



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Síntesis y caracterización de vectores no virales para posible uso en terapia  
génica para desórdenes degenerativos**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. EN C. MAGALI ELIZABETH HERNÁNDEZ MORALES

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ENRIQUE JAIME LIMA MUÑOZ

INTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA  
CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Enrique Jaime Lima Muñoz en el laboratorio 121 del edificio E del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM), Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Enrique Jaime Lima Muñoz por su tutoría en el presente proyecto de investigación.

Al Dr. Doctor Jonathan Magaña por brindarme su apoyo en este proyecto.

Al técnico de RMN del IIM, M. en C. Gerardo Cedillo, por su asistencia técnica y su asesoría.

A los miembros del jurado asignado para la revisión de la tesis por sus comentarios y observaciones.

PRESIDENTE	Dr. Ricardo Vera Graziano
VOCAL	Dr. Emilio Bucio Carrillo
VOCAL	Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza
VOCAL	Dr. Sergio Alcalá Alcalá
SECRETARIO	Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig

Finalmente quiero agradecer a CONACyT por brindarme la beca que me permitió estudiar este Doctorado (Número de registro: 443147), además de su aportación para el financiamiento para esta investigación a través del proyecto CONACyT 220436 y a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por ser la institución en la que me he formado.

El presente trabajo fue motivo de una publicación en la revista “BMC Chemistry” [Hernández, 2019].

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BHE	Barrera hematoencefálica
EDC-NHS	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida/N-hidroxisuccinimida
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
miRNA	Micro-RNA
ODN	Oligonucleótidos
PEG	Polietilenglicol
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por el RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
SCA	Ataxia espino cerebelosa
SCA7	Ataxia espino cerebelosa tipo 7
siRNA	RNA pequeño de interferencia
SNC	Sistema nervioso central
CMC	Carboximetilcelulosa
3CMC	Carboximetilcelulosa de bajo peso molecular
3CMC-PEG	Carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol
3CMC-PEG-Lis	Carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol y lisina
3CMC-PEG-His	Carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol e histidina
7CMC	Carboximetilcelulosa de alto peso molecular
7CMC-PEG	Carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol
7CMC-PEG-Lis	Carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol y lisina
7CMC-PEG-His	Carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol e histidina

# ÍNDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>Capítulo I</b>	2
I.1 Introducción	2
I.2 Marco teórico	5
I.3 Justificación	8
I.4 Hipótesis	8
I.5 Objetivo general	9
I.5.1 Objetivos particulares	9
<b>Capítulo II</b>	11
II. Antecedentes	11
II.1 Terapia génica	11
II.1.1 RNA pequeños de interferencia (siRNA)	12
II.2 Nanopartículas	13
II.2.1 Físicoquímica de las nanopartículas	14
II.2.2 Factores que influyen en las nanopartículas para atravesar la barrera hematocefálica (BHE)	17
II.3 Vectores como sistemas liberadores de genes	21
II.3.1 Vectores virales	21
II.3.2 Vectores no virales	22
II.3.3 Criterios para el diseño de vectores para la liberación de genes.	23
II.3.3.1 Barreras extracelulares.	24
II.3.3.2 Empaquetamiento del material genético	24
II.3.3.3 Estabilidad en suero	25
II.3.3.4 Orientación específica de la célula.	26
II.3.3.5 Barreras intracelulares.	27
II.3.3.6 Endocitosis	27
II.3.3.7 Transporte del material genético a través del citoplasma y su liberación	29
II.3.4 Liberación con respuesta a pH	30
II.3.5 Componentes de los vectores no virales	32
II.3.5.1 Lípidos catiónicos y polímeros	32
II.3.5.2 Derivado de la celulosa: carboximetilcelulosa (CMC)	33
II.3.5.3 Aminoácidos	35
II.3.5.3.1 Histidina	36
II.3.5.3.2 Lisina	36
II.3.5.4 Polietilenglicol (PEG)	38
II.3.5.4.1 Estructura y propiedades	38
II.3.5.4.2 Pegilación	38
II.3.5.4.3 PEG oligonucleótidos	41
II.4 Enfermedades neurodegenerativas- Ataxias espino cerebelosas (SCAs)	42
II.4.1 Ataxia espinosa cerebelosa tipo 7 (SCA 7)	44
<b>Capítulo III</b>	45
III. Metodología	45
III.1 Síntesis de los polímeros, 7CMC-PEG y 3CMC-PEG	45
III.2 Síntesis de los polímeros 7CMC-PEG-Lis, 3CMC-PEG-Lis, 7CMC-PEG-His y	47

3CMC-PEG-His	
III.3 Preparación de las nanopartículas	47
III.4 Caracterización	47
III.4.1 Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)	48
III.4.2 Resonancia magnética nuclear en estado sólido de <sup>13</sup> C con giro al ángulo mágico ( <sup>13</sup> C RMN MAS).	48
III.4.3 Análisis termogravimétrico (TGA)	48
III.4.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	48
III.4.5 Tamaño de partícula y del potencial Zeta	48
III.4.6 Dispersión de rayos X a ángulo pequeños (SAXS)	49
III.5 Encapsulación del material genético	49
III.6 Evaluación de la estabilidad de las nanopartículas	50
III.7 Caracterización biológica en células HeLa	50
III.7.1 Evaluación de la viabilidad celular	51
III.7.2 Transfección de los copolímeros cargados con RNA ribosomal a células HeLa	52
III.7.3 Extracción de RNA	52
III.7.4 Tratamiento de RNA con DNAsa	53
III.7.5 Síntesis de cDNA utilizando SuperScript III	53
III.7.6 RT-PCR de GAPDH y ATAXINA	53
III.7.7 Electroforesis en gel	54
III.7.8 Estabilidad de siRNA frente a RNAsa (ribonulceasa)	55
<b>Capítulo IV</b>	56
IV. Resultados y discusión	56
IV.1 Copolímeros carboximetilcelulosa-polietilenglicol funcionalizados con aminoácidos.	56
IV.1.1 Estructura y estabilidad térmica	56
IV.1.2 Morfología de los copolímeros	66
IV.1.3 Viabilidad celular	69
IV.2 Copolímeros cargados con RNA ribosomal	71
IV.2.1 Tamaño de partícula y potencial Zeta	71
IV.2.2 Incorporación del material genético	73
IV.2.3 Estabilidad de los complejos de tamaño nanométrico (copolímero/material genético)	76
IV.2.4 Complejos de tamaño nanométrico (copolímero/material genético) sensibles al pH	77
IV.2.5 Naturaleza del ensamble copolimérico-RNA ribosomal	80
IV.3 Copolímeros cargados con siRNA	81
IV.3.1 Eficiencia de incorporación	81
IV.3.2 Estabilidad de siRNA frente a RNAsa (ribonucleasa)	82
IV.3.3 Evaluación de la expresión del RNA mensajero que codifica para ataxina 7	84
<b>Capítulo V</b>	87
V. Conclusiones	87
<b>Bibliografía</b>	88

---

# Resumen

Como respuesta a la necesidad de crear materiales acarreadores de fármacos y material genético, en este estudio se desarrolló un nuevo material polimérico, constituido de carboximetilcelulosa (CMC), polietilenglicol (PEG) y aminoácidos para formar complejos estables con siRNA (RNA pequeño de interferencia) y RNA ribosomal. Los copolímeros se caracterizaron por espectroscopias de infrarrojo y resonancia magnética nuclear, así como por análisis térmico, dispersión de rayos X y microscopía electrónica de barrido.

Los resultados mostraron que mediante la reacción de EDC-NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida/N-hidroxisuccinimida), los polímeros de carboximetilcelulosa se funcionalizaron con polietilenglicol y aminoácidos a través de enlaces tipo éster y amida respectivamente, mostrando propiedades térmicas y morfológicas diferentes como una función de la composición química de los copolímeros.

La incorporación de RNA ribosomal y siRNA está determinada por el tipo de aminoácido presente en el copolímero, siendo los copolímeros con lisina los más susceptibles a adsorber material genético. Se obtuvieron copolímeros nanométricos esféricos entre 15-18 nm que mostraron respuesta a cambios de pH, esto como consecuencia de la presencia de grupos ionizables y una carga eléctrica en la superficie del complejo copolímero-material genético, determinado por el tipo de aminoácido y el peso molecular de la carboximetilcelulosa. Los resultados obtenidos sugieren que los copolímeros son buenos candidatos como acarreadores de siRNA.

---

# Capítulo I

## I.1 Introducción

En los últimos años se han desarrollado nanopartículas como acarreadoras de fármacos y material genético con el fin de liberar el fármaco o gen en células blanco, donde antes era difícil de acceder. Actualmente, la ciencia de materiales ha hecho posible dirigir las nanopartículas a órganos específicos, para ello se puede manipular la composición elemental, carga, tamaño y función química de las nanopartículas.

En particular se tiene interés en la elaboración de acarreadores de material genético con posible aplicación en enfermedades neurodegenerativas, ya que actualmente no hay tratamientos eficaces para combatirlas, ante esta problemática la terapia génica surge debido a la necesidad de encontrar nuevos tratamientos terapéuticos efectivos.

La terapia génica se considera como una nueva forma de medicina molecular que tiene como objetivo curar o controlar enfermedades a través de la liberación de ácidos nucleicos al sitio de acción. Es una poderosa herramienta para curar deficiencias genéticas o enfermedades que actualmente no tienen cura. Esto incluye una serie de enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, Esclerosis lateral amiotrófica, Parkinson, Ataxias cerebelo espinosas), infecciones virales y cáncer.

El suministro de RNA terapéutico (siRNA, ribozimas y mRNA (micro-RNA)) o DNA (plásmidos de DNA y oligonucleótidos) ha estado limitado por una serie de factores ya que el RNA desnudo es degradado por nucleasas, activa el sistema inmunitario y la naturaleza negativa del RNA (debido a los grupos fosfatos del RNA) no permite atravesar pasivamente la membrana celular, ya que esta debe ingresar a la célula y posteriormente debe escapar del endosoma.

El material genético que se requiere administrar requiere encapsulación, protección y estabilidad en portadores nanométricos mediante el uso de vectores virales (por ejemplo: adenovirus y el virus del herpes simple) o no virales (por ejemplo: polímeros y liposomas)

---

que permiten la administración intracelular eficiente. Se ha tenido mayor interés en el uso de vectores no virales debido a la baja inmunogenicidad con respecto al vector viral. Se han utilizado diversos vectores no virales, como los polímeros catiónicos (polilisina y poliamidoamina), esto con la finalidad de estabilizar electrostáticamente el RNA o DNA con carga negativa, sin embargo, el exceso de componentes catiónicos en el polímero causa reacciones adversas, como la agregación plaquetaria y reacciones inflamatorias. También se ha propuesto el uso de dendrímeros, nanopartículas de oro, puntos cuánticos y liposomas, pero estos sistemas aún muestran desventajas como baja capacidad de transfección a la célula blanco, algunos presentan toxicidad y falta de especificidad, etc. Es por ello que es necesario mejorar estos materiales debido a las desventajas que presenta, así como el desarrollo de nuevos materiales para evadir barreras extracelulares e intracelulares que logren el suministro de genes en células específicas. Es importante considerar la protección del material genético, la facilidad de fabricación, capacidad de direccionamiento a células específicas, síntesis económica, fácil purificación, estabilidad, internalización, escape endosomal, liberación eficiente, no tóxico y no inmunogénico.

Dado su alto grado de flexibilidad química, los polímeros son materiales de uso común para la entrega basada en nanopartículas. Los polisacáridos se utilizan para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas debido a su biocompatibilidad, y al no ser inmunogénico. Actualmente, existe un interés creciente en la aplicación de estos polímeros para el desarrollo de medicinas a escala nanométrica. En este sentido, la carboximetilcelulosa es un derivado de la celulosa utilizada en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos debido a su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja inmunogenicidad, y químicamente es fácil de funcionalizar debido a la disponibilidad de diversos grupos funcionales en las unidades glicosídicas (hidroxilos, ácidos carboxílicos).

Además, la funcionalización de estos polímeros con polietilenglicol proporciona protección contra la adsorción por monocitos humanos, prolonga el tiempo de circulación de las nanopartículas en el torrente sanguíneo y evita la activación del sistema inmunológico.

Los acarreadores de tamaño nanométrico que transportan ácido nucleico, generalmente son internalizados a las células a través de endocitosis, sin embargo, deben escapar del endosoma hacia el citoplasma celular para evitar la degradación del ácido nucleico y liberarlo.

---

Se han utilizado varias estrategias para mejorar el escape endosomal, por ejemplo la incorporación de grupos ionizables en los polímeros o lípidos para generar un efecto de esponja de protones dentro de los endosomas que lo lleve a la ruptura de la membrana del endosoma y la liberación del material genético. Además, la incorporación de estos grupos ionizables, como los aminoácidos, ayudarían a estabilizar las cargas negativas del material genético a través de interacciones electrostáticas.

En este estudio, los copolímeros carboximetilcelulosa-polietilenglicol se prepararon y se funcionalizaron con histidina y lisina a través de la reacción de EDC-NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisuccinimida) para evaluarlos como acarreadores de RNA ribosomal y siRNA.

Primero, los copolímeros se cargaron con RNA ribosomal para analizar la capacidad de estos copolímeros como posibles candidatos para transportar material genético y estabilizar la carga negativa del RNA ribosomal. Los copolímeros posteriormente se cargaron con siRNA para evaluar la capacidad de los copolímeros como acarreador de material genético hacia células HeLa y para determinar si los copolímeros protegen siRNA de la degradación por nucleasas.

