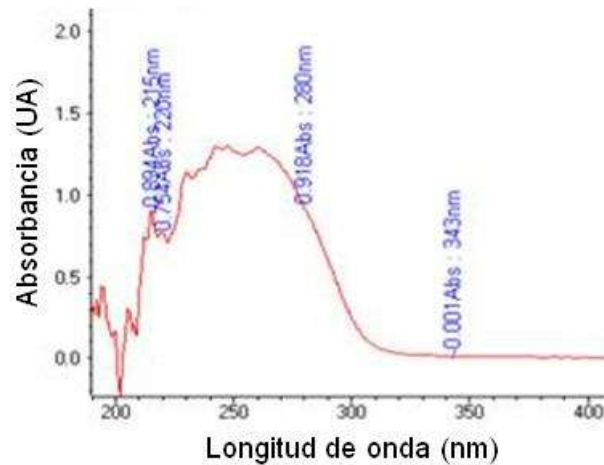
Figura 53. Cromatograma de la separación de guanidina del acarreador de neurotensina. Absorbancia a 215 nm: pico de acarreador de NTS (azul); Conductividad: pico de guanidina (rojo). Flujo: 1 mL/min; Fase móvil: PF25; Límite de exclusión de columna: 1500 kDa. *mUA*: miliUnidades de Absorbancia; *mSm/cm*: miliSiemens/cm

Se recolectaron las fracciones correspondientes al acarreador de NTS (pico azul). De este modo se eliminó en su totalidad la guanidina y el acarreador quedó suspendido en PF25.

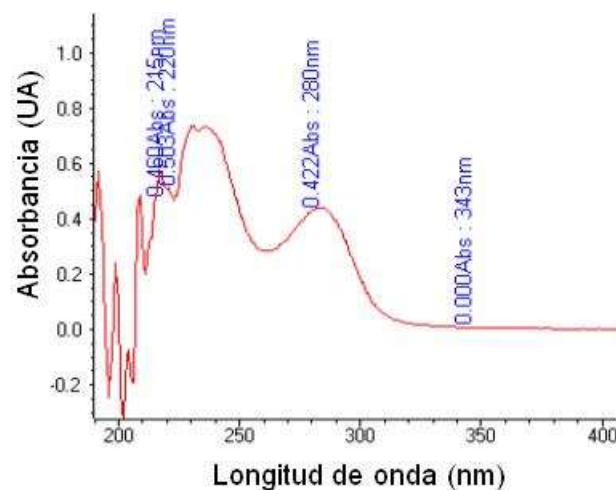
El siguiente paso consistió en cuantificar el acarreador obtenido mediante espectrofotometría a 215 nm. Su concentración final fue de 10,097 nM. Este rendimiento es bajo en comparación con el que se obtiene rutinariamente en el laboratorio del Dr. Daniel Martínez-Fong. Para mejorar el rendimiento, en las siguientes síntesis se determinaron las eficiencias de reacción de reducción de poli-L-lisina y del conjugado final, para descartar que la pérdida ocurra en el proceso de intercambio de buffer (se obtuvieron los perfiles cromatográficos esperados; no se muestran los cromatogramas). En estos casos, estas eficiencias fueron reproducibles, pero sumamente bajas, en los rangos de 20 a 40% respectivamente, cuando en el laboratorio del Dr. Martínez oscilan en los rangos de 70 a 80%, respectivamente. Para encontrar la causa de

esto se realizó una caracterización de cada reacción realizando barridos de muestras correspondientes a cada etapa, obteniéndose lo siguiente:

a) Barrido 1: se realizó la síntesis del conjugado PLL-SPDP, y previo a su purificación por cromatografía, se tomó una alícuota para realizar una dilución 1:50, y se hizo el barrido de absorbancias:



b) Barrido 2: el conjugado PLL-SPDP, se purificó mediante cromatografía (ver perfil cromatográfico anterior), colectándose el primer pico, mismo que se concentró a través de membrana de 10 kDa. Del concentrado se tomó una alícuota para, mediante una dilución 1:50, realizar un barrido de absorbancias:



En este barrido se observa la definición de un pico a 280 nm, que corresponde a la formación del conjugado PLL-SPDP.

Se realizó la síntesis y purificación del conjugado PLL-SPDP-SH, sin hacer variaciones respecto a experimentos anteriores, y se obtuvo el siguiente perfil cromatográfico:

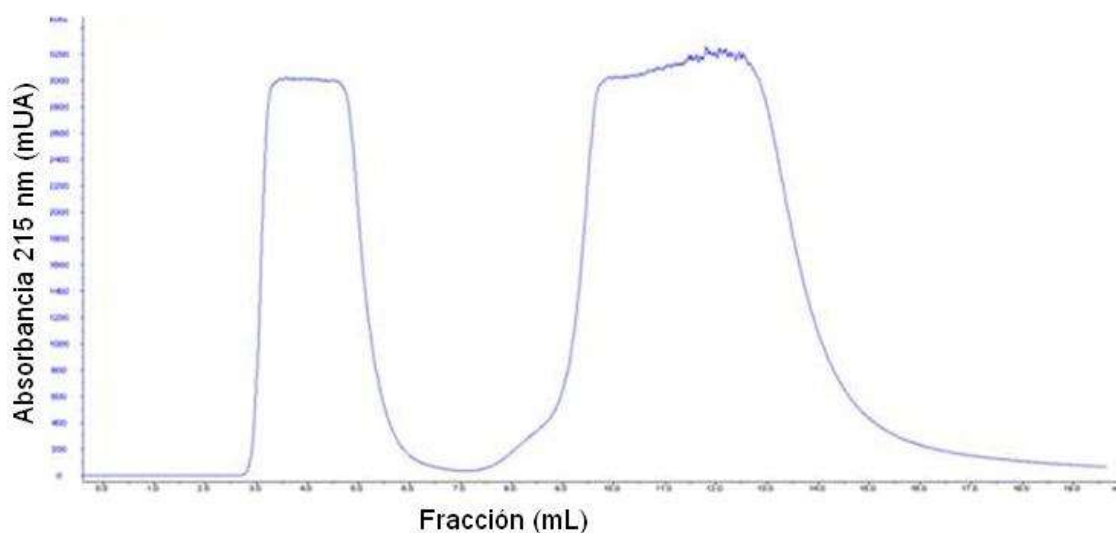
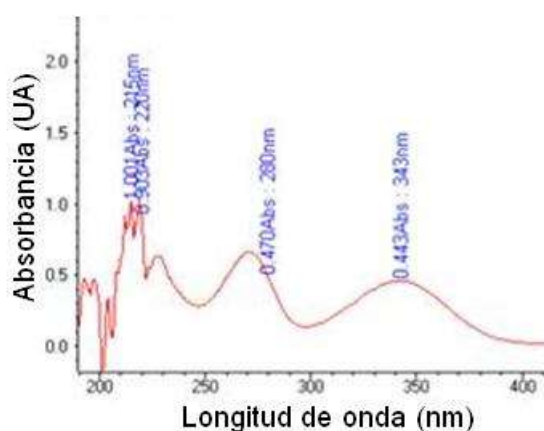


Figura 54. Cromatograma de la purificación del conjugado PLL-SPDP-SH (absorbancia a 215 nm). Pico 1: Conjugado PLL-SPDP-SH; Pico 2: piridina-2-tiona. Flujo: 1 mL/min; Fase móvil: Na_2HPO_4 17.42 mM, KH_2PO_4 2.58 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1.0 mM, pH 7.2. Límite de exclusión de columna: 6 kDa

Durante la formación y purificación de este conjugado, se realizaron los siguientes barridos:

c) Barrido 3: Se tomó una alícuota del complejo reducido (pico 1) de la Figura 54, previo a la purificación por cromatografía, y se realizó una dilución 1:50, para obtener el siguiente barrido:



Con la absorbancia a 343 nm obtenida en este barrido, se realizó el cálculo de la eficiencia de reacción:

Absorbancia de la alícuota 1: 0.4434; Factor de dilución (FD): 50

$$M = \frac{(A_{343})(FD)}{8080} = \frac{(0.4434)(50)}{8080} = \frac{22.17}{8080} = 0.002738$$

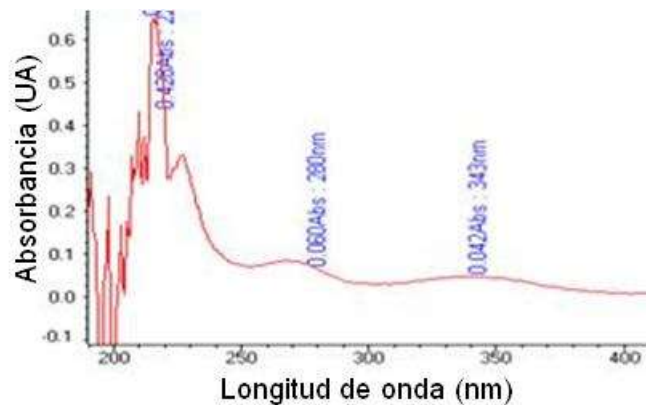
$$E.R. = \frac{(\text{Cálculo práctico})(100)}{\text{Cálculo teórico}} = \frac{(0.002738)(100)}{0.0088} = \frac{0.2738}{0.0088} = 31.11\%$$

M: Concentración molar de piridina-2-tiona (cálculo práctico)

E.R.: Eficiencia de reacción

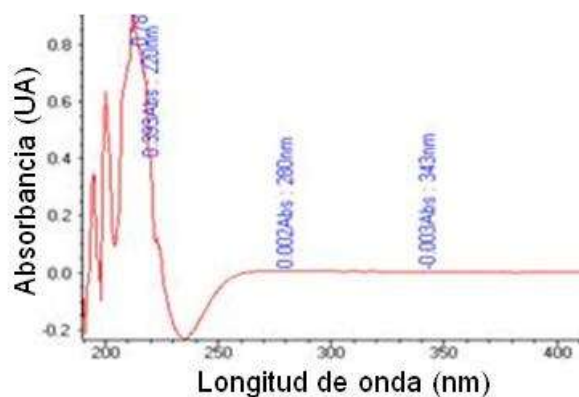
Nota: la piridina-2-tiona presenta una absorbancia máxima a 343 nm y su coeficiente de extinción molar es de 8080. El cálculo de eficiencia de reacción se basa en este subproducto de la reacción de reducción del complejo PLL-SPDP para generar PLL-SPDP-SH.

d) Barrido 4: Se tomó una alícuota del complejo reducido (PLL-SPDP-SH) purificado, haciendo una dilución 1:50, y se obtuvo el siguiente barrido:



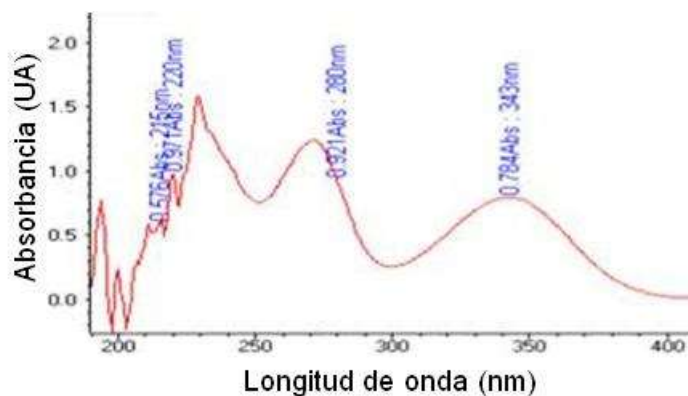
Con el fin de obtener barridos para cada componente y compararlos con los correspondientes a los complejos, se realizaron corridas de cada uno de ellos; los resultados se muestran a continuación:

e) Barrido 5: se hizo un barrido de una muestra reconstituida previamente de Polilisina, que, si bien no se encontraba a la misma concentración, pudo aportar información de los picos obtenidos (la solución utilizada tuvo una concentración de 0.48 mg/mL, mientras que la concentración de la Polilisina reconstituida para la síntesis, tuvo una concentración de 12 mg/mL). No se realizó dilución para esta lectura, el barrido obtenido para la solución de PLL 0.48 mg/mL fue el siguiente:

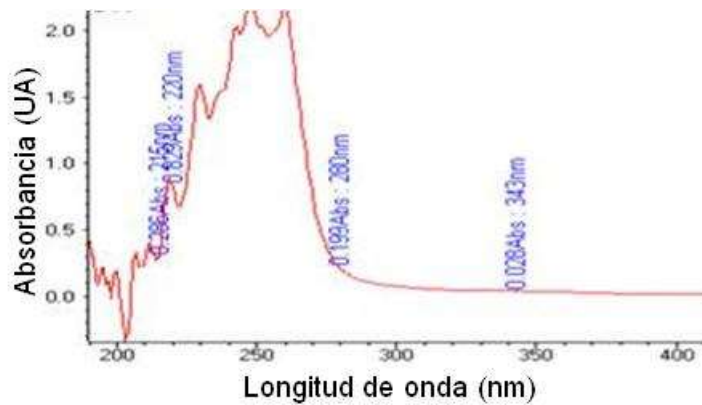


De este barrido se confirma que la Polilisina tiene un máximo de absorbancia a 215 nm.