El siRNA utilizado está diseñado para inhibir la expresión de ataxina 7 (relacionado con la enfermedad de ataxia cerebelo espinosa tipo 7 (SCA7), la cual se trata de una enfermedad neurodegenerativa, caracterizada por la pérdida de control de los movimientos voluntarios del cuerpo, pérdida de la visión y pérdida de la coordinación motora provocada por la degeneración de las neuronas en la corteza cerebelosa y de alteraciones en el tallo encefálico principalmente. Actualmente no existe un tratamiento farmacológico curativo, sin embargo, se usan tratamientos de apoyo para disminuir las sintomatologías (rehabilitación motora, uso de fármacos para disminuir los agregados proteicos causantes de la degeneración, disminuir temblores, etc). Lamentablemente, los tratamientos no tienen éxito lo que conduce a la muerte de pacientes o pérdida de la vista en el caso particular de este tipo de ataxia (SCA7). Sin embargo, la terapia génica se ha convertido en un tratamiento alternativo prometedor para tratar este tipo de enfermedades neurológicas como el uso de herramientas moleculares como el siRNA.

---

## I.2 Marco teórico

Las ataxias cerebelosas (SCAs) conforman un grupo de enfermedades neurodegenerativas, que son una consecuencia de la degeneración gradual del cerebelo y de alteraciones en el tallo encefálico. Dentro de los trastornos neurodegenerativos, las ataxias cerebelosas, según la OMS, son las de mayor incidencia a nivel mundial junto con la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, Alzheimer y la corea de Huntington.

A la fecha se han identificado 43 variedades de SCAs. La SCA7 es particularmente una de las de mayor incidencia en México, con una prevalencia de 817/100000 habitantes, y que se concentra regionalmente en cinco comunidades del estado de Veracruz, sobresaliendo la comunidad Tlaltetela. La prevalencia a nivel mundial es tan solo de 1/100000 [1-2]

Desafortunadamente, hasta hoy no hay un tratamiento eficaz para combatir trastornos neurodegenerativos, ya que los agentes terapéuticos utilizados presentan baja estabilidad, baja compatibilidad, además de que están limitados por la barrera hematoencefálica (BHE). Específicamente en las SCAs, no se cuenta con una terapia eficaz y mucho menos una terapia específica para cada variante de SCA. Los síntomas más comunes para las SCAs son los problemas de coordinación y equilibrio, sin embargo, en la actualidad solo se recomienda fisioterapia (para ayudar a la movilidad, mejorar el habla y para llevar a cabo tareas de la vida diaria) o el uso de medicamentos para disminuir el temblor, rigidez, fatiga, dolor, mareo, trastorno del sueño y espasmos musculares. La terapia de quelación ha sido considerada como tratamiento potencial para retardar la progresión de las afecciones que produce la SCA. Esto puede ir acompañado del uso de fármacos para disminuir los agregados proteicos que se forman a consecuencia del plegamiento [3-4]. Uno de los medicamentos que se utilizan es el clorhidrato de buspirona el cual ha demostrado una regresión parcial del cuadro clínico [5].

Lamentablemente, muchas estrategias neuroterapéuticas no tienen éxito en el tratamiento lo cual se traduce en la muerte de pacientes, dependiendo de la severidad de la mutación.

No obstante, la terapia génica se ha convertido en un tratamiento prometedor como el uso de herramientas moleculares como el siRNA (RNA pequeño de interferencia) para tratar diversas enfermedades como cáncer y padecimientos neurodegenerativos [6-7]. Sin embargo requiere de acarreadores que pueden entregar el material genético a su sitio de

acción y logre tener un efecto farmacológico efectivo. Los vectores virales (ejemplo, adenovirus, virus de herpes simple) y los vectores no virales (ejemplo, polímeros y liposomas) son dos categorías principales de sistemas de administración para material genético [8]. Se ha tenido mayor interés en el uso de vectores no virales debido a la baja inmunogenicidad además de que la síntesis de vectores no virales a escala industrial ofrece ventajas sobre los vectores virales. Dentro de los vectores no virales se han utilizado péptidos, polímeros, lípidos, nanopartículas de oro, etc [9-12].

Actualmente, la administración de material genético enfocada a enfermedades neurodegenerativas es un reto ambicioso debido a que los acarreadores de material genético necesitan formar un complejo estable con la carga negativa de este para protegerla de la degradación por enzimas durante la circulación en el torrente sanguíneo, las nanopartículas cargadas con material genético necesitan evadir la respuesta inmunológica, requieren llegar al sitio de acción y atravesar la barrera hematoencefálica [13].

En la Tabla 1 se resumen los casos más representativos de acarreadores de material genético enfocados a enfermedades neurodegenerativas.

**Tabla 1.** Ejemplos de vectores virales y no virales para la liberación de material genético y su actividad terapéutica en modelos celulares o animales enfocados en enfermedades neurodegenerativas

Enfermedad /Modelo	Ácido nucleico terapéutico	Vector virales y no virales	Actividad terapéutica
Alzheimer/ Modelo en ratón APP (proteína precursora de amiloide) [14]	DNA que codifica neprilisin	Virus del herpes simple	Reduce la producción de amiloides y reduce su acumulación
Parkinson/ modelo en rata inducida con 6-OHDA (6-hidroxidopamina) [15]	DNA que codifica para tirosina hidroxilasa	Virus del herpes simple	Reversión del deterioro motor
Esclerosis lateral amiotrófica/ Modelo en ratón con SOD1 (superóxido dismutasa 1) [16]	DNA que codifica para insulina y factor de crecimiento 1	Inmunoliposomas con PEG	Mejora el rendimiento motor y prolonga el tiempo de supervivencia
Ataxia cerebello espinosa tipo 1 (SCA 1)/ modelo de ratón inducido con SCA 1[17]	DNA que codifica contra la mutante de ataxina 1	Adenovirus	Reduce las inclusiones de ataxina y mejora la condición motora

Ataxia cerebelo espinosa (SCA7) / Retina de ratón inducida con SCA7[18]	DNA que codifica contra la mutante de ataxina 1	Adenovirus	Se preserva la función normal de la retina. Reduce la expresión de la proteína ataxina 7
Ataxia cerebelo espinosa (SCA7) / cultivo de células HEK293 (células embrionarias de riñón humano) [19]	DNA que codifica para shRNA contra ataxina 7	psiCHECK (Plasmido modificado con un gen de la renilla luciferasa)	Reducción de los agregados proteicos y reduce la expresión de la proteína ataxina 7
Parkinson/ratones inducidos con Thy1-aSyn (promotor del gen Thy1- alfa sinucleína) [20]	siRNA contra sinucleína	Nanopartículas de polietilenimina.	Reducción del 50% de la proteína sinucleína, los endoteliales y la parénquima cerebral se conservan sanas, y no mostraron toxicidad
Alzheimer/ células de neuroblastoma de ratón [21]	siRNA contra $\beta$ -secretasa y proteína precursora de amiloide	Nanopartículas micelares a base de polietilenimina y polietilenglicol	Reducción de $\beta$ -secretasa y de la proteína precursora de amiloide en un 63.3 y 75.6% respectivamente
Posible uso en la enfermedad de Huntington / cultivo celular de neuronas corticales (línea celular PC12) [22]	siRNA contra la proteína huntingtina	Hidrotalcita ( $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$ )	El complejo siRNA-hidrotalcita se internaliza a las células neuronales, se libera el siRNA de manera eficiente en el citoplasma y reduce la expresión de la proteína
Posible uso en enfermedades neurodegenerativas/ Modelo de barrera hematoencefálica (células endoteliales cerebrales) [23]	siRNA contra p-glicoproteína	Quitosano	Silenciamiento del gen p-glicoproteína, favoreciendo el ingreso y la liberación de doxorubicina (usado como modelo de fármaco)

A pesar de la importancia de las SCAs, los estudios son escasos y en México prácticamente nulos, a pesar de su alta incidencia regional. Los pocos estudios sobre SCA7 se concentran en el uso de vectores virales, es por ellos que es importante desarrollar nuevos vectores no virales que transporten material genético y que tenga posible aplicación a SCA7, SCAs u otras enfermedades neurodegenerativas. Así, el presente trabajo de tesis parte con el objetivo de contribuir en el campo de los vectores eficientes para liberación de material genético.

---

### **I.3 Justificación**

El RNA pequeño de interferencia ha sido ampliamente estudiado en el campo de la terapia génica. Es una herramienta potencial que promete aplicaciones clínicas como agente terapéutico debido a su capacidad de silenciar la expresión de genes y por lo tanto regula la expresión de proteínas causantes de la enfermedad, sin embargo la aplicación de siRNA en tratamiento clínico es limitado debido a su degradación por nucleasas endógenas, su baja permeabilidad en la membrana celular y la falta de especificidad. Esto conduce a una baja biodisponibilidad *in vivo*. Para resolver esto se plantea desarrollar sistemas de transporte de siRNA, que sean seguros y efectivos. Este tipo de vectores son de tipo viral y no viral, sin embargo se ha puesto más atención en los no virales para evitar respuestas inmunes por parte del organismo. Entre los vectores no virales más utilizados incluyen a los polímeros, líposomas, dendrímeros y ciclodextrinas, sin embargo, todavía hay muchos factores que influyen la estabilidad, destino y especificidad de siRNA cargado en los diferentes vectores debido a las diferentes propiedades fisicoquímicas de los vectores frente a degradación por enzimas endógenas, penetración de la membrana celular, escape endosomal, biocompatibilidad, y citotoxicidad. Así, existe la necesidad de desarrollar vectores no virales multifuncionales que permitan, habilitar selectividad hacia células blanco, estabilidad de siRNA, internalización a la célula y liberación. Por esto se propone la síntesis de vectores multifuncionales a base de carboximetilcelulosa la cual no se ha estudiado en la liberación de siRNA, pero es un candidato excelente al ser biocompatible, biodegradable, usado ya en farmacia, además de su bajo costo de producción.

El desarrollo de este tipo de vectores ayudaría a contribuir en el campo de la terapia génica.

### **I.4 Hipótesis**

Es posible estabilizar las cargas negativas del material genético en nanopartículas poliméricas e laboradas con aminoácidos, polietilenglicol y carboximetilcelulosa y se podrán obtener sistemas nanoparticulados que funcionen como acarreadores de material genético con potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

---

La incorporación de aminoácidos a los copolímeros permitirá estabilizar las cargas negativas del material genético y mostrarán respuesta a cambios de pH, facilitando la liberación de material genético.

## **I.5 Objetivo general**

Sintetizar y caracterizar estructural, fisicoquímica y biológicamente nuevos vectores no virales a base de carboximetilcelulosa, polietilenglicol y aminoácidos que formen complejos estables y que funcionen como acarreadores de material genético, buscando que presenten baja citotoxicidad en un modelo celular de HeLa para posible uso en terapia génica para padecimientos neurodegenerativos.

### **I.5.1 Objetivos particulares**

- Sintetizar y caracterizar matrices orgánicas de tipo copolímeros compuestos de carboximetilcelulosa y polietilenglicol, seguido de una funcionalización con aminoácidos catiónicos (lisina e histidina) para formar complejos sensibles a pH y estables con el material genético.
- Evaluar la capacidad de los copolímeros como agentes acarreadores de material genético bajo diferentes condiciones para corroborar la respuesta a cambios de pH.
- Incorporar RNA ribosomal en los vectores no virales para formar complejos estables y evaluar la capacidad de copolímero como acarreador de material genético.
- Incorporar siRNA en los vectores no virales para formar complejos estables y evaluar su efecto sobre la expresión del RNA mensajero de ataxina 7 (relacionado con la enfermedad de ataxina cerebelo espinosa tipo 7 (SCA7)) cuando se transporta a células HeLa y determinar el efecto de los copolímeros en la viabilidad celular de estos cultivos.
- Analizar la estabilidad biológica de los sistemas RNA-vectores a fin de conocer su susceptibilidad a la degradación.

---

-Evaluar la expresión del RNA mensajero de ataxina 7, esto dara informacion de que los copolimeros funcionan como acarreadores de material génético (siRNA) a células HeLa y que ejercen su efeto sobre este.

---

# Capítulo II

## II. Antecedentes

### II.1 Terapia génica

La terapia génica hace uso de ácidos nucleicos (DNA (ácido desoxirribonucleico) y RNA (ácido ribonucleico)) para reparar, reemplazar o regular los genes para prevenir o tratar enfermedades. Cientos de genes se han investigado como candidatos en terapia génica y para ello se han utilizado varias herramientas moleculares, como, moléculas grandes de DNA (plásmidos de DNA; pDNA), moléculas pequeñas de DNA (oligonucleótidos; ODN) y RNA (ribozimas, siRNA y miRNA)

Para decidir si la terapia génica es adecuada para el tratamiento de una enfermedad, primero debe conocerse la enfermedad e identificar el gen o genes mutados, comprender la biología de la enfermedad, duración, localización, distribución, et c. También es importante definir el sistema de transferencia génica adecuada para el tipo de enfermedad, es decir, la forma en el que el gen será transportado [24].

El sistema nervioso central (SNC) es el sistema más complejo del cuerpo humano, caracterizado por su plasticidad y flexibilidad. Se ha estimado que las funciones del SNC requieren la expresión de aproximadamente el 60% de todos los genes de nuestro genoma [25]. Sin embargo, esta complejidad expone al SNC a una serie de enfermedades diferentes, a menudo causadas por pequeñas variaciones en la secuencia de genes o el nivel de expresión. Se ha reportado que muchos genes se expresan selectivamente en enfermedades cerebrales, por ejemplo, aproximadamente el 99% de los genes que se expresan únicamente en el cáncer cerebral son genes de función desconocida [26]. Los oligonucleótidos antisentido y el siRNA pueden considerarse como dos tipos diferentes de estrategias anti-RNA (anti-RNA mensajero), ya que ambos actúan sobre el RNA para prevenir su traducción en proteínas. Las terapias mediadas por interferencia de oligonucleótidos antisentido y el siRNA son muy prometedoras para el tratamiento de enfermedades del SNC en las que la neurodegeneración está relacionada con la

---

sobreproducción de proteínas endógenas. Además los oligonucleótidos antisentido y el pequeño RNA interferente deben poder cruzar tanto la barrera hematoencefálica (BHE) como la membrana de la célula cerebral para alcanzar e hibridar con el RNA objetivo. Sin embargo, se degradan rápidamente en condiciones fisiológicas por nucleasas, principalmente exonucleasas [27].