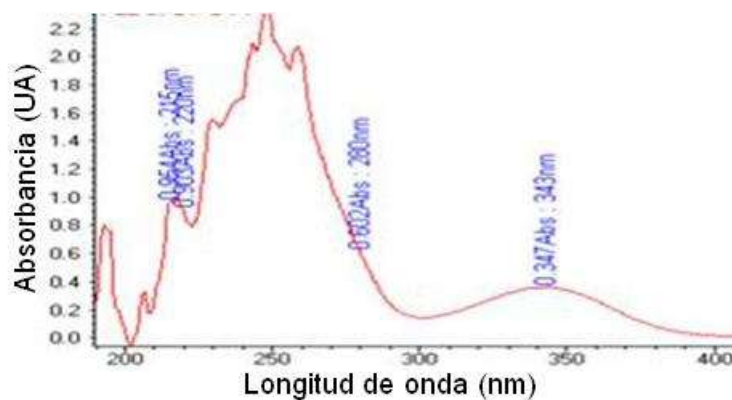
f) Barrido 6: SPDP-DMSO.



g) Barrido 7: DTT disuelto en fase móvil (Na_2HPO_4 17.42 mM, KH_2PO_4 2.58 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1.0 mM, pH 7.2.).



h) Barrido 8: PLL-SPDP-DTT, mezclado de manera manual con micropipeta.



De los barridos realizados se dedujo lo siguiente:

- En los barridos 1, 2 y 3, se observa un pico con máximo de absorbancia a 215 nm, que puede corresponder a Polilisina libre, debido a que no reaccionó con SPDP para formar el conjugado PLL-SPDP (barrido 2). Una de las posibles causas, es que no hay suficiente cantidad de SPDP. Por esta razón se propuso evaluar el efecto de aumentar la cantidad de SPDP de las reacciones siguientes en un 100%.
- En el barrido 7, correspondiente al DTT, se observan dos máximos de absorbancia: 250 y 260 nm, mismos que no aparecen el barrido 3, lo que indica que la totalidad del DTT adicionado reaccionó en el conjugado PLL-SPDP-SH. Al no haber un sobrante se tienen dos posibilidades: se está adicionando la cantidad exacta de DTT que reduzca el complejo PLL-SPDP, o bien no es suficiente por lo que se está agotando sin reducir todo el complejo. Esto último explicaría la baja eficiencia que se ha obtenido en estas reacciones en

experimentos anteriores. Por este motivo, se propuso incrementar también la cantidad de DTT.

A continuación se presentan los resultados bajo estas nuevas condiciones:

Se realizó la síntesis de acuerdo con lo establecido en experimentos anteriores aumentando la cantidad de SPDP al doble, es decir, se utilizaron 15 mg. Es probable que el aumento de SPDP haya sido excesivo, pues hubo formación de gran cantidad de precipitado, que pudiera ser SPDP libre. El conjugado se centrifugó antes de ser purificado por cromatografía para eliminar el precipitado. En la figura 55 se muestra el cromatograma obtenido.

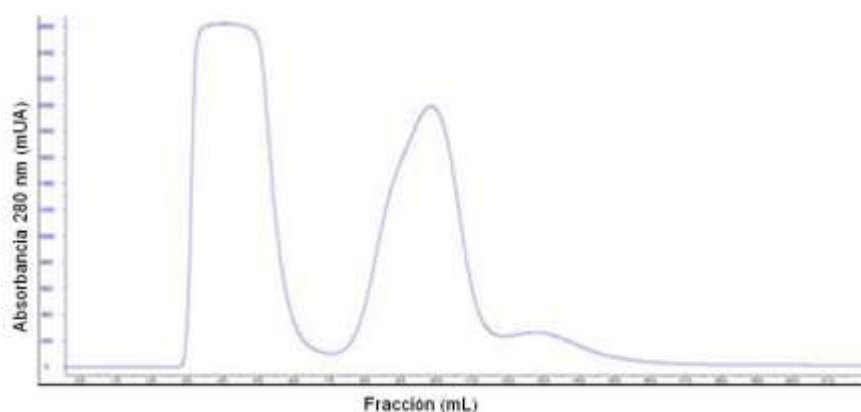
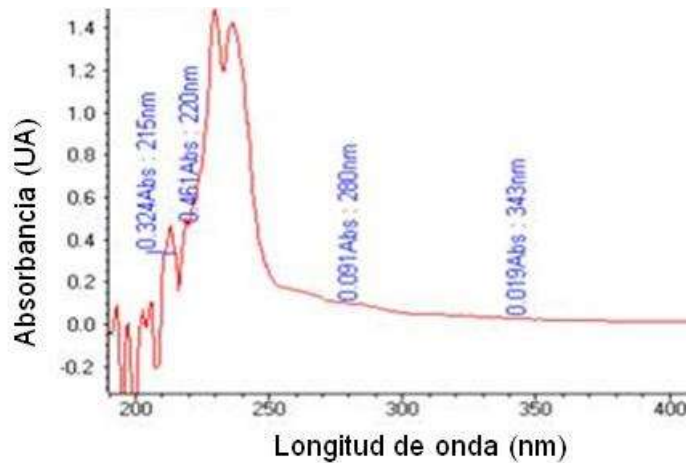


Figura 55. Cromatograma de la purificación del complejo PLL-SPDP obtenido por la reacción de 15 mg de LC-SPDP y 10 mg de PLL. Flujo: 1 mL/min; Fase móvil: Na_2HPO_4 17.42 mM, KH_2PO_4 2.58 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1.0 mM, pH 7.2. Límite de exclusión de columna: 6 kDa

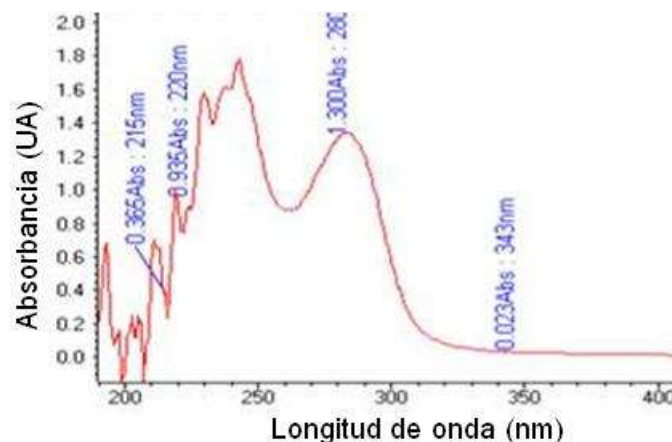
En el cromatograma se obtuvo el comportamiento esperado respecto a los picos del complejo y de hidroxisuccinimida (siendo comparables las absorbancias con cromatogramas de esta reacción obtenidos previamente). Sin embargo, se aprecia la formación de un hombro después del segundo pico, lo que indica la presencia de SPDP libre. Esto indica que el incremento de LC-SPDP fue excesivo, y sugiere que el doblar la cantidad de este reactivo no representa un beneficio en el rendimiento de la reacción. Con el fin de obtener más información de esta reacción, se realizaron los siguientes barridos:

a) Barrido 9: Se tomó una alícuota de la polilisina solubilizada en fase móvil: Na_2HPO_4 17.42 mM, KH_2PO_4 2.58 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1.0 mM, pH 7.2., previo a la formación del conjugado con SPDP.



Esta lectura podría convertirse en un parámetro para monitorear la cantidad de PLL inicial. En este experimento no es posible hacer una comparación, pues es el primer dato que se obtiene a la concentración real de la polilisina en la reacción.

b) Barrido 10. Se tomó una alícuota del conjugado PLL-SPDP purificado y concentrado.



En el barrido 10 el pico correspondiente al conjugado PLL-SPDP, cuya máxima absorbancia se registra a 280 nm, la absorbancia pasó de 0.4 (barrido 2; correspondiente al conjugado PLL-SPDP de la reacción realizada con 7.5 mg de

LC-SPDP) a 1.3, es decir, presentó una absorbancia más de tres veces mayor. Esto indica la obtención de mayor cantidad del complejo PLL-SPDP en esta reacción con 15 mg de LC-SPDP.

Se realizó la síntesis del conjugado PLL-SPDP-SH de acuerdo con lo establecido en experimentos anteriores, pero incrementando la cantidad de DTT en un 50%; es decir, se utilizaron 36 mg. Se obtuvo el siguiente perfil cromatográfico:

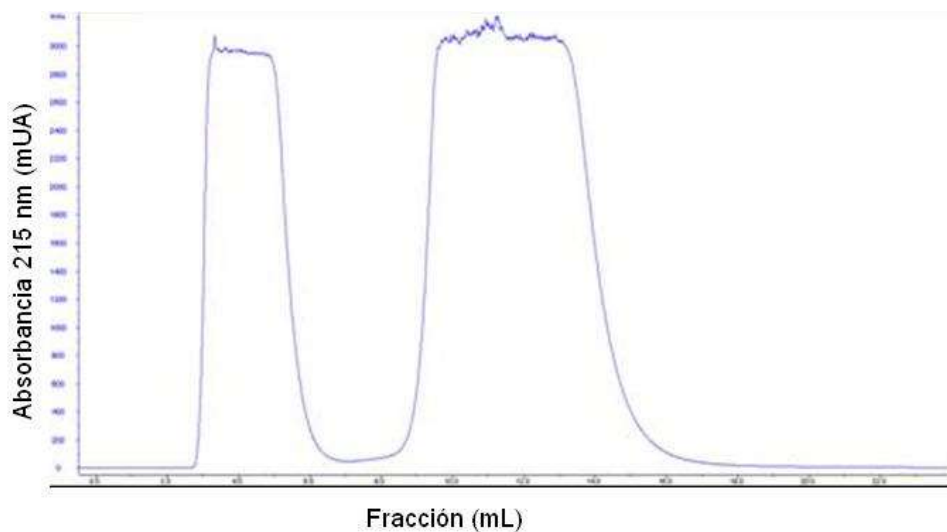
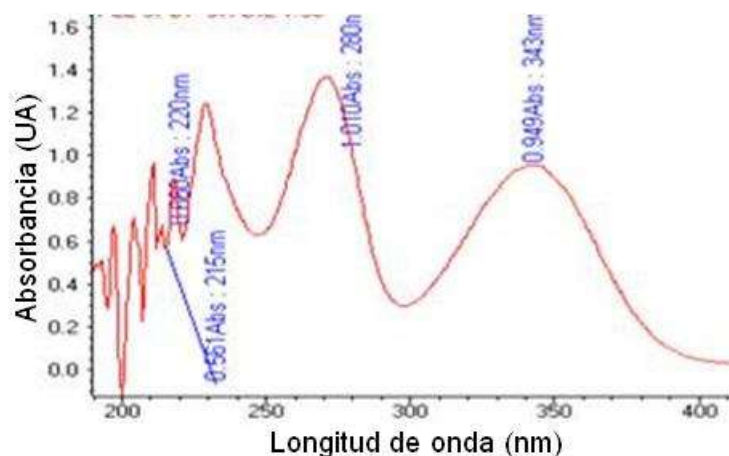


Figura 56. Cromatograma de la purificación del complejo PLL-SPDP-SH utilizando 36 mg de DTT en la reacción. Flujo: 1 mL/min; Fase móvil: Na_2HPO_4 17.42 mM, KH_2PO_4 2.58 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1.0 mM, pH 7.2. Límite de exclusión de columna: 6 kDa

Se realizaron los siguientes barridos para esta reacción:

c) Barrido 11. De la reacción reducida se tomó una alícuota antes de la purificación por cromatografía para obtener el barrido y calcular la eficiencia de reacción.



Se notó una mejor definición de los picos en comparación con el barrido 3 correspondiente a la misma muestra pero del experimento anterior. Se calculó la eficiencia de reacción:

Absorbancia a 343 nm de alícuota: 0.949; Factor de dilución (FD): 50

$$M = \frac{(A_{343})(FD)}{8080} = \frac{(0.949)(50)}{8080} = \frac{47.45}{8080} = 0.005872$$

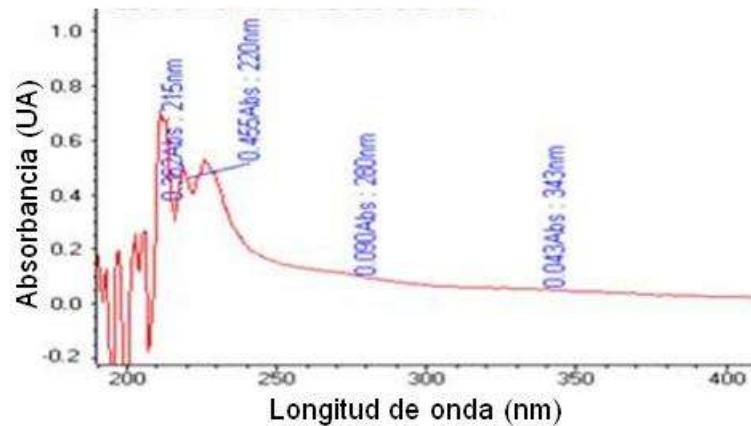
$$E.R. = \frac{(\text{Cálculo práctico})(100)}{\text{Cálculo teórico}} = \frac{(0.005872)(100)}{0.0088} = \frac{0.5872}{0.0088} = 66.72\%$$

M: Concentración molar de piridina-2-tiona (cálculo práctico)

E.R.: Eficiencia de reacción

Se obtuvo un incremento considerable en la eficiencia de reacción, atribuido al incremento en la cantidad del agente reductor (DTT).

d) Barrido 12. El conjugado reducido se purificó por cromatografía y se concentró a través de membrana de 30 kDa hasta 0.6 mL de volumen. Se tomó una alícuota para realizar el barrido.



En este barrido se observa la eliminación de los picos que tenían máximos de absorbancia en 280 y 343 nm. En primera instancia, se esperaría que el pico de 215 nm aumentara en altura respecto al barrido anterior, debido a que el producto se encuentra en mayor concentración. Sin embargo, debe considerarse que en la cromatografía para purificar el producto reducido, se eliminó el segundo pico que, al igual que el conjugado PLL-SPDP-SH, absorbe a 215 nm. Otro factor que pudo influir en la disminución de la lectura, pudo ser que parte del producto se quedara retenido en la membrana de ultrafiltración, sin embargo no existe evidencia.

Con estos resultados se concluye que es posible trasladar el proceso de síntesis de acarreador a un proceso escalable y adaptable a BPF. El rendimiento final esperado para cada lote de acarreador de NTS va de 65 a 70%, utilizando 36 mg de DTT por reacción, sin modificar la cantidad de LC-SPDP. Es necesario encontrar condiciones más adecuadas en el caso de operaciones unitarias para la concentración de cada producto de reacción para lograr un rendimiento lo más rentable posible.

6.22. Ensamblaje del NTS-poliplex

Por otro lado, para el ensamblaje de las nanopartículas de NTS-poliplex se propone el uso de un reactor pequeño (500 mL de capacidad), donde se colocaría la solución con pDNA. A dicho reactor se adicionaría con velocidad y agitación controlada la solución con PK, y transcurrido el tiempo necesario para

la formación del complejo pDNA-PK, se añadiría el acarreador de neurotensina también con velocidad y agitación controlada. Esto se logra con el uso de minibombas peristálticas, y agitadores específicos para el reactor.

De igual manera, mediante el uso de microbombas peristálticas es factible la dosificación en viales de vidrio de 2 mL. Una vez dosificado el lote (de la manera más rápida posible), se congelarían de inmediato los viales; podría ser mediante el uso de nitrógeno líquido, para su ingreso al liofilizador previamente precongelado.

Este procedimiento sería adaptable a BPF y permitiría la reproducibilidad, validación y el escalamiento del proceso de producción de NTS-poliplex. La liberación de lotes se realizaría con pruebas lote a lote, las cuales consistirían en potencia (dictada por la eficiencia de transfección), y evaluación de características como tamaño de partícula, estructura secundaria, retención electroforética, etc.

7. DISCUSIÓN

Durante las últimas tres décadas, los vectores no virales basados en polímeros sintéticos catiónicos han estado bajo exhaustiva investigación como una plataforma prometedora para el envío de ácidos nucleicos. Sin embargo, aún está pendiente la transición de investigación preclínica a la aprobación regulatoria final para este tipo de sistemas. Con el convencimiento de que las nanopartículas terapéuticas de NTS-poliplex deben caracterizarse y evaluarse ampliamente para obtener una formulación clínica exitosa, y eventualmente un escalamiento de producción y control de calidad, con este trabajo se contribuye a la formación de esa unión academia – industria (clínica).

7.1. La formulación desarrollada confiere estabilidad y lioprotección a las nanopartículas de NTS-poliplex

La caracterización de las nanopartículas de NTS-poliplex en EF25 arrojaron, brevemente, los siguientes parámetros: forma toroide, tamaño de partícula promedio de 142.8 nm, potencial zeta promedio de 25.3 mV y eficiencia de transfección promedio de 22.13%. Estos parámetros se utilizaron como referencia para evaluar los prototipos de formulación y la calidad de las partículas después del proceso de liofilización en la formulación desarrollada. Para esto último también se utilizaron como parámetros los patrones específicos de bandeo de DC y F.T.-I.R.

El vehículo de la formulación desarrollada consiste en una serie de componentes que confieren diferentes características a las nanopartículas de NTS-poliplex (tabla 7). Estos factores están dados por la mezcla de sales y glucosa. La concentración baja de estos elementos en PF25 hizo posible tener una solución cuya osmolaridad es comparable con la solución salina fisiológica. Esta característica es esencial para propósitos clínicos.

Una gran desventaja de la mayoría de los vectores no virales es su baja estabilidad en sistemas acuosos, la cual incluye la tendencia a formar agregados, lo que generalmente se correlaciona con una pérdida en la eficiencia de transfección^{71; 72; 73; 74; 75}. Esta formación de agregados depende, además de las características intrínsecas del vector, de la fuerza iónica, pH y/o viscosidad que aporte el vehículo^{67; 128}. Los parámetros de caracterización físicos y biológicos tanto *in vitro* como *in vivo* arrojaron resultados que indican una estabilidad de las nanopartículas de NTS-poliplex en PF25 comparable a la observada usando EF25. Sin embargo, se observó muerte celular cuando se utilizaron las formulaciones PF100 y PF280 debido a la osmolaridad generada por la concentración elevada de glucosa.

Por otro lado, los resultados de TEM muestran que una concentración de 5% de sacáridos (glucosa 280 mM) propicia la dispersión de las partículas, lo que puede deberse al aumento de densidad y viscosidad del medio que confiere la alta concentración de glucosa¹²⁵. Esta reducción en la tendencia a la aglomeración está relacionada con una mayor estabilidad en suspensión^{71; 75; 128}. Lamentablemente, esta concentración no es compatible con el uso clínico como se evidenció en los ensayos de funcionalidad biológica. Sin embargo, puede considerarse como protocolo experimental para la caracterización del poliplex.

Al igual que los datos de eficiencia de transfección, los patrones de aglomeración y la forma física de las nanopartículas de NTS-poliplex son comparables utilizando EF25 y PF25, tal como se observa en las Figuras 23 y 24 en los análisis de TEM y SEM. Los tamaños de las nanopartículas en ambos casos son de 100 a 150 nm y los aglomerados van de 200 a 500 nm.

Para la administración intravenosa, el tamaño de partícula del NTS-poliplex es una característica sumamente importante, ya que la farmacocinética y la farmacodinamia dependen principalmente de éste parámetro. En el primer caso, el control de tamaño y la aglomeración es importante para evitar obstrucciones capilares⁸⁵ y una retención predominante en el sistema retículo-endotelial¹⁰¹. En el caso de la farmacodinamia, el control del tamaño es importante debido a que sólo las nanopartículas de 100 a 200 nm pueden ser endocitadas vía interacción ligando-receptor, y los complejos mayores a 200 nm son susceptibles de ser internalizados de manera inespecífica por macropinocitosis². Así, las partículas de mayor tamaño (>200 nm) no serán capaces de entrar a la célula por este mecanismo específico desencadenado por la interacción del NTSR1 y la neurotensina, y serán propensas a ser eliminadas por células del sistema inmune.

Por otro lado, los capilares tienen un diámetro mínimo de 5 μm ¹²⁹. Las micrografías de TEM y SEM muestran complejos de partículas aglomeradas que no exceden este tamaño, lo que explica por qué en animales de experimentación no se han observado efectos o muerte relacionados con trombos^{60; 61; 101} después de la administración sistémica de NTS-poliplex.

El tamaño promedio del NTS-poliplex determinado por DDL en EF25 y en PF25 no presentó diferencia significativa (142.8 y 141.7, respectivamente). Las curvas de distribución mostraron un rango de tamaño de 80 a 500 nm, confirmando lo observado en los estudios de SEM y TEM. Los picos observados alrededor de 10 nm en ambos casos se atribuyen a artificios del instrumento de DDL.

En cuanto a los valores de potencial zeta, éstos difieren significativamente en ambas formulaciones de acuerdo con la prueba *t* de *Student* (23.5 mV en EF25 y 14.1 mV en PF25). Ya que el acoplamiento electrostático del acarreador de neurotensina (cuya carga neta es positiva) con el pDNA (con carga neta

negativa) genera una neutralización de cargas, se generan nanopartículas con una carga neta neutral. El hecho de que este valor se vea disminuido en el caso de PF25 podría sugerir que hubo un mayor índice de interacción y por lo tanto de acoplamientos electrostáticos que conllevan a la formación de más nanopartículas, dejando menos cargas negativas y positivas (como en este caso) libres. Este incremento en las interacciones electrostáticas podría atribuirse a la fuerza iónica aportada por las sales y glucosa de PF25. En el caso de EF25, probablemente las cargas que aportan sus otros componentes, tales como aminoácidos, alteran el equilibrio buscado de fuerza iónica para crear un sistema más estable.