### **II.1.1 RNA pequeños de interferencia (siRNA)**

Desde el descubrimiento del RNA de interferencia o RNA de silenciamiento (siRNA) por Fire et al., en 1998 [28], se ha convertido en una tecnología prometedora para tratar diversas enfermedades como el cáncer, padecimientos neurodegenerativos, entre otras. Los siRNA surgen como un proceso natural de regulación de la expresión de genes a nivel post-transcripcional en eucariotes y como una potente herramienta para el “silenciamiento” artificial de genes que están involucrados en el desarrollo de alguna patología. [29-30].

El siRNA es una molécula sintética de doble cadena con aproximadamente 21 pares de nucleótidos, de los cuales, 2 se encuentran desapareados en cada extremo 3'. Cada hebra de RNAi tiene un grupo fosfato 5' (naturaleza negativa) y un grupo hidroxilo (-OH) 3' [31]. Una vez que el siRNA ingresa a la célula, es reconocido por el complejo multiproteico RISC (complejo de silenciamiento inducido por el RNA), en donde la hebra antisentido del siRNA se usa como molde para el reconocimiento del RNA mensajero que se degradara. Finalmente, el complejo RISC cataliza el corte del RNA complementario en dos mitades, que posteriormente serán degradadas, bloqueando así la expresión de éste. Todo este proceso se lleva a cabo en el citoplasma [32].

Debido a que el tamaño del siRNA es mucho más pequeño en comparación con el RNA de tamaño completo, el siRNA puede sintetizarse a costos relativamente bajos. La alta especificidad de siRNA y el bajo costo sintético le dan a la terapia génica un gran potencial para una variedad de aplicaciones [33]. Sin embargo, siRNA es una molécula con carga negativa, y resulta ser muy inestable en el torrente sanguíneo ya que es incapaz de penetrar las membranas celulares, es degradado por nucleasas y puede ser inmunogénico [34], es por ello que no se puede administrar el siRNA desnudo en medios biológicos. Un método

de administración segura y eficiente es crucial para darse cuenta del amplio potencial de las terapias basadas en siRNA. Tanto los vectores virales como los no virales pueden usarse como vía de administración. Los vectores no virales, especialmente las nanopartículas, son menos costosas de producir y conllevan a un menor riesgo de provocar una respuesta inmunológica en comparación con los vectores virales. El ácido nucleico requiere su encapsulación, protección y estabilidad en portadores nanométricos mediante el uso de vectores no virales que permiten la administración intracelular eficiente [35]. En la sección II.3 se aborda más sobre estos vectores que funcionan como transportadores de material genético. En la siguiente tabla 2 se muestran algunos ejemplos representativos que tienen el siRNA en terapia génica.

**Tabla 2.** Algunos ejemplos de los diferentes usos del siRNA en terapia génica.

<b>Vectores no virales</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Sitio de acción del siRNA</b>
Quitosano [36]	Cáncer	VEGF ( factor de crecimiento endotelial vascular )
Polietilenglicol [37]	Infección hepática causado por el virus de Hepatitis B	Virus de la hepatitis B
Dendrímeros [38]	Cáncer	TNF- $\alpha$ ( factor de necrosis tumoral)
Nanopartículas de oro [39]	Cáncer	VEGF ( factor de crecimiento endotelial vascular )
Polietilenimina [40]	Enfermedad intestinal inflamatoria	TNF- $\alpha$ ( factor de necrosis tumoral)
Quantum dots [41]	Enfermedades neurodegenerativas	BACE1 ( $\beta$ -secretasa 1)

## II.2 Nanopartículas

Las nanopartículas, desde el punto de vista médico, se definen como partículas coloidales sólidas en el rango de tamaño de 1 a 100 nm; constituidas por materiales macromoleculares, en las cuales el principio activo se puede encontrar disuelto o encapsulado de forma adsorbida o enlazada químicamente. Las nanopartículas ofrecen la posibilidad de una liberación controlada del fármaco, enmascaran las propiedades

---

fisicoquímicas de éste y, por tanto, reducen su toxicidad; de igual forma, aumentan la biodisponibilidad e incrementan la biodistribución y eficacia terapéutica [42-44]. En función del medicamento a incorporar y su vía de administración se elige la síntesis de estas nanopartículas. Las vías de síntesis más frecuentes incluyen la homogeneización a alta presión, microemulsiones, emulsificación y evaporación del disolvente o por difusión, el método de doble emulsión de agua-aceite-agua, agitación a gran velocidad y ultrasonido. En general, se busca que el material sea biocompatible, biodegradable y accesible [45].

Las nanopartículas pueden tener un origen natural o sintético y pueden variar de 1 a 1000 nm. Las nanopartículas sintéticas se pueden preparar a partir de materiales poliméricos como poli (alquiloacrilatos), dendrímeros de poli (amidoamina), poli (ε-caprolactona), poliésteres o materiales inorgánicos como el oro, dióxido de silicio, entre otros.

Por otro lado, las nanopartículas de origen natural se producen a partir de polímeros naturales, como polisacáridos (quitosán y alginato), aminoácidos poli (lisina), poli (ácido aspártico) o proteínas (gelatina y albúmina). Las nanopartículas naturales tienen la ventaja de ser biocompatibles, además de que las moléculas biológicas pueden interactuar con receptores o transportadores específicos que se encuentran en la célula [46-47].

### **II.2.1 Fisicoquímica de las nanopartículas**

En los últimos años se ha mantenido el interés en el desarrollo de nanopartículas biodegradables para utilizarlas como sistemas de transporte de fármacos y genes [48-52]. Se han formulado nanopartículas utilizando polímeros biodegradables en los que un agente terapéutico puede atraparse y ser adsorbido o acoplarse químicamente, el tamaño de estas nanopartículas varía en tamaño desde 10 a 1000 nm de diámetro [53-54].

Las ventajas de usar nanopartículas como acarreadores de fármacos pueden agruparse en las siguientes: 1) las nanopartículas pueden penetrar a través de capilares pequeños, favoreciendo una acumulación eficiente del fármaco en el sitio de interés [55-56]. 2) el uso de materiales biodegradables en la preparación de nanopartículas podría permitir una liberación sostenida del fármaco durante un período más largo (días o semanas) [56-58], y 3) la superficie de las nanopartículas se pueden modificar para alterar la biodistribución de

---

los medicamentos o se pueden funcionalizar con un ligando para lograr que el suministro de fármacos sea específico [59-60]. Varios factores pueden influir en las propiedades físicas y biológicas de las nanopartículas, como el uso de un emulsionante para la estabilización de las nanopartículas, el material polimérico, su composición, o la adsorción de ciertos polímeros o moléculas biológicas [61].

El tamaño es un aspecto crucial para la administración de genes en el torrente sanguíneo y la captación celular [62]. De manera general, las partículas con un diámetro inferior a 5-12 nm extravasa en el capilar fenestrado [63] y las partículas más grandes [ $> 1 \mu\text{m}$ ] se opsonizan rápidamente y se acumulan en el hígado y el bazo, además pueden mostrar agregación y oclusión capilar [26]. A nivel celular, las membranas evitan el paso de partículas y moléculas mayores de 1 Da, los poros nucleares son alrededor de 10-25 nm, las vesículas intracelulares comunes (p. Ej., Endosomas) tienen un diámetro de 60-120 nm, pero hay vesículas más grandes para macropinocitosis y fagocitosis (más de  $1 \mu\text{m}$ ). Uno de los requisitos para aplicaciones *in vivo* está comprendido entre 25 nm y 100 nm [64-65]. Las nanopartículas muestran una mayor capacidad de internalización celular que las micropartículas [61-64], con un tiempo de circulación prolongado [67].

Está reportado que los nanotransportadores con características químicas equivalentes y topología distinta muestran importantes diferencias en la biodistribución, absorción celular y toxicidad [68]. El efecto de la forma en la biodistribución se estudió ampliamente con modelos teóricos y experimentales, donde se demostró que la forma discoidal muestra un alto grado de adhesión en células endoteliales con respecto a las nanopartículas esféricas [69-73]. También se ha reportado que las filomicelas (micelas alargadas con morfología similar a los gusanos) prolongan el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo hasta tres veces más que las nanopartículas esféricas con la misma composición química [74].

El potencial Zeta es una medida de la carga superficial y brinda información de la estabilidad de las partículas, así como de su capacidad de interacción celular [57]. Los valores de potencial Zeta (positivos o negativos) se alteran al modificar la superficie de la nanopartícula o con el uso de un agente estabilizador (emulsificantes). En este sentido, se

---

ha reportado que el potencial Zeta de nanopartículas funcionalizadas con PLGA (ácido glicólico-poliláctico), es aproximadamente de -45 mV [75], que se atribuye a los grupos carboxilo en este polímero. En cambio, si las nanopartículas se funcionalizan con PVA (acetato de polivinilo), el valor de potencial Z es de -6 a -10 mV [61], como consecuencia de que el emulsificante enmascara los grupos de la superficie de la nanopartícula a diferencia del PLGA.

El aumento del PVA afecta el potencial Zeta de las nanopartículas, especialmente con el pH del medio. La formulación preparada con una mayor cantidad de PVA demostró una carga menos positiva en el pH ácido o una carga menos negativa en el pH básico. La inversión de la carga superficial de las nanopartículas de negativo en pH neutro o básico a positivo en pH ácido se puede atribuir a la transferencia de protones de la solución a su superficie [76-77].

Se ha reportado una inversión de carga similar con el cambio en el pH de las nanopartículas de poliestireno con grupos funcionales carboxilo en la superficie y se atribuyó a una carga positiva adquirida por enlaces de hidrógeno de iones hidronio a grupos carboxílicos [75]. El recubrimiento de nanopartículas con algunos polímeros anfífilicos normalmente disminuye el potencial Zeta por que las capas de recubrimiento protegen la carga superficial [78]. Redhead et al. [79] han reportado una reducción similar en los potenciales zeta de las nanopartículas de PLGA luego de su recubrimiento con polímeros anfífilicos como el poloxámero 407 y la poloxamina 908.

La captación intracelular de las nanopartículas puede alterarse por varios factores: el tamaño de las partículas, la naturaleza de la superficie, la hidrofiliidad y el potencial Zeta. Se ha reportado que nanopartículas con tamaños mayores a 100 nm y menores a 100 nm tienen diferentes niveles de expresión génica.

La interfase de las nanopartículas entra en contacto directo con la superficie de la célula es por ello que las características fisicoquímicas de interfase influirán en la captación celular, así como en la expresión génica. Se ha reportado en diferentes sistemas tipo poliplex (material genético-polímero) y lipoplex (material genético-lípidos), que la transfección

---

génica es mejor cuando se tiene un menor tamaño de partícula respecto a las nanopartículas de mayor tamaño [80].

Se ha demostrado que algunos polímeros como el PVA influyen en la absorción celular de las nanopartículas. Por ejemplo, la captación celular de nanopartículas en células musculares formuladas con PVA al 0.5% fue aproximadamente tres veces más alta que la captación celular de nanopartículas formuladas con 5% de PVA.

Se ha atribuido una reducción en la absorción celular de las nanopartículas con un aumento de PVA, ya que aumenta su hidrofiliidad [61].

Debido a que éste trabajo está enfocado en la síntesis de un nuevo acarreador de material genético con posible uso en enfermedades neurodegenerativas, es importante hablar de los factores que influyen en las nanopartículas para que logren atravesar la barrera hematoencefálica (BHE).

## **II.2.2 Factores que influyen en las nanopartículas para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE)**

Se han desarrollado o adaptado estrategias nuevas para el tratamiento de enfermedades cerebrales. Esto representa uno de los mercados más desafiantes y costosos para las compañías farmacéuticas. Durante el proceso de desarrollo y descubrimiento de nuevos compuestos dirigidos para el sistema nervioso central, pueden ascender a 100 millones de dólares en los ensayos clínicos de la fase I y alrededor de mil millones de dólares antes de llegar al consumidor [81]. Es por ello que es de suma importancia tener un avance eficaz en la fase de desarrollo, aunque en los últimos años, solo el 3 - 5% de los productos farmacéuticos dirigidos al cerebro han llegado al mercado, ya que la mayoría de ellos eran incapaces de cruzar la BHE *in vivo* [82]. Actualmente, los avances en el campo de la nanomedicina con el uso de nanopartículas han generado varias plataformas que mejoran el transporte de medicamentos a través de la BHE [83-86].

La BHE, es una barrera membranosas, altamente especializada, que consta de vasos formados por células endoteliales, conectadas por uniones estrechas y rodeadas por los pies de los astrocitos. La BHE impide el paso de ciertas sustancias al intersticio cerebral con

---

criterio selectivo. Por lo tanto, la liberación de agentes terapéuticos al cerebro es un reto, a pesar de que hay un flujo sanguíneo relativamente alto en la zona. Además, existe la posibilidad de que los fármacos sean susceptibles a metabolizarse o a provocar efectos tóxicos en las células [87].

Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas determinan cuál es el mecanismo para atravesar la BHE. Se han descrito los siguientes mecanismos de transporte: 1] Las nanopartículas abren la unión estrecha entre células endoteliales o inducen efectos tóxicos locales que conducen a una permeabilización localizada de la BHE, permitiendo la penetración del fármaco en forma libre o conjugada [88-89]; 2] Las nanopartículas pasan a través de las células endoteliales por transcitosis [90]; 3] Las nanopartículas se acarrean a través de las células endoteliales mediante endocitosis y su contenido se libera en el citoplasma celular para después ser exocitado en el lado luminal del endotelio [91]; 4] una combinación de varios de los tres mecanismos anteriores. Los mecanismos 2, 3 y 4 son los principales mecanismos de transporte de las nanopartículas reportados.

Las nanopartículas son sistemas prometedores para la administración de fármacos o genes hacia el cerebro debido a la posibilidad de modularlos en términos de forma, tamaño, hidrofobicidad, recubrimiento químico y cargas superficiales. El control sobre estas características puede mejorar la capacidad de las nanopartículas para mejorar la estabilidad del agente terapéutico en circulación, controlar la liberación de carga en el sitio deseado, mejorar la eficiencia de penetración de la BHE y escapar del sistema retículo endotelial [92].