Por otro lado, se obtuvieron los patrones de bandeo para caracterizar la estructura secundaria de las nanopartículas de NTS-poliplex y sus componentes en PF25 utilizando la técnica de difracción circular. Cabe mencionar que no fue posible aplicar esta metodología en el caso de EF25 debido al fondo observado y atribuido a todos sus componentes (principalmente los aminoácidos). Dichos patrones son característicos de cada componente y de las partículas ensambladas. El patrón de bandeo del pDNA es comparable al que se reportó previamente⁶⁸. El bandeo del acarreador de neurotensina corresponde, como se esperaba, a una conducta "random coil", al ser un homopolímero de bajo peso molecular acoplado a péptidos. La adición del PK al pDNA provoca un desplazamiento de 5 nm a la izquierda de la banda a 245 nm. La adición del acarreador de neurotensina al complejo pDNA-PK causa un desplazamiento a la derecha de aproximadamente 10 y 20 nm en las bandas de los 245 y 270 nm, respectivamente. Estos desplazamientos se atribuyen a las nuevas posiciones adoptadas por los grupos funcionales debido a la supercompactación del pDNA después de su interacción con el PK y el acarreador^{69; 70; 120; 121}.

Todos estos resultados fueron los parámetros de referencia para evaluar la capacidad de lioprotección de la formulación nueva, la cual podría representar una gran ventaja para llevar a las nanopartículas de NTS-poliplex al uso clínico. Las micrografías de TEM mostraron que después de la liofilización, las nanopartículas de NTS-poliplex en PF25 conservan su forma física e incluso aparentan estar más dispersas que sin pasar por este proceso. Del mismo modo, los ensayos *in vitro* cualitativos y cuantitativos demuestran que las nanopartículas en PF25 reconstituidas fueron capaces de transfectar células

N1E-115, con un porcentaje de transfección comparable al control positivo (NTS-poliplex no liofilizado). Asimismo, los patrones de bandeo de difracción circular se conservan también después de la liofilización y reconstitución.

El tamaño de las nanopartículas de NTS-poliplex confirma la conservación de su integridad después de la reconstitución, ya que los valores arrojados por DDL son comparables a los obtenidos de muestras no liofilizadas ya sea en EF25 o en PF25. Además, el Índice de Polidispersión disminuyó significativamente en comparación con el de las muestras recién preparadas, lo que indica una población más homogénea; lo cual podría estar propiciado, además de la formulación y la inmovilización por congelación previa al ciclo de liofilización, por la reconstitución.

En cuanto al potencial zeta, éste se vio disminuido de manera significativa después de la reconstitución, con valores cercanos a cero, lo cual indica una interacción total de los componentes de las nanopartículas. Sin embargo, se ha reportado que los poliplexes con carga neutral de superficie son más inestables, se agregan con mayor facilidad en suspensión y forman precipitados^{84; 85; 86}. Con el fin de evitar la modificación de la proporción N/P (nitrógeno del polímero / fosfato del pDNA) en el NTS-poliplex (debido a efectos no deseados de una carga superficial fuertemente positiva o negativa *in vivo*; ver más adelante), se implementó la inmovilización de las nanopartículas durante el paso de congelación en la liofilización, ya que la agregación no se presenta a temperaturas de incubación por debajo de la temperatura crítica (T_g)¹²⁴. Esto se logró con la congelación inmediata de las nanopartículas después de su ensamblaje en PF25, incubando los viales a -80 °C durante 3 h previamente a la fase de sublimación de la liofilización. Esto también compensó la ausencia de la matriz cristalina formada por altas concentraciones (no isotónicas) de sacáridos, cuyo papel es también la inmovilización de nanopartículas durante la congelación.

Se ha reportado previamente que se requieren concentraciones de sacáridos del 5% o más en una formulación para obtener una acción de lioprotección⁷¹. Se han utilizado dextranos de bajo peso molecular como excipientes lioprotectores, lo cual ha permitido reducir la osmolaridad aproximadamente un 40% en comparación con el peso equivalente de sacarosa⁹⁹. Asimismo, se ha sugerido que la crio y lioprotección están en función

de la relación sacárido-pDNA y esta relación depende a su vez del tipo de nanopartícula, sus componentes y el sacárido utilizado como estabilizante^{74; 75; 93; 115; 130}. Por ejemplo, en el caso de sacarosa y glucosa en complejos lípido/DNA, la atenuación de la agregación y conservación de las tasas de transfección se alcanzan a relaciones sacarosa-DNA mayores a 500⁹³. Del mismo modo, la conservación del tamaño de partícula de poliplexes constituidos por LPEI, polietilenimina, y DMAEMA, ó lipoplexes a base de DOTAP-DOPE, DOTAP-Chol, o DMRIE-C se alcanza a radios de masa de sacarosa-DNA de 4000, 7500, 1250 y 1250, 900 y 500, respectivamente^{75; 131}.

La concentración de glucosa en PF25 es equivalente a una relación glucosa-pDNA de aproximadamente 250 (masa/masa). De acuerdo con la teoría de “sustitución acuosa”, a esta concentración la glucosa forma puentes de hidrógeno con la superficie de las nanopartículas de NTS-poliplex y contribuye a la conservación de su estructura nativa en el estado liofilizado (incluso aún probablemente después de la reconstitución, evitando la aglomeración). La teoría de la “matriz cristalina”, en la cual la lioprotección está dada principalmente por una matriz viscosa formada por la elevada concentración de sacáridos en este caso está descartada (esto hubiera aplicado en el caso de PF100 o PF280)^{93; 97; 99; 119}. De acuerdo con Molina *et al*¹³¹., esta capacidad de lipoprotección conferida con una baja proporción glucosa/DNA está dada y/o explicada por: 1) el sacárido utilizado (glucosa); 2) las características del acarreador de NTS, y 3) la dosis baja de nanopartículas que ha demostrado eficacia terapéutica^{60; 61; 132}. Se ha considerado un ajuste de dosis a humanos en un aspecto volumétrico y no en relación a la concentración, de modo que este tercer punto no es motivo de estudios posteriores.

En el caso de las nanopartículas de NTS-poliplex, un radio bajo de glucosa/DNA, en comparación con otros poliplexes y sacáridos^{75; 94; 131}, en combinación con el proceso diseñado de inmovilización y liofilización de las nanopartículas, fue suficiente para conferir crio- y lioprotección; y esto contribuyó también a la conservación de la isotonicidad en PF25.

7.2. Las nanopartículas de NTS-poliplex reconstituidas se conservan íntegras en su mayoría al interactuar con suero

Los poliplexes, una vez administrados vía intravenosa, su agregación y/o desensamblaje pueden ser ocasionados por interacciones no deseadas con el suero, tejidos y células del sistema inmune. El incremento en el tamaño de los poliplexes debido a la agregación en circulación sistémica puede llevar a su retención en capilares con los que tengan los primeros contactos y así restringir la migración del poliplex a través de las lagunas endoteliales⁸⁵. El potencial zeta juega un papel importante en la conservación del tamaño y la funcionalidad de las nanopartículas *in vivo*. Una carga fuertemente positiva de superficie en las nanopartículas facilita interacciones inespecíficas con proteínas del plasma cargadas negativamente, con la matriz extracelular y con las superficies celulares; mientras que cargas fuertemente negativas pueden ser blanco de fagocitosis vía el receptor de polianiones de los macrófagos⁵. De este modo, la estabilización de la carga superficial de los poliplexes debe conferir el tiempo suficiente de circulación en torrente sanguíneo para permitir el envío a células específicas mediante las interacciones ligando-receptor. Las nanopartículas de NTS-poliplex tienen prácticamente una carga de superficie neutra, lo que podría explicar los resultados observados después de su interacción con SFB y suero humano.

Los análisis de TEM para determinar la estabilidad de las nanopartículas de NTS-poliplex reconstituido en interacción con el SFB revelaron que éstas permanecen íntegras aún después de interactuar 60 minutos con el suero. Este estudio se realizó utilizando el NTS-poliplex a una concentración 5X (Cfs: pDNA: 30 nM, PK: 25 M, acarreador: 720 nM), la cual es empleada generalmente en ensayos *in vivo*. Puede observarse la integridad de las partículas y la conservación en el patrón de aglomeración.

De igual forma, tomando como referencia los cromatogramas correspondientes a los componentes de las nanopartículas de NTS-poliplex, el análisis de radioSEC-HPLC de las nanopartículas sugiere que después de la interacción con suero humano, hay una fracción mayoritaria de nanopartículas NTS-poliplex que permanece íntegra.

Sin embargo, se observan otras dos fracciones minoritarias de mayor peso molecular. Se formularon tres hipótesis al respecto: la primera es que, en el suero, las nanopartículas de NTS-poliplex forman agregados entre ellas debido a la fuerza iónica (como se observó en TEM). La segunda es que las partículas se asocian con proteínas séricas para formar agregados de alto peso molecular. Y la tercera es que las nanopartículas de NTS-poliplex, después de la interacción con suero, y, debido a la fuerza iónica que este proporciona, pueden sufrir cambios conformacionales o bien, degradaciones que pudieran dar lugar a estos cambios, lo cual podría originar complejos que, a pesar de ser del mismo peso molecular o incluso menores, tengan un tiempo menor de retención a causa de su conformación estructural.

7.3. La liofilización confiere una vida de anaquel a las nanopartículas de NTS-poliplex de al menos seis meses a 25 °C y 60% HR

Las pruebas de estabilidad a largo plazo de las nanopartículas de NTS-poliplex liofilizado en la formulación desarrollada demostraron que estas preparaciones permanecen estables y funcionales, con una eficiencia de transfección comparable a las nanopartículas de NTS-poliplex recién preparado, durante 6 meses a 25 °C y un 60% HR. El estudio de estabilidad acelerada sugiere que, en climas tropicales, es recomendable el almacenamiento de los liofilizados bajo refrigeración.

Estos resultados indican que es factible al contar con una vida de anaquel considerable que seguramente beneficiará la comercialización de las nanopartículas de NTS-poliplex para su uso clínico (y estudios clínicos).

7.4. Las nanopartículas de NTS-poliplex en PF25 tienden a acumularse en hígado y riñones sin generar toxicidad

En el gráfico de biodistribución puede observarse que las nanopartículas de NTS-poliplex están totalmente ausente en cerebro, lo que confirma que las

nanopartículas no atraviesan la barrera hematoencefálica⁶⁰. Su presencia en el corazón, el bazo y los pulmones es prácticamente nula. Sin embargo, se observa una pequeña pero significativa densidad de nanopartículas en el tracto gastrointestinal, lo cual se atribuye a la presencia (aún en baja densidad) de NTSR1 antes descrita en estos órganos¹³. En este caso, una vez internalizado el pDNA en el núcleo, la degradación de los otros componentes del NTS-poliplex puede ser por proteasas que los convertirían en aminoácidos que formarían parte del *pool* disponible para otros procesos celulares homeostáticos, y los resultados sugieren que esto sucede antes de 24 h. Esto correlaciona con los tiempos de internalización y expresión de genes del pDNA transferidos por las nanopartículas de NTS-poliplex reportados previamente¹³². En sangre, las nanopartículas de NTS-poliplex desaparece también después de las 24 h posteriores a su administración, lo que es de esperarse e indica que a más tardar en este tiempo las nanopartículas ya llegaron a el(los) órganos blanco, o de depuración.