Está muy bien fundamentado que existe una correlación entre el tamaño de las nanopartículas y la permeabilidad de BHE. En particular, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento con modelos animales han utilizado nanopartículas con diámetros entre 50 nm y 100 nm [93-95].

La forma de las nanopartículas también influye en su distribución corporal y la captación celular. Las formas más comunes son esféricas, cúbicas o barras, no obstante, los estudios se han enfocado en la síntesis de nanopartículas esféricas ya que son relativamente fáciles de preparar, aunque también se han hecho estudios *in vitro* que han demostrado que las nanobarras recubiertas con anticuerpos tienen una alta capacidad de adhesión celular

---

respecto a las esféricas. Por ejemplo, en un estudio in vivo se observó que las nanobarras de poliestireno recubiertas con un anticuerpo mostraron una acumulación cerebral 7 veces mayor respecto a las nanopartículas esféricas recubiertas. Además, las nanopartículas con forma de varillas cortas se retienen preferentemente en el hígado y presentan una eliminación rápida, mientras que las nanopartículas con forma de varilla larga se atrapan en el bazo y tiene una tasa de depuración más baja [96-97].

El potencial Zeta es otro parámetro importante que afecta el paso de las nanopartículas a través de la BHE. Se ha demostrado que algunas formulaciones de nanopartículas con alto potencial Zeta positivo, causan toxicidad, motivo por el cual, la mayoría de las nanopartículas que van dirigidas al cerebro tienen valores moderados de potencial Zeta negativo entre  $-1$  a  $-15$  mV [98-99, 89, 90] o altos valores negativos entre  $-15$  a  $-45$  mV. [97,100], sin embargo, algunas formulaciones con un valor moderado positivo (hasta 15 mV) o alto potencial Zeta positivo (por encima de 15 mV) han sido capaces de cruzar la BHE y, en algunos casos, son sistemas eficientes de administración hacia el cerebro [88,101]. Además, las nanopartículas neutras y zwitteriónicas permanecen más tiempo en torrente sanguíneo en contraste con las nanopartículas cargadas negativa o positivamente, aumentando su disponibilidad para llegar a células blanco [102].

Se han conjugado varios ligandos a las nanopartículas para facilitar la penetración de la BHE, y estas se pueden agrupar en cuatro tipos: 1) ligandos que regulan la adsorción de proteínas del torrente sanguíneo que interactúan directamente con los receptores o transportadores BHE [103]; 2) ligandos que tienen interacción directa con los receptores o transportadores de la BHE [104-106], 3) ligandos que aumentan la carga y la hidrofobicidad [107] y 4) ligandos que mejoran el tiempo en circulación sanguínea (por ejemplo, PEG) [108].

Un ejemplo del primer caso, es el poli (sorbato 80), comúnmente conocido como Tween 80, el cual puede adsorber apolipoproteína E y A-I. Este surfactante permite el anclaje de apolipoproteínas con los receptores de lipoproteínas expresadas en el endotelio cerebral cuya interacción permite el cruce de la BHE. Un ejemplo es el receptor de transferrina [106,109,110], receptor insulina [105,111], transportador de glucosa [104], etc. En otro caso, las nanopartículas se pueden funcionalizar con péptidos anfifílicos para facilitar la

---

captación celular por parte de las células endoteliales de la BHE. Además, el número de ligandos, el tamaño, la densidad así como su afinidad por el receptor, tiene un impacto importante en el transporte de nanopartículas a través de la BHE.

La afinidad del ligando a su receptor disminuye cuando se conjuga con las nanopartículas y la selectividad aumenta cuando se conjugan múltiples ligandos que predeterminan una orientación [108, 112]. Por ejemplo, se ha demostrado que las nanopartículas de oro o conjugadas con altas concentraciones de transferrina (100-200 moléculas de transferrina por nanopartícula) permanecen unidas a las células endoteliales del cerebro a diferencia de las nanopartículas de oro o conjugadas con bajas concentraciones de transferrina (20-30 moléculas de transferrina por nanopartícula) donde pueden interactuar de manera efectiva con el receptor de transferrina [106].

Cuando las nanopartículas entran en contacto con el entorno fisiológico, se produce una rápida absorción de proteínas provenientes del torrente sanguíneo sobre la superficie de las nanopartículas, formando un recubrimiento de proteínas (conocida como corona de proteínas) [113-114]. Se ha encontrado que más de 70 proteínas séricas se adsorben a la superficie de las nanopartículas de oro [113] y esto puede alterar la superficie química de las nanopartículas, provocando la agregación de estas y por lo tanto acelera su eliminación de la sangre a través del sistema retículo endotelial, que se localiza principalmente en el bazo y el hígado [83,115]. Si esto ocurre la dosis de nanopartículas disminuirá y la acumulación en el sitio de interés será muy baja. La forma más común de superar este problema es usar moléculas con la capacidad de minimizar la adsorción de proteínas en la superficie de la nanopartícula y poder así mantener su rendimiento y estabilidad. En este sentido, la forma de evitar el aglomerado de las nanopartículas y su pronta eliminación es recubrir las nanopartículas con PEG. Las nanopartículas PEGiladas presentan una carga superficial mínima que conduce a una menor opsonización y una menor absorción del sistema retículo endotelial [116]. Se ha demostrado que las nanopartículas PEGiladas (5 da) disminuyen la adsorción de proteínas y ralentiza el aclaramiento de los nanomateriales [113,117], aumentando su tiempo en circulación sanguínea y por lo tanto favorece que las nanopartículas lleguen al cerebro de forma eficiente [112,118]. Por ejemplo, las nanopartículas de poliestireno (con un tamaño aprox. 200 nm) recubiertas con PEG (5 kDa) pueden cruzar la BHE. Lo mismo ocurre con las nanopartículas de PLGA (aprox. 78

---

nm) recubiertas con PEG, se ha reportado que pueden atravesar rápidamente el tejido cerebral de rata, en contraste con las nanopartículas sin recubrir [118].

## **II.3 Vectores como sistemas liberadores de genes**

### **II.3.1 Vectores virales**

La actividad principal de un virus es llevar de manera eficiente su genoma de una célula huésped a otra, ingresar a la nueva célula, llegar al núcleo de la célula e iniciar la expresión de su genoma con el propósito de auto-replicarse. Los virus que se usan para transportar material genético terapéutico están diseñados genéticamente para elimitar su virulencia. Algunos virus como el retrovirus, el lentivirus (por ejemplo, el VIH), el adenovirus, el virus del herpes y el virus de la viruela pueden transformarse en vehículos de suministro de genes al reemplazar parte de su genoma con un gen terapéutico. Se han realizado estudios en la administración de genes con vectores virales y no virales, y los vectores virales recombinantes generalmente han demostrado ser muy eficientes como agentes terapéuticos [119-121].

Casi el 77% de todos los ensayos clínicos de terapia génica han involucrado vectores virales para administrar ácidos nucleicos debido a su alta eficiencia de transfección [122].

Sin embargo, el principal obstáculo para la aplicación clínica de la administración de genes virales radica en su seguridad, a pesar de que los vectores virales recombinantes se vuelven no replicativos, y por lo tanto no patogénicos, existe la posibilidad de que el virus vuelva a convertirse en un virus. Además los virus son inherentemente inmunogénicos, lo que conlleva a dificultades con administraciones repetidas y la posibilidad de reacciones inmunitarias peligrosas. Otra desventaja de usar vectores virales es la falta de especificidad en células diana y los costos de fabricación de terapias genéticas basadas en virus [88-89].

A pesar de su alta eficiencia de transfección, estos vectores presentan muchas desventajas, es por ello, que los vectores no virales se han convertido en alternativas atractivas para el

suministro de siRNA sintético y miARN debido a su mejor perfil de seguridad y menor costo de producción.

### II.3.2 Vectores no virales

Los vectores no virales o sintéticos brindan oportunidades para mejorar la seguridad, la fácil fabricación y una mayor flexibilidad en su modificación química. En general, los vectores sintéticos son materiales que se unen electrostáticamente al DNA o RNA, condensando el material genético en partículas de tamaño nanométrico, protegen los genes y median la entrada celular. Algunos ejemplos son complejos de DNA plasmídico con lípidos (lipoplex) y polímeros catiónicos que interactúan electrostáticamente con DNA (llamados poliplex). Varios tipos de nanopartículas se han utilizado para la entrega de genes: nanopartículas basadas en lípidos [123], nanopartículas basadas en polímeros [124-125], nanopartículas de oro [126-129], nanopartículas de sílice [130-133], nanotubos de carbono [134-138], puntos cuánticos, etc. [139]. El desarrollo de vectores no virales para la administración de genes *in vivo* presenta algunas desventajas: baja eficiencia de transfección y, en algunos casos, toxicidad e inestabilidad *in vivo*. En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de vectores no virales para el transporte de material genético con sus ventajas y desventajas.

**Tabla 3.** Vectores no virales para la administración de material genético.

	<b>Ciclodextrina</b>	<b>Dendrímeros</b>	<b>Polímeros catiónicos</b>
<b>Ventajas</b>	Alta eficiencia Baja toxicidad Biocompatible	Alta eficiencia Escape endosomal	Escape endosomal Alta eficiencia
<b>Desventajas</b>	Falta especificidad	Alto costo Citotoxicidad	Falta especificidad Citotoxicidad

---

### II.3.3 Criterios para el diseño de vectores para la liberación de genes

Actualmente las nanopartículas se utilizan estratégicamente en sistemas acarreadores para administrar siRNA [140-145]. Actualmente, la administración de siRNA, especialmente la administración sistémica *in vivo*, sigue siendo una tarea difícil [146] al estar limitada por varias barreras biológicas. Así, la administración sistémica de siRNA continúa siendo un gran desafío, primero por que los nanomateriales para la administración de siRNA necesitan formar un complejo estable con su carga negativa para protegerla de la degradación durante la circulación en el torrente sanguíneo y, segundo debido a que las nanopartículas cargadas con siRNA necesitan evadir un rápido aclaramiento de la sangre y evitar una respuesta inmune, que generalmente se realiza mediante la modificación de la superficie para proteger y estabilizar las nanopartículas, además del escape endosomal. Dado que el siRNA está alojado en el citoplasma, la entrega exitosa de siRNA se basa en la capacidad de las nanopartículas para ingresar a la célula, alcanzar el citoplasma y luego liberar la carga [147]. Por lo tanto, diseñar sistemas multifuncionales de administración de siRNA eficiente es un gran reto.

Para dirigir los genes al núcleo celular, los vectores utilizados para su administración deben pasar una serie de obstáculos, tanto extracelulares como intracelulares. Los virus, durante el proceso de evolución, han adquirido la capacidad de introducir el DNA viral (o RNA) en las células blanco. No obstante, los vectores no virales generalmente carecen de una o varias de las funciones necesarias para llegar al sitio de acción y ejercer su efecto (baja eficiencia de transfección, falta de especificidad, baja capacidad para escapar del atrapamiento endosomal). Por lo tanto, es importante considerar las barreras biológicas (barreras extracelulares e intracelulares) que limitan la entrega de genes, así como comprender las limitaciones de los materiales que se utilizan como agentes acarreadores, esto con el fin de diseñar materiales de forma adecuada.

Los criterios que deben tomarse en cuenta para diseñar los vectores no virales son: barreras extracelulares e intracelulares, considerar la naturaleza negativa del material genético, estabilidad en suero, células a las que estarán dirigidas y la capacidad del

---

material para lograr la liberación del material genético. En los siguientes apartados se hablará específicamente de estos criterios.

### **II.3.3.1 Barreras extracelulares**

Los vectores para el transporte de genes se enfrentan a un conjunto de barreras desde el tubo de ensayo a la membrana de una célula blanco. Estos incluyen desafíos fisicoquímicos, como la unión y condensación del DNA, estabilidad del complejo (vector no viral-genes) en solución, así como las barreras *in vivo* que involucran la estabilidad en el torrente sanguíneo, la penetración de la pared de los vasos sanguíneos y de los tejidos cercanos, y la interacción específica a las células blanco [148].

### **II.3.3.2 Empaquetamiento del material genético**

Como se mencionó anteriormente, los ácidos nucleicos necesitan formar un complejo estable con su carga negativa para protegerla de la degradación por nucleasas, es por ello, que se han utilizado diversos acarreadores para empaquetar y proteger el material genético (ejemplo: lípidos, polímeros y compuestos inorgánicos).

Por ejemplo, los materiales de tipo poliplex (polímeros-material genético) protegen el DNA y bloquean estéricamente el acceso de las enzimas nucleolíticas. El DNA plasmídico no protegido es degradado por DNAsa en cuestión de minutos, mientras que el DNA plasmídico en los poliplex es estable durante horas [149]. Los vectores (con carga positiva) condensan el DNA en estructuras pequeñas y compactas a través de las interacciones electrostáticas que se dan entre los fosfatos negativos a lo largo del esqueleto del DNA y las cargas positivas que se encuentran en el vector [150]. Los poliplex se forman espontáneamente al mezclar polímeros catiónicos con DNA plasmídico y las partículas resultantes son generalmente estructuras tiroidales o esféricas [151-152] con diámetros que varían de aproximadamente 30 a varios cientos de nanómetros. Cada partícula de poliplex se constituye con frecuencia por varias moléculas de DNA junto con muchas cadenas de polímeros. La estructura y la morfología de los poliplex parecen estar controladas

---

cinéticamente y, a menudo, dependen del orden de mezcla (por ejemplo, agregar polímero a la solución de DNA o DNA a la solución de polímero) [153].

La estructura del polímero catiónico puede afectar la unión del DNA y su condensación. Por ejemplo, el número de restos catiónicos tiene un fuerte efecto en la interacción del polímero-DNA. Se ha reportado que en polipéptidos se requiere de un mínimo de seis a ocho cargas para lograr una condensación eficiente del DNA [154-156]. En este contexto, Wadhwa et al. reportaron que la adición de un residuo de triptófano (Trp) a la cadena de polilisina aumenta la unión del DNA con éste [66]. Plank et al. por su parte encontraron que los residuos de triptofano no tenían efecto importante en la unión del DNA, al contrario, existía una disminución en la potencia de compactación del DNA en los polipéptidos [157]. Es importante tomar en cuenta que la unión fuerte y la condensación eficiente del DNA con el polímero no se correlacionan directamente con la eficiencia de entrega de genes. Por lo tanto, un polímero debe equilibrar tanto la unión suficiente que se requiere para proteger inicialmente el plásmido y la capacidad de liberar el plásmido [158-159].

### **II.3.3.3 Estabilidad en suero**

La estabilidad de los compuestos tipo poliplex depende de la estructura del polímero y de la relación de carga de (DNA/polímero). Los poliplex netos en concentraciones fisiológicas, forman agregados grandes, esto conlleva a sistemas ineficaces e incluso pueden llegar a ser tóxicos debido a la embolización de las partículas en el pulmón. Por el contrario, los poliplex cargados positivamente suelen permanecer en solución. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que muestran toxicidad [153], ya que la carga positiva genera adsorción de la albúmina sérica y otras proteínas que están cargadas negativamente, causando agregación que lleva a un rápido aclaramiento del poliplex por parte de las células fagocíticas y el sistema retículo endotelial [160]. Se han utilizado agentes que estabilizan el poliplex, como, el polietilenglicol [161-162], N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) [163-166], oligosacáridos [167], azúcares [168-169] y proteínas [170]. El aumento de la estabilidad probablemente se debe a los efectos estéricos que conducen a una disminución de las interacciones partícula-partícula y partícula-proteína. El

---

efecto va a depender de la masa molecular del polímero hidrófilo, la densidad del injerto y el método de unión del polímero hidrófilo al polímero.

Sin embargo, se ha demostrado que la PEGilación, la cual se aborda más adelante en este documento, reduce la internalización de compuesto poliplex no dirigidos a la célula y altera el tráfico intracelular [171].

### **II.3.3.4 Orientación específica a la célula**

El grado de especificidad que se requiere en terapia génica hacia las células blanco varía ampliamente. Por ejemplo, en terapias contra el cáncer se requiere que la entrega de genes solo llegue a un conjunto específico de células. En el caso de la hemofilia, la importancia radica en producir suficientes niveles de proteína terapéutica.

Generalmente los polímeros no tienen la capacidad de dirigirse por sí mismos a células específicas, pero si tienen una alta flexibilidad para ser modificadas químicamente con agentes que permiten tanto una mayor captación celular como especificidad celular [172].

Se puede usar muchas proteínas receptoras unidas a la membrana para que el complejo polímero-genes se internalice a la célula a través de un mecanismo de endocitosis mediado por receptores. Los polímeros se han funcionalizado con restos glicosídicos [173-175], así como otras moléculas pequeñas como el folato [176], o el direccionamiento mediado por proteínas como la transferrina [151,177-180], esto con la idea de aportar cierta selectividad. Algunas proteínas pueden proporcionar una orientación aún más específica y limitada para otras células, tal es el caso del factor de crecimiento epidérmico (EGF) [96,181], anticuerpos o fragmentos de anticuerpos [182] y secuencias de reconocimiento a integrinas [183].

El éxito en esta estrategia de direccionamiento depende mucho de la química de la conjugación, la longitud del espaciador entre el ligando y el polyplex, la fuerza de unión del ligando-receptor y el número de ligandos de direccionamiento por polyplex. Se ha utilizado una variedad de químicos espaciadores para unir los ligandos a los polímeros, ya sea a través de enlaces covalentes o de la interacción biológica estreptavidina y la biotina [181].

---

Es importante considerar que la interacción ligando-receptor no se vea afectada por la conjugación. Por ejemplo, se ha reportado que para los conjugados de EGF-biotina / avidina-polilisina, los entrecruzantes cortos entre el EGF y la biotina interfirieron con la unión al receptor, no obstante, observaron que al usar un espaciador de 30 Å, la unión entre ligando-receptor se daba sin obstáculos, dando como resultado, una mayor eficiencia de transferencia de genes [184].

### **II.3.3.5 Barreras intracelulares**

Cuando el complejo polímero-material genético supera las barreras extracelulares, éste se internaliza en la célula y es cuando los vehículos de administración se enfrentan a un nuevo conjunto de obstáculos intracelulares. Más del 95% de los vectores se internalizan [185], solo una fracción menor al 50%, cumple con su objetivo. Los poliplex generalmente se internalizan por endocitosis y, una vez en la ruta endocítica se fusionan con los lisosomas (vesículas ácidas llenas de enzimas degradativas). Por lo anterior, el DNA y el vector deben escapar de estos compartimentos hacia el citoplasma o en su caso ser transportados hacia el núcleo y atravesar la membrana nuclear para liberar el material genético y ejercer su efecto [186].

### **II.3.3.6 Endocitosis**

En la mayoría de los casos, las nanopartículas se internalizan a través de endocitosis y la vía endo-lisosomal. Dependiendo de las propiedades de las nanopartículas [tamaño, forma, propiedades de la superficie, etc.] y los tipos de células, la endocitosis de las nanopartículas puede ocurrir a través de diferentes vías [187]. La endocitosis se puede dividir de manera general en dos categorías: fagocitosis y pinocitosis. La fagocitosis ocurre principalmente con fagocitos especializados, como los macrófagos y las células dendríticas, mientras que la pinocitosis está presente en todos los tipos de células. La pinocitosis se produce a través de vías mediadas por clatrina o vías independientes de clatrina. Las vías independientes de

---

clatrina pueden dividirse adicionalmente en endocitosis mediada por caveolas, macropinocitosis y vías independientes de clatrina y caveolas.

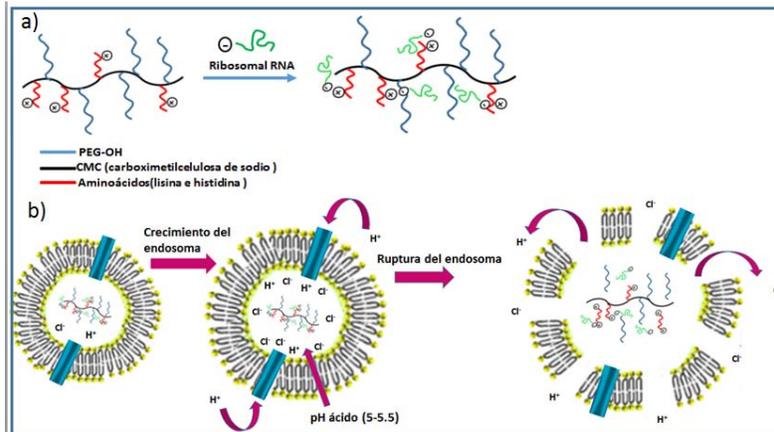
La endocitosis de las nanopartículas es un proceso complejo y puede utilizar más de una vía para lograr la entrada celular. Entre estas vías de endocitosis, la endocitosis mediada por clatrina, y que pasa por la vía endo-lisosomal, se considera la vía más común.

Algunas vías de endocitosis, como a algunos casos de endocitosis y macropinocitosis mediadas por caveolas, pueden pasar por alto las lisosomas [187]. En estos casos, no es necesario un mecanismo activo de escape endosomal. Sin embargo, la ruta más común de la endocitosis es a través de la vía endo-lisosomal. En esta vía, las nanopartículas comienzan el tránsito intracelular con vesículas de endosoma tempranas, que se vuelven progresivamente ácidas a medida que maduran (endosomas tardíos) [188-190]. La acumulación de protones en la vesícula genera acidificación hasta que el pH disminuye entre 5 y 6. Y con la fusión de los endosomas tardíos y los lisosomas, el pH disminuye entre 4 y 5, por lo tanto, el contenido se degradaría por las enzimas en caso de que no escapara del endosoma.

Las nanopartículas catiónicas, con una fuerte capacidad buffer en el intervalo de pH 5 – 7, han de mostrado tener capacidad de escapar del endosoma a través del efecto llamado "esponja de protones" [140-145,191]

Dentro de los polímeros que se han utilizado bajo esta hipótesis, llamada esponja de protones, se encuentran los dendrímeros de polietilenoimina (PEI) y poliamidamina (PAMAM) y estos incluyen una gran cantidad de aminas secundarias y terciarias, y muestran valores de pKa entre el pH fisiológico y el lisosomal [192-194]. Las endolisosomas se acidifican por la acción de una enzima ATPasa que transporta activamente protones del citosol a la vesícula. Estos polímeros, por lo tanto, experimentan grandes cambios en la protonación durante el tráfico endocítico. La hipótesis esponja-protón sugiere que los polímeros evitan la acidificación de las vesículas endocíticas, provocando que la ATPasa transporte más protones para alcanzar el pH deseado. Esta acumulación de protones en la vesícula debe ser equilibrada por una afluencia de contraiones. El aumento de la concentración de iones en el endosoma provoca su hinchamiento y por lo tanto la

rotura de la membrana, que finalmente libera a las nanopartículas en el citosol, **figura 1** [195].



**Figura 1.** A) Copolímero (carboximetilcelulosa funcionalizado con aminoácidos y polietilenglicol) cargado con RNA. b) Escape endosomal del vector cargado con RNA ribosomal

De acuerdo a lo anterior, es fundamental diseñar nanopartículas cargadas con siRNA que puedan escapar del endosoma de manera eficiente [147]. Para lograr que siRNA se libere en el citoplasma, las nanopartículas necesitan escapar del endosoma en un período corto de tiempo o de lo contrario las nanopartículas se degradan o se reciclan, lo que limitará la eficacia de la administración de siRNA. Las estrategias para hacer más eficiente este proceso radican en el control de la composición química, la modificación de las propiedades de la superficie y tamaño de nanopartículas [140-145, 191]. En este sentido, el tamaño de endosomas típicos en una endocitosis mediada por clatrina es de 100 nm, mientras que una endocitosis mediada por caveolina es de 50-80 nm [196-197].

### II.3.3.7 Transporte de material genético a través del citoplasma y su liberación

Una vez que los vectores (acarreador de material genético) son liberados de los compartimentos endosómicos, los polilplex deben moverse a través del citoplasma hasta el núcleo. Sin embargo, en el citoplasma se concentran proteínas, microtúbulos y otros

---

orgánulos, los cuales pueden dificultar el movimiento de los vectores. Los estudios de movilidad en el citosol mostraron que la difusión es dependiente del tamaño [198]. Por ejemplo, el DNA con una longitud mayor a 3,000 pares de bases es básicamente inmóvil [199]. Por lo tanto, se podría esperar que los políplex relativamente grandes también estén inmóviles. Este hecho, junto con la degradación conocida del DNA en el citosol debido a la presencia de nucleasas citosólicas [200], presenta una barrera que a menudo se pasa por alto para el diseño adecuado de vectores. Los políplex cargados positivamente podrían moverse a lo largo de los microtúbulos, proteínas motoras, o bien podrían depender del transporte normal de endocitosis para ingresar a la célula [201].

Al igual que el vector protege el DNA de la degradación enzimática, una fuerte interacción química entre el vector y material genético evitan la unión de las proteínas necesarias para la expresión génica. Por lo tanto, un vector debe liberar su DNA en la célula blanco. Varios estudios han demostrado que al reducir el número de cargas positivas en el polímero se reduce la fuerza de unión entre el polímero y el material genético, lo mismo sucede al conjugar cadenas de PEG en los vectores. También se ha demostrado que la disminución de la masa molecular del polímero conduce a un aumento de la expresión génica [124,202-203].

### **II.3.4 Liberación con respuesta a pH**

El valor de pH en los tejidos patológicos, derivadas del cáncer, de una infección o por el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria, es significativamente diferente al tejido normal. El pH en una infección sistémica, de tumores primarios o de tumores a causa de metástasis, es más bajo que el pH que tiene un tejido normal, por ejemplo el pH en condiciones normales es de 7.4 pero este puede bajar hasta 6.5 después de presentar una reacción inflamatoria por 60 horas [203-204]. Este comportamiento puede ser de gran utilidad para diseñar materiales que responden a estímulos como el pH, para la liberación de material genético o fármacos.

Los componentes celulares muestran un gradiente de pH transmembranal en condiciones normales y patológicas, que también se pueden usar para el suministro intracelular de

---

macromoléculas con potencial terapéutico, como los péptidos antigénicos (se dirigen a la reconocimiento por el complejo principal de histocompatibilidad tipo I, MHC I), los oligonucleótidos antisentido (se dirigen al RNAm) o los genes correctivos (se dirigen al núcleo). Se sabe que los componentes celulares como el citoplasma, los endosomas, los lisosomas, el retículo endoplásmico, el aparato de golgi, las mitocondrias y los núcleos mantienen sus propios valores de pH característicos.

Los valores de pH varían desde 4.5 en el lisosoma hasta aproximadamente 8.0 en la mitocondria, es importante considerar estos gradientes de pH ya que los compuestos terapéuticos con pKa entre 5.0 y 8.0 pueden mostrar cambios drásticos en sus propiedades fisicoquímicas. Para lograr una administración intracelular eficiente es importante diseñar materiales que tengan respuesta a pH [205].

Como se mencionó anteriormente, en el diseño de vectores no virales para el transporte de material genético es muy importante que éste ingrese a la célula y posteriormente escape del atrapamiento endosomal a través del efecto esponja de protones. En este sentido, se requiere del diseño de materiales que escapen de este atrapamiento a través de la introducción de compuestos que tengan respuesta a cambios de pH que eviten la acidificación de las vesículas endocíticas [196].