Por otro lado, el estudio arrojó la presencia de cantidades elevadas de nanopartículas de NTS-poliplex en hígado y riñones, lo cual es atribuido a la irrigación sanguínea y a que son los órganos principales de depuración en el organismo¹²⁹ y cuentan con células del sistema fagocítico mononuclear; no a un direccionamiento específico hacia ellos. Esto se confirma con los hallazgos de Rubio-Zapata *et al.*, donde no se encontró actividad de un gen reportero en estos órganos después de la administración sistémica de NTS-poliplex⁶⁰. Esta idea se refuerza por la cantidad de nanopartículas de NTS-poliplex detectable tanto en tracto gastrointestinal como en hígado y riñones a través del tiempo. En estómago, intestino grueso e intestino delgado, la concentración de nanopartículas es creciente alcanzando su máximo a las 6 h, mientras que el comportamiento en hígado y riñones es decreciente, siendo la concentración máxima de nanopartículas de NTS-poliplex a la media hora post-administración. En el primer caso, al ser un direccionamiento específico por la presencia de NTSR1 en el tracto gastrointestinal, se requiere de un tiempo mayor para que la totalidad de partículas en circulación pasen por estos órganos desencadenando el mecanismo de endocitosis, acumulándose así las nanopartículas en función del tiempo. Esto coincide también con la radiactividad detectada en la sangre a

las 6 h; donde aún hay una cantidad considerable para llegar a estos órganos diana. Sin embargo, dados los resultados de radiactividad en orina a los 30 y 60 min post-administración (ver apartado siguiente), esta presencia en sangre a las 6 h podría tratarse también de un secuestro por la interacción entre la membrana de las células sanguíneas y el NTS-poliplex; ya que se ha detectado, aunque en baja densidad y con diferentes afinidades, la presencia de receptores a NTS en linfocitos¹³³. En el caso de hígado y riñones, el direccionamiento de nanopartículas de NTS-poliplex, al ser inespecífico (en riñones no se ha encontrado el receptor de NTS y en hígado en muy baja densidad¹³), es prácticamente instantáneo debido a que son los principales órganos de depuración, y, por tanto, de irrigación sanguínea. Y esta localización va disminuyendo a través del tiempo en función de los recambios por circulación sanguínea, de la internalización por células blanco y de los mecanismos de depuración que pudieran estarse ejerciendo.

Al encontrar esta presencia importante de nanopartículas de NTS-poliplex en el hígado y los riñones, se evaluó la toxicidad que pudiera generar PF25 y/o las nanopartículas en estos órganos.

Los resultados de este trabajo demuestran que la administración sistémica y diaria de nanopartículas de NTS-poliplex por diez días con las siguientes Cfs: pDNA: 30 nM; PK: 25 M; acarreador: 720 nM no produce toxicidad aguda ni crónica en el hígado ni en los riñones, confirmando previos resultados¹⁰¹. El esquema de administración que se ha empleado en modelos animales corresponde a cinco dosis en diez días intercalados de administración^{60; 61}. En este trabajo, se administraron diez dosis; una diariamente, con el fin de determinar si este exceso de dosis genera toxicidad renal o hepática en los animales sanos, y se cuantificaron los marcadores de daño al final de la décima dosis y diez días después de la misma.

Se utilizaron los marcadores ALT, FAS, glucosa, colesterol, urea, creatinina, y albúmina para cuantificar el daño hepático y los últimos tres para cuantificar el daño renal. Los grupos control, a los cuales se les administró exclusivamente el vehículo de la formulación desarrollada, no mostraron alteraciones en ninguno de los marcadores en los diez días de administración y después de los diez días después de la última administración. Los resultados

fueron comparables con los grupos a los que se administró solución salina bajo el mismo esquema. Esto confirma la inocuidad de la formulación desarrollada.

En el caso de la administración de las nanopartículas NTS-poliplex en PF25, se observaron ligeras alteraciones únicamente en los casos de la FAS y glucosa después de diez días de administración diaria. Sin embargo, diez días después de este periodo, los niveles de estos marcadores se restablecieron a valores basales. Esto se atribuye a que el contenido de glucosa en el vehículo interactúa con la poli-L-lisina libre (o incluso de nanopartículas) en las muestras, como se ha reportado anteriormente¹³⁴, lo cual tiene un efecto en el ingreso de la glucosa a las células, y ésta queda sujeta a la disociación de la poli-L-lisina para su metabolización. Esto se refleja en el nivel aumentado de glucosa en sangre en el décimo día de administración diaria de las nanopartículas de NTS-poliplex en PF25. En el caso de la FAS, se ha encontrado que el promotor del gen que codifica a esa enzima contiene un elemento de respuesta a glucosa. Entonces, al llegar la glucosa del vehículo asociada a PLL en una cantidad considerable al hígado (ver biodistribución), debe haber una disociación de modo que la glucosa ingrese a las células hepáticas y promueva la transcripción de la FAS a través de dicho elemento de respuesta, elevándose así los niveles de esta enzima involucrada en el metabolismo de los ácidos grasos¹³⁵.

Estas hipótesis se refuerzan por el hecho de que los niveles de ambos marcadores son restablecidos a los diez días post-administración final, por lo que estas alteraciones no se relacionan con daño hepático; y la ALT y el colesterol conservaron sus niveles tras las administraciones. Asimismo, los niveles de urea, creatinina y albúmina no variaron significativamente con respecto a los controles. Sobre la misma línea, los análisis histopatológicos demostraron la integridad de los tejidos hepático y renal después de diez días de recuperación, en comparación con las muestras correspondientes a los grupos a los que se administró CCl₄ y CIS respectivamente.

Todos estos resultados demuestran que tanto el vehículo desarrollado para la formulación del NTS-poliplex por sí mismo no generan daño hepático, ni renal.

7.5. La orina es una vía de eliminación de NTS-poliplex

El siguiente paso fue diseñar un ensayo para determinar si esta acumulación de nanopartículas de NTS-poliplex en los riñones conlleva a su eliminación por la orina, mediante radioSEC-HPLC. A los treinta y sesenta minutos postadministración, se detecta la presencia de nanopartículas íntegras en la orina. Sin embargo, se detecta una población muy pequeña de menor peso molecular que presenta una gran radiactividad (la cual es aún mayor a los 60 min). Esto podría representar fragmentos de nanopartículas de NTS-poliplex, pudiendo ser ^{99m}Tc -PK libre o bien, complejos ^{99m}Tc -PK-pDNA, producto de degradación en el organismo por proteasas, asociación con otras proteínas, nucleasas, etc. El hecho de haber mayor radiactividad a los 60 min, podría reforzar esta idea de la degradación previa; a mayor tiempo, se eliminará por la orina menor cantidad de nanopartículas íntegras, ya que habrá mayor degradación. Esto sugiere que la orina es una de las principales vías de depuración de las nanopartículas no internalizadas; tanto íntegras, como de sus productos de degradación.

Considerando que sólo el desensamblaje de nanopartículas en la membrana basal glomerular del riñón permitiría el tránsito de los componentes de NTS-poliplex a la orina, una hipótesis que pudiera explicar estos hallazgos es que las nanopartículas se re-ensamblan en la orina después de su desensamblaje y filtración, como se ha demostrado previamente por Zuckerman *et al.*¹³⁶, sugiriendo que al menos una población de exceso de nanopartículas llega ensamblada y no agregada a los riñones. Sin embargo, deben llevarse a cabo estudios de biodistribución del NTS-poliplex en PF25 con más detalle.

7.6. El proceso de producción de NTS-poliplex propuesto es escalable y adaptable a BPF

El proceso de producción para las nanopartículas de NTS-poliplex involucra tres subprocesos: uno biotecnológico para la obtención del pDNA; uno

químico, para la obtención del acarreador de neurotensina, y uno físico, para el ensamblaje de las nanopartículas.

Para asegurar un buen rendimiento de pDNA amplificado en bacterias, se seleccionó el medio PDM con base en las pruebas realizadas en matraz. Esto, en conjunto con la cosecha por centrifugación y un cultivo de 4 L en lote aseguran la cantidad adecuada de pDNA para aproximadamente cinco lotes de acarreador de neurotensina (considerando ya el rendimiento del proceso de purificación), debido a las concentraciones utilizadas de cada uno para el ensamblaje del NTS-poliplex. Sin embargo, podría aumentarse aún más el rendimiento por lote de pDNA incrementando el volumen de cultivo (lo que implicaría adquirir un bioreactor de mayor capacidad), o bien, implementando un cultivo por lote alimentado. En estos casos, puede seguir utilizándose la centrifugación como opción más rentable de cosecha. El rendimiento menor de biomasa y de pDNA al utilizar el microfiltro puede deberse al esfuerzo de corte que se ejerce cuando el caldo de cultivo pasa a través de él.

El proceso de purificación del pDNA se realizó utilizando equipo y columnas a escala piloto. De los lotes de prueba se dedujo que no es necesario el escalamiento a nivel mayor, al menos para las etapas iniciales de producción. El rendimiento de la purificación fue reproducible y rentable considerando que en este tipo de procesos hay una merma importante en los primeros pasos del proceso de purificación. Sin embargo, fue posible mejorar el porcentaje de recuperación en la etapa de exclusión molecular en uno de los lotes cambiando las condiciones de flujo de la fase móvil.

Este proceso de propagación y purificación de pDNA es escalable y puede adaptarse perfectamente a la producción bajo BPF. Asimismo, es posible establecer puntos de control de proceso y criterios de control de calidad que aseguren la seguridad y calidad del pDNA. Algunas de las pruebas que se utilizan para la evaluación del producto son: electroforesis, cromatografía, prueba de pirógenos y endotoxinas (LAL), proteínas residuales. La electroforesis y la cromatografía se utilizan también en el control de proceso. Incluso, la cromatografía preparativa durante el proceso de purificación sirve, al mismo tiempo, para evaluar la pureza del subproducto en las etapas de exclusión molecular, fase reversa e intercambio iónico.

En cuanto al proceso de síntesis de acarreador de neurotensina, fue posible trasladar el proceso de cromatografía por gravedad utilizado a nivel laboratorio a FPLC. Se obtuvieron cromatogramas equivalentes a los obtenidos con cromatografía por gravedad^{65; 87; 88}. Asimismo, se estableció un procedimiento para la eliminación de guanidina del acarreador de neurotensina. La guanidina es constituyente de la fase móvil para la purificación del acarreador de neurotensina que se encuentra a una concentración de 2 M. A nivel laboratorio, ésta es retirada por medio de diálisis en bolsa. Esta metodología es poco reproducible, no es validable, ni escalable y no es adaptable a BPF. El procedimiento establecido consiste en la remoción de este componente (el cual, además es altamente tóxico), a través de cromatografía de exclusión molecular, subsanando las desventajas mencionadas del procedimiento a nivel laboratorio.

Un detalle del procedimiento establecido para la síntesis de acarreador, es que se observaron rendimientos más bajos que los obtenidos a nivel laboratorio. Para encontrar la causa del bajo rendimiento, se realizaron barridos de absorbancia UV de cada reacción con el fin de detectar en qué paso del proceso había pérdidas de producto, y de confirmar si se estaban formando los complejos esperados. Con el fin de tener una referencia para la caracterización e interpretación correcta de cada reacción, se realizaron barridos de as UV también de cada componente (SPDP-DMSO, DTT, PLL, PF, neurotensina).

De estos barridos y de experimentos posteriores se dedujo y observó que al aumentar ligeramente la cantidad de DTT se logró incrementar la eficiencia de las reacciones PLL-SPDP y PLL-SPDP-SH prácticamente al doble. Sin embargo, se requieren experimentos posteriores para lograr un aumento en la eficiencia global de reacción elevando así la rentabilidad del proceso. Para esto es fundamental considerar, además, la optimización en las operaciones unitarias para el aislamiento y concentración de cada producto de reacción.

8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró el desarrollo de una formulación apta para uso clínico que confiere estabilidad y vida de anaquel a las nanopartículas de NTS-poliplex. Asimismo, al evaluar su biodistribución y demostrar su integridad y ausencia de toxicidad después de la administración, se establecieron las bases para estudios preclínicos y clínicos, los cuales representan las etapas finales de la transferencia tecnológica entre academia e industria, lo cual contribuye a la resolución de problemas de salud pública, que es la finalidad última de la investigación científica en el ámbito de la salud.