Un ejemplo de este tipo de materiales son los polímeros catiónicos, los cuales son capaces de mejorar el escape endosomal pero pueden llegar a ser tóxicos en un ambiente fisiológico porque pueden interactuar con proteínas séricas, sin embargo esta toxicidad se puede reducir al utilizar polímeros sensibles a pH. Para ayudar al escape endosomal los polímeros se modifican generalmente con grupos sensibles al pH donde la relación de los grupos ionizantes u otros grupos funcionales se puede ajustar y equilibrar para lograr una eficiencia de transfección óptima.

Los grupos amina tienden a cambiar su estado de protonación a medida que cambia el pH. Sin embargo, el imidazol y otros grupos sensibles al pH son más ampliamente utilizados. El uso de imidazol y otros grupos sensibles al pH puede disminuir la cantidad de carga superficial positiva en el ambiente fisiológico, lo que conlleva a reducir la toxicidad y hacer que las nanopartículas no sean reconocidas por el sistema inmunológico. Davis [206] fue

---

uno de los primeros investigadores en utilizar polímeros modificados con imidazol para la administración de siRNA. Él y sus colaboradores reportaron un nanomaterial de policatextrina lineal modificada con imidazol que contiene ciclodextrina para la administración de genes y establecieron que existía un mejor escape endosomal con la presencia de este grupo endosomal. Malamas et al. [207] por su parte diseñaron y evaluaron un lípido catiónico anfifílico sensible al pH a base de imidazol para la administración de siRNA. Gupta l. [208] desarrollaron un sistema de nanotransportadores a base de polímeros que contenía imidazol para lograr el escape endosomal y la liberación programada de siRNA. En su estudio, se preparó un copolímero de bloques inspirado en el virus de la gripe. Las cadenas de polímero que contienen imidazol fueron capaces de fusionarse con la membrana de los endosomas para ayudar al escape. Benne et al. [209] utilizaron un polímero en forma de peine poli (L-histidina) con un injerto de poli (L-lisina) sensible al pH como vector de administración de genes.

## **II.3.5 Componentes de los vectores no virales**

### **II.3.5.1 Lípidos catiónicos y polímeros**

El uso de lípidos catiónicos para el suministro de genes se reportó por primera vez por Felgner [210]. Se ha evidenciado que la estructura de los lípidos afecta su interacción con el DNA e influye en las propiedades de la membrana de los liposomas formados a partir de esta interacción y esto tiene una fuerte influencia en la eficiencia de administración de genes [211]. Los lípidos catiónicos han sido los vectores sintéticos más estudiados debido a su eficiencia de transfección relativamente alta [212]. La "lipofección" se ha utilizado ampliamente en estudios de administración de genes tanto *in vitro* e *in vivo*, así como en muchos ensayos clínicos en humanos [213]. La administración de genes a base de lípidos, sin embargo, presenta algunas desventajas, como la dificultad para fabricar liposomas y complejos de (DNA-liposomas) reproducibles, toxicidad en algunos tipos de células *in vitro* e *in vivo* y la estabilidad coloidal, especialmente en la administración sistémica [214].

---

Otros materiales ampliamente usados son los polímeros. Las ventajas más importantes de usar polímeros son la facilidad de procesamiento, la productividad y su bajo costo. No obstante, los polímeros naturales han atraído más atención debido a su bajo costo, baja densidad, son biodegradables y no abrasivos.

Los polímeros comprenden una variedad de sustancias químicas que incluyen tanto los materiales disponibles en el mercado como los polímeros diseñados específicamente para la entrega de genes. La flexibilidad en la modificación química de los polímeros permite proporcionar múltiples funciones requeridas para la entrega eficiente de genes, biocompatibilidad, fácil fabricación y una formulación robusta y estable [208].

Los polímeros catiónicos tienen un gran potencial para la terapia génica humana. Sin embargo, la baja eficiencia de transfección de los genes ha limitado su aplicación clínica [209].

### **II.3.5.2 Derivado de la celulosa: carboximetilcelulosa (CMC)**

La celulosa ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>, es un biopolímero constituido por unidades de β-glucosa unidas entre sí por enlaces 1-4. La celulosa se utiliza principalmente para producir papel y cartón, sin embargo, solo pequeñas cantidades se convierten en derivados de celulosa.

Estos derivados son importantes para diversas aplicaciones industriales, al representar la principal fuente de fibras, textiles, aditivos para alimentos, películas termoplásticas, explosivos, y para tecnología farmacéutica y cosmética.

Los factores que afectan las propiedades químicas y físicas de los derivados dependen principalmente del grado de sustitución, el grado de polimerización de las moléculas finales y la polidispersidad. Los derivados de celulosa son usualmente clasificados en dos clases principales: ésteres y éteres [215].

Los ésteres de celulosa más representativos son el acetato de celulosa (AC), xantato de celulosa, acetato propionato de celulosa (APC) y acetato butirato de celulosa (ABC), siendo el acetato de celulosa uno de los más utilizados en aplicaciones industriales (plástico, pintura y textil).

Los derivados de celulosa tipo éter son los más utilizados en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica, dentro de los más utilizados son la metilcelulosa (MC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxietilcelulosa (HEC) y la carboximetilcelulosa (CMC).

---

Los éteres de celulosa son muy estables a la luz, humedad, calor moderado y al aire, y dependiendo del tipo de éster, estos suelen ser térmicamente estables hasta temperaturas de 80°-100°C, además no muestran toxicidad en ratas, cerdos y humanos por lo que han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) como aditivos de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos.

Los derivados de celulosa que contiene grupos carboxilo, suelen ser fuentes apropiadas para dispersiones sólidas amorfas, al tener excelente perfil de seguridad, interacciones fuertes con partículas de fármacos, la capacidad de adaptarse a la hidrofobicidad a través de la naturaleza del sustituyente y el grado de sustitución (DS). Los altos valores de temperatura de transición vítrea (Tg), promueve la estabilidad de la formulación y evitan su cristalización durante el almacenamiento [215-216]

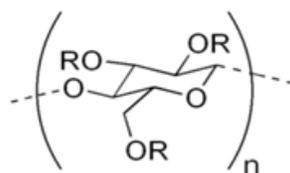
La modificación química es la ruta más importante para cambiar las propiedades de los biopolímeros naturales. La carboximetilación de polisacáridos es una de las más frecuentes ya que es la más simple.

La carboximetilcelulosa, Figura 2, se produce a partir de celulosa, donde la materia prima principal es madera o algodón. La celulosa no es soluble en agua, pero la CMC sí, esto como resultado de una reacción química entre la celulosa y el ácido monocloroacético (MCA) en presencia de hidróxido de sodio [217]. Este derivado tipo éter es uno de los más importantes y es uno de los que presenta más bajo costo comercial. Su carácter higroscópico, alta viscosidad en soluciones diluidas, buenas propiedades para formar películas, inocuidad y excelente comportamiento como coloidal protector y adhesivo, determinan los usos de este compuesto. La CMC puede aplicarse en detergentes, pinturas, cerámica, industria petrolera, y sobre todo en la industria alimenticia y farmacéutica. El grado de sustitución (DS), así como su grado de polimerización (DP) pueden variar mucho dependiendo de su aplicación, pero generalmente el DS está entre 0.5 -1.5. Debido a su grado de sustitución y de la alta estabilidad hidrolítica, la carboximetilcelulosa puede ser esterificada adicionalmente con anhídridos de ácidos orgánicos.

---

La CMC tiene varias ventajas debido a su excelente solubilidad en agua, capacidad de formar geles y su funcionalización resulta muy accesible y fácil por la presencia de grupos hidroxilo y carboximetilo. La naturaleza no tóxica y la biocompatibilidad de CMC son ventajosos para aplicaciones biomédicas [218-219].

En cuanto al uso de CMC como transportadores de genes, se ha reportado su uso mediado por polímeros catiónicos a células de hueso. En estudios *in vitro* se demostró que estos sistemas no muestran evidencia de toxicidad [220].



**Figura 2.** Estructura química de la carboximetilcelulosa (CMC)

### II.3.5.3 Aminoácidos

Los aminoácidos cumplen diferentes funciones, tanto estructural y funcional, forman parte de las proteínas, y participan en procesos bioquímicos. Un aminoácido se caracteriza por presentar un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y un grupo carboxilo (-COOH) unidos al mismo carbono, conocido como carbono alfa. Estos dos grupos se pueden ionizar en medio acuoso, siendo los responsables del anfoterismo de los aminoácidos, es decir, pueden actuar como ácidos o como bases, en función del pH del medio: el grupo carboxilo se comporta como un ácido débil y el grupo amino, como una base débil. Por ello, la carga de los aminoácidos varía en función del pH. Además, cinco de los aminoácidos presentan otro grupo ionizable en su cadena lateral: Lys, Arg, His (aminoácidos con carga positiva o básicos), Asp y Glu que son aminoácidos con carga negativa o ácidos [221].

### II.3.5.3.1 Histidina

La histidina es un aminoácido con un grupo funcional imidazol. Es uno de los 22 aminoácidos proteínogénicos. La histidina se aisló por primera vez por Albrecht Kossel en 1896. La histidina es un aminoácido esencial en los humanos y otros mamíferos y es un precursor de la biosíntesis de histamina y carnosina. Este aminoácido y otros compuestos de imidazol tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anti-septicas. La eficacia de la L-histidina en la protección de tejidos inflamados se atribuye a la capacidad de las especies reactivas del oxígeno para ser generadas por las células durante la respuesta inflamatoria aguda. La histidina, cuando se administra en cantidades terapéuticas, ya que es capaz de inhibir las citocinas y los factores de crecimiento involucrados en el daño celular. Se localiza en el centro activo de muchas enzimas, ya que puede actuar donando o captando protones del sustrato. Esta propiedad se debe a la presencia de un grupo imidazol en la cadena lateral. Además, debido a que el  $pK_a$  es menor al pH fisiológico, las proteínas ricas en histidina actúan como tampones en los medios biológicos, por ejemplo la hemoglobina [222-223], Figura 3.

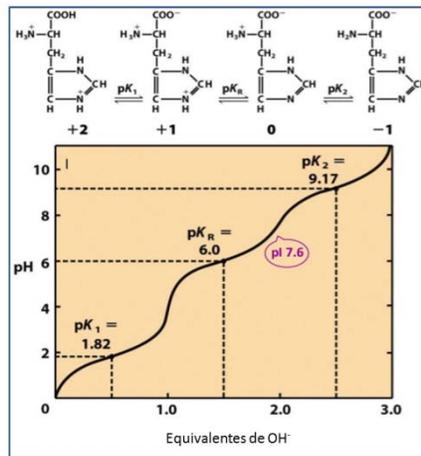


Figura 3. Ionización de la histidina

### II.3.5.3.2 Lisina

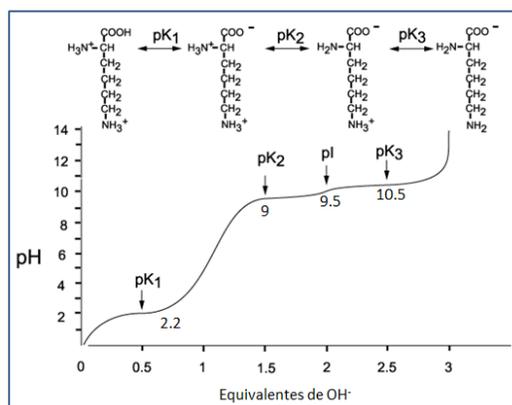
La lisina fue aislada de la caseína por primera vez en 1889. Es un aminoácido esencial y es un componente básico de las proteínas. En los seres humanos es necesario para el crecimiento y la reparación de tejidos. La lisina es un aminoácido dibásico con carga

positiva. Presenta un carácter antipático, la parte hidrofóbica corresponde a la cadena lateral que contiene a los carbonos mientras que el extremo de la cadena lateral corresponde a la parte con una carga positiva. El estado de protonación del grupo amino y carbonilo cambia dependiendo del pH, Figura 4. Presenta carga positiva a pH fisiológico.

La lisina forma bases de Schiff, que actúan como intermediarios covalentes en la catálisis enzimática e interviene en la unión de coenzimas a las proteínas. La lisina también se involucra con otros aminoácidos con carga negativa, como el aspartato, para crear puentes de hidrógeno que permitan estabilizar a las proteínas [224].

El grupo amino es muy reactivo y a menudo participa en reacciones en los centros activos de las enzimas. Las proteínas sólo tienen un grupo aminoβ, pero numerosos grupos amino beta. Sin embargo, el mayor pKa hace que las cadenas laterales de lisilo sean menos nucleófilas. Algunos efectos específicos en centros activos de la enzima pueden disminuir el pKa de la cadena lateral lisil tal que se convierte en reactivo.

La cadena lateral de lisina tiene tres grupos metileno, de modo que a pesar de que el grupo amino terminal se cargará en condiciones fisiológicas, la cadena lateral tiene un carácter hidrófobo significativo [225].



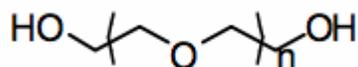
**Figura 4.** Ionización de la lisina.

---

## II.3.5.4 Polietilenglicol (PEG)

### II.3.5.4.1 Estructura y propiedades

El PEG es un poliéster lineal o ramificado con un grupo hidroxilo en cada extremo, Figura 5. Es un polímero altamente soluble en agua y en diferentes disolventes orgánicos. Siendo un polímero no tóxico, inerte y no inmunogénico, está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para su administración en seres humanos [226].



**Figura 5.** Estructura química del polietilenglicol (PEG)

Dentro del área farmacéutica se ha utilizado ampliamente durante los últimos años para mejorar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas y de las drogas terapéuticas.