Para que puedan llevarse a cabo dichos estudios, se requiere de producto liberado considerando tanto instalaciones de fabricación como un proceso de producción con estándares de calidad que cumplan con la legislación farmacéutica nacional e internacional. Al tratarse de un sistema complejo y sin precedentes en la industria farmacéutica, la caracterización del NTS-poliplex aquí desarrollada permitió establecer parámetros que pueden servir como referencia tanto para el control del proceso como para la evaluación de la calidad del producto final de NTS-poliplex.

De igual forma, por primera vez se ha propuesto un proceso de producción de un vector no viral para terapia génica escalable, monitoreable y adaptable a las buenas prácticas de fabricación. Esto sin lugar a dudas es un hecho relevante en el campo de desarrollo de fármacos; ya que, además, este proceso involucra un subproceso relacionado con la síntesis química; otro relacionado con la obtención de un producto biotecnológico (plásmido) y un tercero que conjunta ambos subproductos.

A continuación se resumen los aspectos técnicos más importantes obtenidos en este trabajo.

8.1. Caracterización de las nanopartículas de NTS-poliplex

En este trabajo se encontró que las nanopartículas de NTS-poliplex tienen:

- Forma física tipo toroide y tendencia a aglomerarse.

- Tamaño promedio de 150 nm; mostrando una distribución con un rango entre 80 y 500 nm, comprendidos por componentes libres o agregados de nanopartículas, respectivamente.
- Patrón determinado de bandeo, al igual que cada uno de sus componentes, en los métodos espectroscópicos DC y F.T.-I.R.
- Eficiencia de transfección reproducible bajo ciertas condiciones.

8.2. Desarrollo de un vehículo para el uso clínico de las nanopartículas de NTS-poliplex

- Concentraciones de glucosa de 100 a 280 mM en el vehículo alteran el patrón de aglomeración de las nanopartículas favoreciendo su dispersión. Sin embargo, no es factible utilizar *in vitro* ni *in vivo* estas concentraciones debido a que son hipertónicas y ocasionan un choque osmótico en las células.
- Una concentración de 25 mM de glucosa es isotónica (en conjunto con sales que tienen diversas funciones), por lo que las nanopartículas conservan su funcionalidad biológica y eficiencia de transfección, además de sus características físicas.
- El vehículo desarrollado, con 25 mM de glucosa, es capaz de conferir lioprotección al NTS-poliplex.
- Las nanopartículas conservan su integridad tras la interacción con SFB y suero humano.
- El NTS-poliplex liofilizado en el vehículo desarrollado tiene una vida de anaquel de al menos 6 meses a 25 °C y 60% HR.

8.3. Evaluación de la seguridad del NTS-poliplex en el nuevo vehículo

- El NTS-poliplex no atraviesa la barrera hematoencefálica.
- Se encontraron nanopartículas de NTS-poliplex en tracto gastrointestinal a la $\frac{1}{2}$, 1 y 6 h post-administración en forma creciente con respecto al tiempo (desapareciendo a las 24 h), lo que se atribuye a la internalización por presencia de NTSR1 en estos órganos.
- Se encontraron nanopartículas de NTS-poliplex en grandes cantidades en hígado y riñones a la $\frac{1}{2}$, 1 y 6 h post administración, en forma decreciente con respecto al tiempo. Este comportamiento confirma que es un direccionamiento inespecífico, debido a que son los principales órganos de depuración e irrigación.
- Después de 24 h no hay presencia de nanopartículas de NTS-poliplex en ningún órgano periférico.
- La orina es una vía de eliminación de las nanopartículas no internalizadas de nanopartículas de NTS-poliplex, tanto de manera íntegra (ensamblado post-filtración) como en componentes o productos de degradación.

8.4. Propuesta del diseño de un proceso de producción de NTS-poliplex escalable y adaptable a BPF considerando su rentabilidad

- El diagrama de flujo del proceso de producción de nanopartículas de NTS-poliplex propuesto indica la presencia de tres subprocesos: uno para la obtención de pDNA, otro para la síntesis de acarreador de neurotensina y otro para el ensamblaje de las nanopartículas de NTS-poliplex.
- Los procesos de propagación y purificación de pDNA propuestos son reproducibles, escalables, adaptables a BPF y rentables. El rendimiento obtenido de pDNA equivaldría aproximadamente a cinco lotes de acarreador considerando el historial de rendimiento en la obtención del último.

- El proceso de síntesis de acarreador propuesto y trasladado a FPLC es escalable y adaptable a BPF. El incremento de DTT en la reacción para la reducción del complejo PLL-SPDP aumentó el rendimiento de dicha reacción; no así de la reacción global de rendimiento de acarreador. Se requiere evaluar estrategias para elevar la rentabilidad de este proceso, considerando también los procedimientos ejecutados durante las operaciones unitarias para la purificación y concentración de cada producto de reacción.
- El proceso propuesto para el ensamblaje de las nanopartículas es escalable y adaptable a BPF. Sin embargo, se requiere de equipo específico para realizar las pruebas pertinentes.

9. PERSPECTIVAS

En este trabajo se establecieron y llevaron a cabo los principales pasos para la transferencia de nanopartículas de NTS-poliplex a una etapa de estudios clínicos para su posterior comercialización. Para su aplicación en cáncer, la administración que se considera es intravenosa, y para su aplicación en Parkinson, la vía de administración que se propone es intranigral, ya que el NTS-poliplex no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, sería interesante explorar otro tipo de vías de administración, como la nasal con el fin de facilitar su aplicación.

En este caso, se desarrolló una formulación apta para uso clínico de las nanopartículas de NTS-poliplex con base en sus características físicas y biológicas, para su administración intravenosa e intranigral. Asimismo, se desarrolló un proceso de liofilización y se encontró que el vehículo desarrollado es capaz de conferir lioprotección al NTS-poliplex, además de una vida de anaquel que hace factible su comercialización. Por otro lado, se encontró que las nanopartículas de NTS-poliplex y/o el vehículo son seguros y que una vía de eliminación de las nanopartículas es a través de la orina. Finalmente, se diseñó

un proceso de producción de nanopartículas de NTS-poliplex y sus componentes (pDNA, acarreador de neurotensina) escalable, rentable y adaptable a BPF.

De estos resultados surgen algunos aspectos que sería interesante desarrollar y/o investigar, como los que se enlistan a continuación:

- La formación de las nanopartículas de NTS-poliplex, al ser mediante interacciones electrostáticas, es un proceso aleatorio y dinámico, donde la aglomeración tiende a aumentar en función del tiempo. Es por esto que resulta sumamente complicado reportar una concentración de nanopartículas en suspensión. Sin embargo, sería interesante encontrar alguna manera de determinar un número aproximado de nanopartículas formadas bajo ciertas condiciones y a un determinado tiempo. Asimismo, sería ventajoso determinar si la formación de agregados es reversible por alguna metodología sin dañar la integridad de las nanopartículas. En el presente trabajo se realizaron pruebas utilizando sonicación (nivel *degas*, 1 / 5 min). Los complejos se disgregaron, pero hubo ruptura de los toroides, de acuerdo con TEM (no mostrado).
- Para la integración del dossier para asuntos regulatorios, sería importante la prolongación de las pruebas de estabilidad a largo plazo, para determinar la vida máxima de anaquel con la que cuentan los liofilizados de nanopartículas de NTS-poliplex.
- Sería interesante realizar un análisis espectroscópico detallado (masas) de las poblaciones encontradas en el cromatograma de radioSEC-HPLC del NTS-poliplex en interacción con suero humano. Esto elucidaría si se trata de partículas de NTS-poliplex agregadas debido a la fuerza iónica (como se observó en TEM), o si son complejos de las nanopartículas con proteínas séricas, o bien, partículas de NTS-poliplex que hayan sufrido cambios conformacionales.
- Como parte de un estudio detallado de farmacocinética, es necesario explorar si hay eliminación de nanopartículas de NTS-poliplex vía heces y si aplica, el tiempo que tarda en eliminarse por esta vía; así como la determinación de parámetros farmacocinéticos en general (vida media, etc.). Asimismo, se requiere diseñar estudios de farmacodinamia donde se

demuestre, por ejemplo, el desensamblaje de las nanopátículas una vez internalizadas. Por otro lado, se requieren estudios más detallados de biodistribución del NTS-poliplex en PF25 utilizando modelos animales de cáncer.

- Es recomendable realizar pruebas ulteriores para elevar el rendimiento y por lo tanto la rentabilidad del proceso de síntesis de acarreador de neurotensina propuesto.
- Es necesario realizar pruebas para estandarizar el ensamblaje de nanopartículas de NTS-poliplex de acuerdo con el proceso y equipos propuestos.

10. REFERENCIAS

- ¹ AKHTAR, S. Non-viral cancer gene therapy: Beyond delivery. **Gene Ther.**, v. 13, p. 739-740, 2006.
- ² GROSE, S. et al. Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations. **J Gene Med**, v. 7, n. 10, p. 1275-86, 2005.
- ³ CHO, Y.; KIM, J.; PARK, K. Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 55, n. 3, p. 721-34, 2003.
- ⁴ WASUNGU, L.; HOEKSTRA, D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. **J. Contr. Rel.**, v. 116, n. 2, p. 255-264, 2006.
- ⁵ DAVIS, M. Non-viral gene delivery systems. **Curr. Op. in Biotechnol.**, v. 13, p. 128-131, 2002.
- ⁶ ZANTA, M.; BELGUISE-BALLADIER, P.; BEHR, J. Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 96, n. 1, p. 91-96, 1998.

- 7 TROS DE ILARDUYA C, S. Y., AND DUZGUNES NEJAT. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 40, p. 159-170, 2010.
- 8 LIN, C. et al. Novel bioreducible Poly(amido amine)s for Highly Efficient Gene Delivery. **Bioconj. Chem.**, v. 18, n. 1, p. 138-145, 2007.
- 9 LIMA, M. P.-D. et al. Biophysical Characterization of Cationic Liposome-DNA complexes and their interaction with cells. **M. in Enzym.** DUZGUNES, N. California, USA: Elsevier. 373: 298-312 p. 2003.
- 10 ZHENGRONG, G. et al. Cell-Penetrating Peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications. **Biomed. Rep.**, v. 4, n. 5, p. 528-534, 2016.
- 11 NIIDOME, T.; HUANG, L. Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral vectors. **Gene Ther.**, v. 9, n. 1647-1652, 2002.
- 12 KANBA, K. et al. Binding of [3H]neurotensin in human brain: properties and distribution. **J. Neurochem.**, v. 46, n. 3, p. 946-52, 1986.
- 13 MENDEZ, M. et al. High Affinity Neurotensin Receptor mRNA Distribution in Rat Brain and Peripheral Tissues. **J. Mol. Neurosci.**, v. 9, p. 93-102, 1997.
- 14 DEVADER, C. et al. The Anti-Apoptotic Role of Neurotensin. **Cells**, v. 2, n. 1, p. 124-135, 2013.
- 15 CHOI, K. et al. A novel stroke therapy of pharmacologically induced hypothermia after focal cerebral ischemia in mice. **FASEB J.**, v. 26, n. 7, p. 2799-810, 2012.
- 16 LONNEKE, M.; BRETELER, M. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurol.**, v. 5, p. 525-535, 2006.
- 17 EDWARDS, T. et al. Genome-Wide Association Study Confirms SNPs in SNCA and the MAPT Region as Common Risk Factors for Parkinson Disease. **Annals of Human Gen.**, v. 74, n. 2, p. 97-109, 2010.
- 18 WOOTEN, G. et al. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? **J. Neurol., Neurosurg. and Psych.**, v. 75, p. 637-639, 2004.
- 19 SCHINDLER, J.; KELLY, J. Swallowing Disorders in the Elderly. **The Laryngoscope**, v. 112, n. 4, p. 589-602, 2002.

- 20 <http://www.eluniversal.com.mx/articulo/nacion/politica/2017/04/11/estiman-que-medio-millon-de-personas-padecen-parkinson-en-mexico>.
- 21 DORSEY, E. et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurol.**, v. 68, n. 5, p. 384-6, 2007.
- 22 OLANOW, C.; TATTON, W. Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 22, p. 123-44, 1999.
- 23 MAENO, H. et al. Comparison of mice deficient in the high- or low- affinity neurotensin receptors, Ntsr1 or Ntsr2, reveals a novel function for Ntsr2 in thermal nociception. **Brain Res.**, v. 998, p. 122-129, 2004.
- 24 CHOUKER, M. et al. Striatal dopamine transporter binding in early to moderately advanced Parkinson's disease: monitoring of disease progression over 2 years. **Nuclear Med. Communicat.**, v. 22, n. 6, p. 721-725, 2001.
- 25 TECHNOLOGY, D. D. <http://www.drugdevelopment-technology.com/projects/bifeprunox/bifeprunox3.html>.
- 26 EVANS, J.; BARKER, R. Neurotrophic factors as a therapeutic target for Parkinson's disease. **Expert Opin. Ther. Targets**, v. 12, n. 4, p. 437-447, 2008.
- 27 NUTT, J. et al. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. **Neurology**, v. 60, p. 69-73, 2003.
- 28 LANG, A. et al. Randomized Controlled Trial of Intraputamenal Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Infusion in Parkinson Disease. **Ann. Neurol.**, v. 59, p. 459-466, 2006.
- 29 MARKS, W. et al. Safety and tolerability of intraputamenal delivery of CERE-120 (adenovirus serotype 2-neurturin) patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. **The Lancet Neurol.**, v. 7, p. 400-408, 2008.
- 30 SULLIVAN, A.; O'KEEFFE, G. Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease: past, present and future. **Neural Regen. Res.**, v. 11, n. 2, p. 205-207, 2016.
- 31 GONZALEZ-BARRIOS, J. et al. Neurotensin Polyplex as an Efficient Carrier for Delivering the Human GDNF Gene into Nigral Dopamine Neurons of Hemiparkinsonian Rats. **Mol. Ther.** 14: 857-865 p. 2006.

- 32 HERNANDEZ-CHAN, N. et al. Neurotensin-polyplex-mediated brain-derived neurotrophic factor gene delivery into nigral dopamine neurons prevents nigrostriatal degeneration in a rat model of early Parkinson's disease. **J. Biomed. Sci.**, v. 22, 2015.
- 33 NADELLA, R. et al. Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra. **J. Neuroinflam.**, v. 11, n. 209, 2014.
- 34 HYMAN, C. et al. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. **Nature**, v. 350, n. 6315, p. 230-2, 1991.
- 35 KAMPEN, J. V.; ECKMAN, C. Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 27, p. 7272-80, 2006.
- 36 RAZGADO-HERNANDEZ, L. et al. The transfection of BDNF to dopamine neurons potentiates the effect of dopamine D3 receptor agonist recovering the striatal innervation, dendritic spines and motor behavior in an aged rat model of Parkinson's disease. **PLoS One**, v. 10, 2015.
- 37 HOWELLS, D. et al. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. **Exp. Neurol.**, v. 166, n. 1, p. 127-35, 2000.
- 38 PARAIN, K. et al. Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. **Neuroreport**, v. 10, n. 3, p. 557-61, 1999.
- 39 BENISTY, S. et al. trkB messenger RNA expression in normal human brain and in the substantia nigra of parkinsonian patients: an in situ hybridization study. **Neuroscience**, v. 86, n. 3, p. 813-26, 1998.
- 40 BUGNI, J. et al. The neurotensin receptor-1 promotes tumor development in a sporadic but not an inflammation-associated mouse model of colon cancer. **Int. J. Cancer**, v. 130, n. 8, p. 1798-1805, 2012.
- 41 NAJIMI, M. et al. Activation of Receptor Gene Transcription Is Required to Maintain Cell Sensitization after Agonist Exposure. **The J. of Biol. Chem.**, v. 273, n. 34, p. 21634-21641, 1998.
- 42 ALIFANO, M. et al. Neurotensin Receptor 1 Determines the Outcome of Non-Small Cell Lung Cancer. **Clin. Can. Res.**, v. 16, n. 17, p. 4401-4410, 2010.
- 43 DUPOUY, S. et al. The Neurotensin Receptor-1 Pathway Contributes to Human Ductal Breast Cancer Progression. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, p. e4223, 2009.

- 44 OUYANG, Q. et al. Neurotensin promotes the progression of malignant glioma through NTSR1 and impacts the prognosis of glioma patients. **Mol. Cancer**, v. 14, n. 21, 2015.
- 45 DUPOUY, S. et al. The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. **Biochimie**, v. 93, n. 9, p. 1369-1378, 2011.
- 46 WU, Z. et al. Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. **Front. Endocrinol.**, v. 3, n. 184, 2013.
- 47 POUSTIS, C. et al. High-Affinity Neurotensin Binding Sites in Differentiated Neuroblastoma N1E115 Cells. **J. Neurochem.**, v. 42, p. 1094-1100, 1984.
- 48 NAJIMI, M. et al. Transcriptional Regulation of the Tyrosine Hydroxylase Gene by Neurotensin in Human Neuroblastoma. **Met. Brain Dis.**, v. 16, n. 3/4, p. 165-174, 2001.
- 49 SOUAZE, F. et al. Expression of Neurotensin and NT1 Receptor in Human Breast Cancer: A Potential Role in Tumor Progression. **Can. Res.**, v. 66, n. 12, p. 6243-6249, 2006.
- 50 SWIFT, S.; BURNS, J.; MAITLAND, N. Altered Expression of Neurotensin Receptors Is Associated with the Differentiation State of Prostate Cancer. **Can. Res.**, v. 70, n. 1, p. 347-56, 2010.
- 51 GUI, X. Increased neurotensin receptor-1 expression during progression of colonic adenocarcinoma. **Peptides**, v. 29, p. 1609-1615, 2008.
- 52 SOUAZE, F. et al. Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/beta-catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 4, p. 708-716, 2006.
- 53 ALIFANO, M. et al. Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma. **Biochimie**, v. 92, p. 164-170, 2010.
- 54 REUBI, J. et al. Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas. **Int. J. Cancer**, v. 82, p. 213-218, 1999.
- 55 ORGANIZATION, W. H. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. **Media centre**, 2017.
- 56 APM. <http://www.puhuahospital.com/treatments/cancer/breast>. 2017.

- 57 DUARTE, S. et al. Suicide gene therapy in cancer: where do we stand now? **Can. Lett.**, v. 324, n. 2, p. 160-70, 2012.
- 58 MESOTHELIOMA, C. <https://www.asbestos.com/>.
- 59 ZARCO, N. et al. GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway. **Apoptosis**, v. 17, n. 6, p. 627-35, 2012.
- 60 RUBIO-ZAPATA, H. et al. NT-polyplex: a new tool for therapeutic gene delivery to neuroblastoma tumors. **Can. Gene Ther.** 16: 573-584 p. 2009.
- 61 CASTILLO-RODRIGUEZ, R. A. et al. Suicide HSVtk gene delivery by neurotensin-polyplex nanoparticles via the bloodstream and GCV Treatment specifically inhibit the growth of human MDA-MB-231 triple negative breast cancer tumors xenografted in athymic mice. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e97151, 2014
- 62 MAROVAC, J. Investigación y desarrollo: de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. **Rev. med. Chile**, v. 129, n. 1, p. 99-106, 2001.
- 63 YANG, Y. et al. Skin-permeable quaternary nanoparticles with layer-by-layer structure enabling improved gene delivery. **J. Materials Chem.**, v. 22, n. 19, p. 10029-10034, 2012.
- 64 GOLAN, R. et al. DNA Toroids: Stages in Condensation. **Biochem.**, v. 38, p. 14069-14076, 1999.
- 65 ARANGO-RODRIGUEZ, M. L. et al. Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1760, n. 7, p. 1009-20, Jul 2006.
- 66 DANIELSEN S, M. G., STOKKE B. DNA-Polycation Complexation and Polyplex Stability in the Presence of Competing Polyanions. **Biopolymers**, v. 77, p. 86-97, 2005.
- 67 CONWELL, C.; VILFAN, I.; HUD, N. Controlling Size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength. **Proc. Nati. Acad. Sci.**, v. 100, n. 16, p. 9296-9301, 2003.
- 68 MAESTRE, M.; WANG, J. Circular Dichroism of Superhelical DNA. **Biopolymers**, v. 10, p. 1021-1030, 1971.
- 69 BOS, G. et al. Sterilization of poly(dimethylamino)ethyl methacrylate-based gene transfer complexes. **Int. J. Pharmaceutics**, v. 211, p. 79-88, 2000.

- 70 MERKEL, O. et al. Nonviral siRNA Delivery to the Lung: Investigation of PEG-PEI Polyplexes and Their In Vivo Performance. **Mol. Pharm.**, v. 6, n. 4, p. 1246-1260, 2009.
- 71 ANCHORDOQUY, T.; CARPENTER, J.; KROLL, D. Maintenance of Transfection Rates and Physical Characterization of Lipid/DNA Complexes after Freeze-Drying and Rehydration. **Arch. of Biochem. and Biophys.**, v. 348, n. 1, p. 199-206, 1997.
- 72 ANCHORDOQUY, T.; KOE, G. Physical Stability of Nonviral Plasmid-Based Therapeutics. **J. Pharm. Sci.**, v. 89, n. 3, p. 289-296, March 2000 1999.
- 73 PHILLIP, A.; WAGNER, E. Receptor-Targeted Polyplexes for DNA and siRNA Delivery. In: TEMPLETON, N. (Ed.). **Gene and Cell Ther.** 3rd. U.S.: CRC Press, 2009. cap. 15, p.341-355.
- 74 KASPER, J. et al. Development of a lyophilized plasmid/LPEI polyplex formulation with long-term stability - A step closer from promising technology to application. **Jour. Contr. Rel.** 151: 246-255 p. 2011.
- 75 KASPER; PIKAL; FRIESS. Investigations on Polyplex Stability During the Freezing Step of Lyophilization Using Controlled Ice Nucleation—The Importance of Residence Time in the Low-Viscosity Fluid State. **J. Pharm. Sci.** 102: 929-946 p. 2013.
- 76 LTD, M. I. **Zetasizer Nano Series User Manual.** Wocestershire, United Kingdom: Malvern Instruments Ltd 2004.
- 77 CARREON, A. et al. Cationic polythiophenes as responsive DNA-binding polymers. **Polym. Chem.**, v. 5, n. 2, p. 314-317, 2014.
- 78 MENDREK, B. et al. Nonviral Plasmid DNA Carriers Based on N,N'-Dimethylaminoethyl Methacrylate and Di(ethylene glycol) Methyl Ether Methacrylate Star Copolymers. **Biomacromol.**, v. 16, n. 10, p. 3275-3285, 2015.
- 79 VERBAAN, F. et al. The fate of poly(2-dimethyl amino ethyl)methacrylate-based polyplexes after intravenous administration. **Int. J. Pharm.**, v. 214, n. 1-2, p. 99-101, 2001.
- 80 KUNATH, K. et al. Low-molecular-weight polyethyleneimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethyleneimine. **J. Contr. Rel.**, v. 89, n. 1, p. 113-125, 2003.
- 81 ITAKA, K. et al. Polyion complex micelles from plasmid DNA and Poly(ethyleneglycol)-poly(L-lysine) block copolymers as serum-tolerable pollyplex system: physicochemical