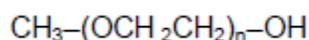
### II.3.5.4.2 Pegilación

En la década de 1970, Davis et al [227] estudiaron la conjugación de polietilenglicol con las proteínas, actualmente esta técnica es conocida como PEGilación [228], éste es un término que se ha utilizado para hacer referencia a la funcionalización de una proteína, péptido o polisacárido con una o más moléculas de polietilenglicol. Este proceso tecnológico ha impactado fuertemente a la industria bio-farmacéutica, ya que la PEGilación mejora las propiedades de las proteínas debido a que aumenta su vida media, aumenta la solubilidad y la resistencia a un ataque proteolítico, reduce el reconocimiento por el sistema inmune, aumenta su solubilidad y estabilidad. Este fenómeno se explica debido a la expansión del radio hidrodinámico del conjugado (proteína-PEG), generado por la capacidad que tiene el PEG de coordinar numerosas moléculas de agua y de la alta flexibilidad de su cadena polimérica [229]. El PEG es fácilmente desechado por el cuerpo a través del riñón (pesos moleculares del polímero menores a 20 KDa), o del hígado (pesos moleculares arriba de 20KDa) [230].

---

La bioconjugación con polímeros solubles en agua mejora el aclaramiento plasmático y la distribución corporal, lo que aumenta los efectos terapéuticos y disminuye posibles efectos secundarios.

La pegilación ha sido la técnica más exitosa para mejorar las propiedades terapéuticas de las macromoléculas [231]. Muchos de los beneficios de la PEGilación de proteínas están ligados a las propiedades del PEG. Se han utilizado métodos químicos y enzimáticos para llevarla a cabo [232], pero para poder realizar este proceso es importante partir de un PEG activado, siendo el metoxi-PEG (mPEG) el más utilizado, Figura 6 [233].



**Figura 6.** Estructura del polímero, metoxi-PEG

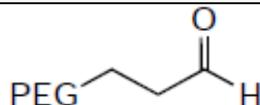
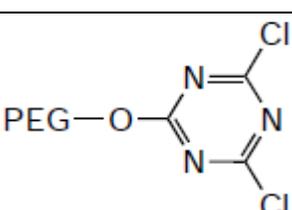
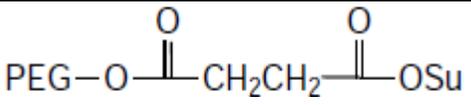
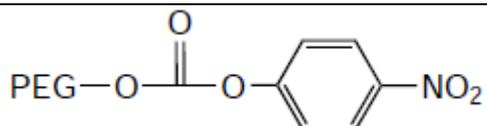
El PEG activado puede unirse a un sitio específico de las proteínas, generalmente sobre un grupo amino, sulfhídrico u otro grupo nucleofílico. El sitio preferido para realizar las modificaciones es el grupo amino de la lisina o el grupo N-terminal de la cadena polipeptídica, sin embargo, la modificación química más común se da en los grupos ε-aminos de los residuos de lisina, esto se debe a que una proteína típica contiene una carga de lisinas del 10% del total del aminoácido en la proteína, su disponibilidad favorece la conjugación entre PEG-proteína [232-233]. La pegilación del grupo amino de la proteína genera un alto número de isómeros a causa del alto número de sitios activos en la proteína, esto dificulta la posibilidad de obtener un número específico de aductos, lo cual también genera problemas en la purificación del conjugado. Es por eso que es importante generar reacciones lo más selectivas posibles que produzcan un solo conjugado sin alterar las propiedades fisicoquímicas de la proteína de interés. Una forma de controlar la reacción es a través de cambios en el pH, la conjugación de los grupos ε-amino de las lisinas con PEG se favorece a pH básicos mientras que la conjugación del amino N-terminal con PEG se favorece a pH ácido [234].

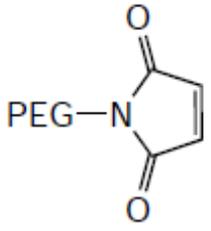
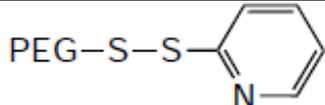
Para realizar la pegilación las variables a optimizar son la estructura y tamaño del PEG ya que esto puede limitar la reacción. La ramificación de los PEG incrementa el peso molecular de la proteína-PEG y también puede limitar la disponibilidad del PEG con la

proteína. Existen otros factores que pueden limitar el proceso como: tiempo de reacción, pH, temperatura, concentración del PEG y de la proteína [234].

Existen diferentes PEG funcionalizados y su uso dependerá de l tipo de reacción que se dese e efectuar entre el PEG y la prote ína (puede r eaccionar con l os gr upos amino terminal, ε-amino o sulfuros) Tabla 4.

**Tabla 4.** Derivados de polietilenglicol

Estructura	Propiedades
 <p>PEG-aldehído</p>	<p>Tiene dos etapas de reacción, el primer producto (una base de Schiff) es reducido a N<sup>-</sup>ACNBH<sub>3</sub> (Cianotrihidridoborato de sodio). Se realiza a pH 4.5-5 y solo reacciona con los grupos α-amino.</p> <p>-modificación s obre e l grupo α amino (mantiene l a carga nativa de la proteína)</p>
 <p>PEG-diclorotriazona</p>	<p>Ya n o es empleado en aplicaciones terapéuticas debido a su toxicidad.</p> <p>- modificación s obre e l grupo α amino [Mantiene l a carga nativa de la proteína]</p>
<p>PEG-O-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub></p> <p>PEG-tosi</p>	<p>No es muy usado porque genera mezclas de productos.</p> <p>- modificación s obre e l grupo α amino [Mantiene l a carga nativa de la proteína]</p>
 <p>PEG-Succimidil succinato</p>	<p>El enlace éster entre el ácido succínico y el PEG es fácilmente hidrolizable.</p> <p>-modificación sobre el grupo amino [pérdida de la carga positiva de la proteína]</p>
	<p>Lenta reactividad</p> <p>- modificación s obre e l grupo α amino [pérdida de l a carga positiva de la proteína]</p>

-PEG-p-nitrofenilcarbonato	
 <p>PEG-maleimida</p>	<p>Genera enlaces estables, pero también puede reaccionar con aminas a pH mayor a 8.</p> <p>-modificación sobre el grupo tiol</p>
 <p>PEG</p>	<p>Es el más específico para reaccionar con grupos tioles.</p> <p>-modificación sobre el grupo tiol</p>

### II.3.5.4.3 PEG oligonucleótidos

El desarrollo de algunos nuevos fármacos incluye el uso de oligonucleótidos, principalmente oligonucleótidos antisentido y aptámeros, debido a su alta selectividad en el reconocimiento de blancos. Sin embargo, *in vivo* presentan una vida media muy corta, esto se debe a su baja estabilidad frente a exo y endo-nucleasas. Otra desventaja es el tamaño del oligonucleótido (moléculas pequeñas), haciéndolo más propenso a una excreción rápida.

La molécula de PEG generalmente se une a los grupos hidroxilo del ácido nucleico a través de espaciadores, la funcionalización con PEG incrementa la estabilidad hacia la degradación enzimática, prolonga el tiempo de circulación en plasma y mejora la penetración en las células. El PEG ayuda a enmascarar la carga negativa de los oligonucleótidos.

El uso de cadenas largas de PEG conlleva a que el siRNA esté más protegido a frente a la degradación por nucleasas, aunque la eficiencia en el silenciamiento disminuye. Mientras que el comportamiento con cadenas cortas de PEG, sucede lo contrario [235-236].

---

## II.4 Enfermedades neurodegenerativas- Ataxias espino cerebelosas (SCAs)

Las ataxias espino cerebelosas constituyen un grupo de trastornos hereditarios neurodegenerativos, de herencia autosómica dominante, generando daños tanto en el cerebelo como en el tallo encefálico. Las evaluaciones clínicas muestran signos piramidales (relacionado con sistemas motores voluntarios) o extrapiramidales (relacionado con sistemas motores involuntarios), oftalmoplejia, disartria, y pérdida de la sensibilidad profunda. La ataxia puede ser clasificada de acuerdo a su causa en congénita, hereditaria y esporádica [237].

Las SCAs fueron clasificadas en tres diferentes grupos de acuerdo a las características clínicas. Sin embargo, se han identificado los diferentes genes para cada patología, así que la clasificación actual está basada en el análisis genético-molecular, de las cuales se han identificado 43 variantes de SCA pero conforme se descubren otros genes se identifican nuevas variantes (cada tipo se nombra con la abreviación SCA más el número arábigo correspondiente al número de *locus* (posición fija en el cromosoma)). La mutación genética da lugar desde la variante SCA1 hasta SCA43. El tipo de SCA3 es uno de los más frecuentes y conocidos, las variantes desde SCA9 hasta SCA44 son las menos comunes.

De acuerdo al tipo de mutación, se describen tres categorías de SCAs: 1) SCAs causadas por expansiones de repeticiones CAG en regiones codificantes, 2) SCAs causadas por expansiones de repeticiones en regiones no codificantes, 3) SCAs causadas por mutaciones convencionales. Siendo la primera, la más frecuente y la más estudiada, representa el 50% de la población afectada en el mundo; estas SCAs consisten en una expansión de unidades repetidas del trinucleótido CGA (citosina-adenina-guanina), lo cual implica una mayor incorporación de segmentos de poliglutamina (poliQ) en la proteína codificada por cada tipo de SCA, ocasionando un mal plegamiento así como la formación de agregados proteicos que alteran la funcional neuronal, es por ello que existe un número específico de unidades repetidas que representa el límite entre lo normal y un estado patológico para cada diferente ataxia u otro padecimiento neurodegenerativo como la enfermedad de Huntington [238-240], Tabla 5.

**Tabla 5.** Enfermedades causadas por el número de unidades repetidas de trinucleótidos

Enfermedad	Trinucleotidos repetidos	Unidades repetidas (Normal)	Unidades repetidas que causan un padecimiento
Huntington	CAG	11-34	40-121
SCA1	CAG	6-39	40-82
SCA2	CAG	15-24	32-200
SCA3	CAG	13-36	61-84
SCA6	CAG	4-20	20-29
<b>SCA7</b>	<b>CAG</b>	<b>4-35</b>	<b>37-306</b>
SCA17	CAG	25-42	47-63
Kennedy	CAG	9-36	38-62

El incremento anormal de los tripletes está relacionado con el desarrollo de múltiples enfermedades, como ataxias, Huntington, Kennedy, etc que se caracterizan generalmente por una degeneración neuronal y muscular.

Existe una prevalencia mundial de SCA de 5-7/1000,000 habitantes. La incidencia va a depender del tipo de ataxia y del fenómeno genético de la población. Se reporta que la ataxia más común en el mundo corresponde a la tipo SCA3 abarcando aproximadamente el 21% de los casos, seguido de la ataxia tipo 2 (SCA2) y SCA6 que representan el 15 %. La SCA2 prevalece sobre todo en ciertas regiones de Cuba, India, Australia, Martinica, Túnez, Alemania, Italia, Polonia y sur de Brasil, no obstante, este padecimiento también se encuentra en la población mexicana y se considera una de las más frecuentes, presentándose en 45% de la población [241-242].

Los síntomas más comunes para las SCAs son los problemas de coordinación y equilibrio, sin embargo, no se cuenta con una terapia eficaz y mucho menos una terapia específica para cada variante de SCA. En la actualidad se recomienda fisioterapia (para ayudar a la movilidad, mejorar el habla y para llevar a cabo tareas de la vida diaria) o el uso de medicamentos para disminuir el temblor, rigidez, fatiga, dolor, mareo, trastorno del sueño y espasmos musculares. Uno de los medicamentos que se utilizan es el clorhidrato de buspirona el cual ha demostrado una regresión parcial del cuadro clínico [243-244]. Durante la siguiente sección solo se hará énfasis en la ataxia espino cerebelosa tipo 7 (SCA7) ya que el diseño del siRNA que se usará en el desarrollo de este proyecto.

---

#### II.4.1 Ataxia espino cerebelosas tipo 7 (SCA 7)

La SCA 7 es un desorden degenerativo caracterizado por la degeneración del cerebelo, tallo cerebral y retina. Pertenece al grupo de las ataxias espino cerebelosas, sin embargo, este tipo de ataxia se asocia más con un daño severo de los fotorreceptores de la retina que conduce a la pérdida de la visión.

La SCA 7 la causa una expansión repetida del triplete CAG en la región codificante del gen ATXN7 que se localiza en el cromosoma 3 p12-p21, el cual consta de 13 exones de DNA genómico. Este gen codifica para una proteína de 892 aminoácidos denominada ataxina 7 [245], cuya función es desconocida, sin embargo, el tamaño de la proteína dependerá de la longitud de la poliglutamina, es decir, de la cantidad de expansiones repetidas del trinucleotido que van de 37 a 200 repetidos en alelos anormales (en alelos normales el intervalo es de 4 a 27). La ataxina 7 se encuentra en el citoplasma y núcleo de células nerviosas en algunos tejidos no neuronales.

La SCA 7 es una de las ataxias autosómicas menos comunes encontradas en el mundo, con una prevalencia de 1/100000 [246], la proporción de SCA tipo 7 representa aproximadamente el 2% en Australia [247], 2.7% en Taiwan [248], 30.3% en el sur de Africa [249] y el 85.94% en México [250]. Desafortunadamente se ha identificado una alta prevalencia en la población mexicana, en 5 diferentes comunidades distribuidas geográficamente en una pequeña región de 1200 Km<sup>2</sup> en el sureste de México (región Central del Estado de Veracruz, sobresaliendo la comunidad Tlaltetela) con una prevalencia de 817.14/100000 habitantes [250].