- properties of micelles relevant to gene transfection efficiency. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4495-4506, 2003.
- 82 LEE, Y. et al. Charge-Conversion Ternary Polyplex with Endosome Disruption Moiety: A Technique for Efficient and Safe Gene Delivery. **Angewandte Chemie**, v. 120, p. 5241-5244, 2008.
- 83 BOECKLE, S. et al. Purification of polyethyleneimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. **The J. Gene Med.**, v. 6, n. 10, p. 1102-1111, 2004.
- 84 BERTIN, A. Polyelectrolite Complexes of DNA and Polycations as Gene Delivery Vectors. In: MULLER, M. (Ed.). **Polyelectrolite Complexes in the Dispersed and Solid State II**. Germany: Springer, 2014. cap. 4, p.103-196. (Advances in Polymer Science).
- 85 WARE, M.; SUMMERS, H.; GODIN, B. Interactions of Cationic Polymers with Cells. In: SAMAL, S. e DUBRUEL, P. (Ed.). **Cationic Polymers in Regenerative Medicine**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2015. p.479-502.
- 86 FRERE, A. et al. Polymeric Nanoparticles as siRNA Drug Delivery System for Cancer Therapy: The Long Road to Therapeutic Efficiency. In: HOLBAN, A. e GRUMEZESCU, A. (Ed.). **Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting**. United Kingdom: Elsevier, 2016. cap. 18, p.503-532. (Micro and Nano Technologies).
- 87 MARTINEZ-FONG, D.; NAVARRO-QUIROGA, I. Synthesis of a non-viral vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor. **Brain Res. Prot.**, v. 6, n. 1-2, p. 13-24, Nov 2000.
- 88 MARTÍNEZ-FONG, D. et al. Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells. **Mol. Brain Res.**, v. 69, p. 249-262, 1999.
- 89 PARKER, A. et al. Methodologies for Monitoring Nanoparticle Formation by Self-Assembly of DNA with Poly(L-lysine). **Analyt. Biochem.**, v. 302, n. 1, p. 75-80, 2002.
- 90 NAVARRO-QUIROGA, I. et al. Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal. **Mol. Brain Res.**, v. 105, n. 1-2, p. 86-97, Sep 30 2002.
- 91 GOULA D, R. J., ERBACHER P, WAZOWICZ M, LEVI G, ABDALLAH B, DEMENEIX BA. Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. **Gene Ther.**, v. 5, p. 712-717, 1998.
- 92 HARTIKKA, J. et al. Sodium phosphate enhances plasmid DNA expression in vivo. **Gene Ther.**, v. 7, n. 14, p. 1171-82, Jul 2000.

0969-7128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10918485> >.

- ⁹³ ALLISON; ANCHORDOQUY. Mechanisms of Protection of Cationic Lipid-DNA Complexes During Lyophilization. **Jour. Pharm. Sci.** 89: 682-691 p. 2000.
- ⁹⁴ BRUS C, K. E., AIGNER A, CZUBAYKO F AND KISSEL T. Stabilization of oligonucleotide-polyethylenimine complexes by freeze-drying: physicochemical and biological characterization. **J. Contr. Rel.**, v. 95, p. 119-131, 2004.
- ⁹⁵ TANG, M.; SZOKA, F. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. **Gene Ther.**, v. 4, p. 823-832, 1997.
- ⁹⁶ TALSMA, H. et al. Stabilization of gene delivery systems by freeze-drying. **Int J Pharm**, v. 157, n. 2, p. 233-238, Nov 28 1997.
- ⁹⁷ ALLISON, S.; ANCHORDOQUY, T. Lyophilization of Nonviral Gene Delivery Systems. **Meth. Mol. Med.**, v. 65, p. 225-252, 2001.
- ⁹⁸ ALLISON, S. et al. Stabilization of lipid/DNA complexes during freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis. **Biochem. et Biophys. Acta**, v. 1468, p. 127-138, 2000.
- ⁹⁹ ANCHORDOQUY, T.; ARMSTRONG, T.; MOLINA, M. Low Molecular Weight Dextrans Stabilize Nonviral Vectors during Lyophilization at low Osmolality: Concentrating Suspensions by Rehydration to Reduce Volumes. **Jour. of Pharm. Sci.** 94: 1226-1236 p. 2005.
- ¹⁰⁰ SANITARIOS, C. F. P. L. P. C. R. Estabilidad de fármacos y medicamentos. **NOM-073-SSA1-2005**. SALUD, S. D. Estados Unidos Mexicanos: Diario Oficial de la Federación 2005.
- ¹⁰¹ HERNANDEZ, M. et al. Safety of the intravenous administration of neurotensin-polyplex nanoparticles in BALB/c mice. **Nanomed.: Nanotechnol., Biol., and Med.**, v. 10, p. 745-754, 2014.
- ¹⁰² GUO, X.; HUANG, L. Recent Advances in Non-viral Vectors for Gene Delivery. **Acc. Chem. Res.**, v. 45, n. 7, p. 971-979, 2012.
- ¹⁰³ SYMONDS, P. et al. Low and high molecular weight poly(L-lysine)s/poly(L-lysine)-DNA complexes initiate mitochondrial-mediated apoptosis differently. **FEBS Lett.**, v. 579, n. 27, p. 6191-8, 2005.

- 104 QUINTANA-ESQUIVEL, M.; APEZTEGUIA-RODRIGUEZ, I. Las Buenas Prácticas en la Producción de Biológicos y los Sistemas de Gestión de la Calidad. **Rev. Cubana de Farmacia**, v. 44, n. 4, p. 547-557, 2010.
- 105 MARTINEZ, Y. et al. Correlation of in vivo-in vitro potency assays for the Cuban Hepatitis B Vaccine. **Biotechnol. Aplic.**, v. 22, n. 1, p. 34-6, 2005.
- 106 CECMED. Requisitos y procedimientos para la liberación de lotes de productos biológicos. **Regulación 19-2006**. CECMED. La Habana, Cuba: CECMED: 1-10 p. 2006.
- 107 PRAMANICK, S.; CHANDEL, V.; SINGODIA, D. Excipient Selection In Parenteral Formulation Development. **Pharma Times**, v. 45, n. 3, p. 65-77, 2013.
- 108 NETTER, F. et al. Neurophysiology. In: (Ed.). **Atlas of Neuroanat. and Neurophys.** USA: Custom Communications, 2002. cap. 2, p.52-92.
- 109 SIGMA-ALDRICH. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-formulations/dme.html>.
- 110 LIU, G. et al. Biological Properties of Poly-L-lysine-DNA Complexes Generated by Cooperative Binding of the Polycation. **The J. of Biol. Chem.**, v. 276, n. 57, p. 34379-34387, 2001.
- 111 AL-TEREHI, M. et al. Optimization Polyplex Stability in Different Glucose Concentrations. **Int. Jour. ChemTech. Res.** 9: 396-401 p. 2016.
- 112 HUD, N.; VILFAN, I. Toroidal DNA Condensates: Unraveling the Fine Structure and the Role of Nucleation in Determining Size. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 34, p. 295-318, 2005.
- 113 AL-HUSSEIN, A.; GIESELER, H. Investigation of Histidine Stabilizing Effects on LDH during Freeze-Drying. **J. Pharm. Sci.**, v. 102, n. 3, p. 813-826, 2013.
- 114 MEHMOOD, Y.; FAROOQ, U. Excipients Use in Parenteral and Lyophilized Formulation Development. **Op. Scie. Jour. of Pharm. and Pharmacol.**, v. 3, n. 3, p. 19-27, 2015.
- 115 KASPER, J.; KUCHLER, S.; FRIESS, W. **Nanotechnol. for Nucl. Acid Deliv.** Humana Press, 2012.
- 116 CUSACK, B. et al. Developmental regulation of neurotensin receptor expression and function in murine neuroblastoma clone N1E-115. **Eur. J. Pharmacol.** 206: 339-342 p. 1991.

- 117 TOY-MIOU-LEONG, M. et al. Receptor trafficking via the perinuclear recycling compartment accompanied by cell division is necessary for permanent neurotensin cell sensitization and leads to chronic mitogen-activated protein kinase activation. **J. Biol. Chem.** 279: 12636-12646 p. 2004.
- 118 LAEMMLI, U. Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 72, n. 11, p. 4288-4292, 1975.
- 119 ANCHORDOQUY, T. et al. Physical stabilization of DNA-based therapeutics. **Drug Discov. Today**. 6: 463-470 p. 2001.
- 120 CHEN, Y.; YANG, J. A new approach to the calculation of secondary structures of globular proteins by optical rotatory dispersion and circular dichroism. **Biochem. and Biophys. Res. Comm.**, v. 44, n. 6, p. 1285-1291, 1971.
- 121 WHITMORE, L.; WALLACE, B. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, 2008.
- 122 MATHLOUTHI, M.; SEUVRE, A. F.T.-I.R. and laser-raman spectra of D-ribose and 2-deoxy-D-erythro-pentose (2-deoxy-D-ribose). **Carbohydrate Res.**, v. 122, n. 1, p. 31-47, 1983.
- 123 SEUVRE, A. F.T.-I.R. spectra of oligo- and poly-nucleotides. **Carbohydrate Res.**, v. 169, p. 83-103, 1987.
- 124 ARMSTRONG, T.; ANCHORDOQUY, T. Immobilization of Nonviral Vectors during the Freezing Step of Lyophilization. **J. of Pharm. Sci.**, v. 93, p. 2698-2709, 2004.
- 125 DANQUAH, M.; FORDE, G. Growth Medium Selection and its Economic Impact on Plasmid DNA Production. **J. Biosci. and Bioeng.**, v. 104, n. 6, p. 490-497, 2007.
- 126 WANG, Z. et al. Medium design for plasmid DNA production based on stoichiometric model. **Process Biochem.**, v. 36, p. 1085-1093, 2001.
- 127 Guidance for Industry and Reviewers. Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. **Food and Drug Administration**. Rockville 2002.
- 128 CHERNG, J. et al. The effect of formulation parameters on the size of poly-((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid complexes. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 47, p. 215-224, 1999.

- 129 MATON, A. et al. **Human Biology and Health**. New Jersey: Prentice-Hall, 1993.
- 130 KASPER, J.; PIKAL, M.; FRIESS, W. Lyophilization Using Controlled Ice Nucleation - The Importance of Residence Time in the Low-Viscosity Fluid State. **J. Pharm. Sci.**, v. 102, n. 3, p. 929-946, 2013.
- 131 MOLINA, M.; ALLISON, S.; ANCHORDOQUY, T. Maintenance of Nonviral Vector Particle Size during the Freezing Step of the Lyophilization Process is Insufficient for Preservation of Activity: Insight From Other Structural Indicators. **J. of Pharm. Sci.**, v. 90, n. 8, p. 1445-1455, 2001.
- 132 MARTINEZ-FONG, D. et al. NTS-Polyplex: a potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease. **Nanomed.**, v. 8, p. 1052-1069, Mar 7 2012.
- 133 EVERS, B. et al. Characterization of functional neurotensin receptors on human lymphocytes. **Surgery**, v. 116, n. 2, p. 134-9, 1994.
- 134 ANSARI, N.; MOINUDDIN; ALI, R. Physicochemical analysis of poly-L-lysine: An insight into the changes induced in lysine residues of proteins on modification with glucose. **IUBMB Life**, v. 63, n. 1, p. 26-29, 2011.
- 135 RUFO, C. et al. Involvement of a unique carbohydrate-responsive factor in the glucose regulation of rat liver fatty-acid synthase gene transcription. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 24, p. 21969-75, 2001.
- 136 ZUCKERMAN, J. et al. Polycation-siRNA nanoparticles can disassemble at the kidney glomerular basement membrane. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 109, n. 8, p. 3137-3142, 2012.