---

# Capítulo III

## III. Metodología

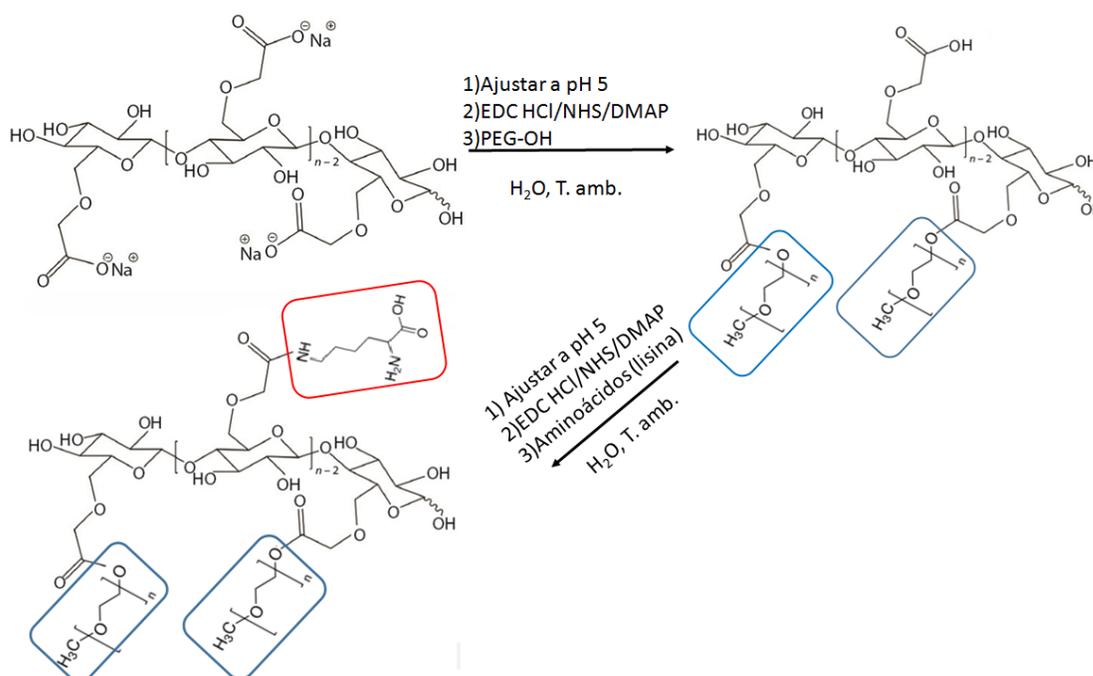
### Materiales

La carboximetilcelulosa (CEKOL 700 (7CMC), PM-70000; CEKOL 30 (3CMC), PM-80000; grado de sustitución (DS) = 0.82) se obtuvo de Celco. Ácido clorhídrico, acetonitrilo, éter dietílico, metanol, tween 80, poli(etilenglicol) metil éter (mPEG-OH, PM= 2000), 1-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida HCl (EDC HCl), N-hidroxisuccinimida (NHS), 4-dimetilaminopiridina (DMAP), solución salina tamponada con fosfato (PBS), hidróxido de sodio, L-lisina, L-histidina, NaOH, HCl y los oligonucleótidos específicos para *A. taxina* y GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) se adquirieron de Sigma-Aldrich. El reactivo de RNA RiboGreen de Quantum (Incluye RNA ribosomal) y el kit Taq DNA polimerasa se compró en Fisher Scientific, Inc. El siRNA se obtuvo de Ambion (AM16706). El agua DEPC (dietilpirocarbonato), glucosa, suero fetal bovino (FBS), reactivo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; color amarillo), isopropanol, buffer de carga (glicerol 3 0%, azul de bromofenol 0.25% , xileno cianol 0.25% ), agarosa, etanol, cloroformo, trizol, buffer de DNAsa (Tris 10 mM- EDTA 10 mM (10:1)), DNAsa, EDTA, TAE 1x (0.04 M de tris- acetato y 0.001 M de EDTA), bromuro de etidio (0.01 µg/mL) y Kit SuperScript III fueron comprados en invitrogen. Las células HeLa se adquirieron de ATCC.

### III.1 Síntesis de los polímeros, 7CMC-PEG y 3CMC-PEG

Las muestras 7CMC-PEG y 3CMC-PEG se sintetizaron como sigue: La CMC (1.2 mmol de ácido) se disolvió en agua (30 ml) y se ajustó el pH a 5 (solución de HCl), posteriormente se adicionó EDC HCl (1.4 mmol), NHS (1.4 mmol) y DMAP (0.2 mmol), todos disueltos en 4 ml de agua. La solución se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y se protegió de la luz. Al cabo de una hora se adicionó el reactivo de PEG-OH (0.36 mmol) (disuelto en

4 ml de agua), a la solución previamente preparada. La reacción se dejó en agitación durante la noche con protección de la luz, posteriormente el producto se precipitó con metanol y se lavó con una mezcla de acetonitrilo y éter dietílico (90:10). El producto lavado se disolvió en agua y se precipitó nuevamente en metanol, se filtró y se secó a temperatura ambiente [251]. Se realizó un análisis estructural con  $^{13}\text{C}$  RMN y FTIR para confirmar la presencia de PEG. 3CMC-PEG se sintetizó con el mismo procedimiento mencionado anteriormente, Figura 6.



**Figura 6.** Esquema de la funcionalización de carboximetilcelulosa con polietilenglicol y aminoácidos

Las muestras fueron etiquetadas como:

-7CMC-PEG (carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizado con polietilenglicol)

-3CMC-PEG (carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizado con polietilenglicol)

---

### **III.2 Síntesis de los polímeros 7CMC-PEG-Lis, 3CMC-PEG-Lis, 7CMC-PEG-His y 3CMC-PEG-His**

Los copolímeros (carboximetilcelulosa y polietilenglicol) se funcionalizaron con 30% de lisina e histidina. Se disolvieron 7CMC-PEG o 3CMC-PEG en agua y se ajustó el pH a 5. Enseguida se agregaron los siguientes reactivos: HCl EDC (1.4 mmol), NHS (1.4 mmol) y DMAP (0.2 mmol), todos disueltos en 1 ml de agua. Después de 1 hora, se añadieron 0.36 mmol de aminoácido, histidina o lisina, figura 6. La reacción se dejó en agitación durante una noche con protección de la luz. El producto obtenido se precipitó con metanol y se lavó con una mezcla de acetonitrilo y éter dietílico (90:10). Nuevamente se disolvió en agua y se precipitó en metanol, se filtró y se secó a temperatura ambiente [251].

Las muestras fueron etiquetadas como:

-7CMC-PEG-Lis ( carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizado con polietilenglicol y lisina)

-3CMC-PEG-Lis ( carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizado con polietilenglicol y lisina)

-7CMC-PEG-His ( carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizado con polietilenglicol e histidina)

-3CMC-PEG-His ( carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizado con polietilenglicol e histidina)

### **III.3 Preparación de las nanopartículas**

Las nanopartículas se prepararon disolviendo 3 mg del copolímero (carboximetilcelulosa-PEG-aminoácido) en 2.5 ml de una solución de tween 80 al 6%. La solución al 6% se preparó diluyendo tween 80 en agua desionizada estéril. Las muestras se sonicaron durante 2 h y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 30 min. Las nanopartículas obtenidas se resuspendieron en agua desionizada estéril [252].

### **III.4 Caracterización de los copolímeros**

Las muestras se caracterizaron por dispersión de rayos X a ángulos pequeños (SAXS), espectroscopia de infrarrojo (FTIR), resonancia magnética nuclear en estado sólido  $^{13}\text{C}$

---

(RMN MAS), análisis termogravimétrico (TGA) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Las nanopartículas obtenidas de los copolímeros se caracterizaron por dispersión dinámica de luz (DLS) (se midió el potencial Z y el tamaño de partícula).

#### **III.4.1 Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)**

Los espectros FTIR de los productos obtenidos se obtuvieron a temperatura ambiente en una ventana espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Se usó un espectrómetro, ATR-FTIR (con un ATR de diamante, espectrómetro Bruker FTIR), con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **III.4.2 Resonancia magnética nuclear en estado sólido de $^{13}\text{C}$ con giro al ángulo mágico ( $^{13}\text{C}$ RMN MAS).**

Los espectros de  $^{13}\text{C}$  CP RMN MAS se obtuvieron a una frecuencia Larmor de 100.58 MHz utilizando un espectrómetro Bruker Avance 300 con una sonda MAS de polarización cruzada (CP) que gira a una velocidad de 5 kHz. Se usó un tiempo de contacto de 5 ms, y pulsos  $\pi/2$  de 5  $\mu\text{s}$ . Los desplazamientos químicos fueron referidos a TMS (trimetilsilano).

#### **III.4.3 Análisis termogravimétrico (TGA)**

Las curvas TGA se obtuvieron en un equipo TA Instruments Q500. El análisis se realizó en un intervalo de 30 a 900  $^{\circ}\text{C}$ , con una velocidad de calentamiento de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , en atmósfera de nitrógeno con un flujo de 1.0 ml / min.

#### **III.4.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Se obtuvieron micrografías de los materiales en un microscopio electrónico de barrido (SEM Jeol 7600) que opera a un voltaje de aceleración de 15KV. Los aumentos fueron de 50x y 20x

#### **III.4.5 Tamaño de partícula y del potencial Zeta**

El diámetro hidrodinámico promedio, el potencial Zeta y el índice de polidispersidad (PDI) de las nanopartículas se midieron mediante análisis de dispersión dinámica de luz (DLS)

---

utilizando Zeta sizer Nano ZS90 (Malvern Instruments). Todas las mediciones se realizaron a 25 ° C con agua desionizada y estéril, a un ángulo de detección de 90 ° C (para el tamaño y PDI) y 120 ° C para el potencial Zeta. Los datos de medición se expresaron como: media ± desviación estándar

#### III.4.6 Dispersión de rayos X a ángulo pequeños (SAXS)

Se obtuvieron perfiles de dispersión de rayos X a ángulo pequeño utilizando una cámara Kratky acoplada a un tubo de ánodo de cobre. La distancia entre la muestra y el contador lineal fue de 25 cm; se utilizó un filtro de Ni. La muestra se introdujo en un tubo capilar. La intensidad  $I(q)$  se midió durante 9 min para obtener una buena calidad estadística. Los datos SAXS se procesaron con el programa ITP [253-255] donde el ángulo de dispersión ( $q$ ) se define como  $q = 2\pi\sin\theta/\lambda$ , donde  $\theta$  y  $\lambda$  son el ángulo de dispersión de los rayos X y la longitud de onda, respectivamente. La función de distribución de forma y tamaño de los objetos dispersos se estimó a partir de la gráfica de Kratky,  $q^2I(q)$  contra  $q$ . Finalmente, la dimensión fractal de los objetos dispersos se estimó a partir de la pendiente de la curva  $\log I(q)$  vs  $\log(q)$  [256-257].

#### III.5 Encapsulación del material genético

Las nanopartículas se suspendieron en una solución de RNA ribosomal (1 ml de una concentración de 100 ng / ml). La solución se incubó a 8 ° C durante 10 minutos. Después la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 minutos para sedimentar las nanopartículas. El sobrenadante se retiró y se analizó con el kit Quantit Ribo Green. La cantidad de RNA ribosómico en el sobrenadante ( $w$ ) se extrajo de la cantidad total de RNA ribosomal agregado ( $w, 100$  ng). El porcentaje de eficiencia ( $E$ ) del RNA ribosomal atrapado en las nanopartículas se calculó utilizando la fórmula.

$$E = \frac{\text{cantidad total de RNA ribosomal } (w) - \text{RNA ribosomal en el sobrenadante } [w]}{\text{cantidad total de RNA ribosomal } [w]} \times 100$$

---

La medición de la concentración del ácido nucleico se realizó en un espectrofluorómetro (Synergy HTX, multi-mode reader), con una fluorescencia máxima de excitación y emisión de 500 y 525 nm respectivamente.

En el caso de las nanopartículas cargadas con siRNA. Las nanopartículas se suspendieron en 1 mL de agua DEPC y se adicionó 3  $\mu$ L de una concentración 10 nM de siRNA. La solución se incubó a 8 °C durante 10 minutos y después la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 minutos para sedimentar las nanopartículas. El sobrenadante se retiró y se analizó con el kit Quantit Ribo Green. Los datos de medición se expresaron como: media  $\pm$  desviación estándar.

### **III.6 Evaluación de la estabilidad de las nanopartículas**

Las nanopartículas cargadas con RNA ribosomal se suspendieron en solución buffer de fosfatos estéril (PBS) a un pH ajustado de 5, 6 y 7.4 (el pH del medio de fosfatos se modificó utilizando NaOH 0.1 M o HCl 0.1M). La mezcla se sonicó durante 1 h. Las nanopartículas se almacenaron a 8 °C durante una semana. El tamaño de partícula y el potencial Zeta de los polímeros cargados con RNA ribosomal se midieron a varios tiempos (1 hora, 24 horas y 1 semana).

### **III.7 Caracterización biológica en células HeLa**

Se utilizaron células HeLa para realizar las pruebas biológicas. Las células se cultivaron en cajas estériles y se utilizó un medio de crecimiento compuesto por MEM, 1% penicilina /estreptomicina, 2 mM de glucosa y 10% de suero fetal bovino (FBS). Los cultivos se incubaron en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire a una temperatura de 37°C.

Una vez que se cultivaron las células y quieran sembrarse para realizar un experimento específico, se retira el medio de las células y se lava con buffer de fosfatos (PBS), luego se adicionan 200 $\mu$ L de tripsina y 200  $\mu$ L de PBS, después de 1 min, se retira la tripsina y se comienzan a despegar las células con 1 mL del medio.

Teniendo estandarizado el tratamiento de estos cultivos y con un número considerable de células (170000 mil) se comenzaron los experimentos.

---

Antes de comenzar los ensayos, el material y soluciones preparadas fueron esterilizados en una autoclave con agua DEPC (dietilpirocarbonato; 0.1%). Los ensayos se realizaron en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar. Los copolímeros se esterilizaron con luz UV durante 10 minutos antes de incorporar el material genético.

### **III.7.1 Evaluación de la viabilidad celular**

Para evaluar la viabilidad celular, se utilizó el ensayo de MTT (Mide la función metabólica de las células usando una sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; color amarillo) el cual es reducido por la actividad metabólica de las células a un formazano del MTT (color violeta). Primero se sembraron las células HeLa en una placa de 96 pozos con 5000 mil células en cada pozo, se adicionó medio MEM y se dejó incubando por 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de las células, se lavaron con 200  $\mu$  L de una solución de buffer de fosfatos (PBS). Después se incorporaron las nanopartículas a diferentes concentraciones en cada pozo (2  $\mu$  g/mL, 60  $\mu$  g/mL, 300  $\mu$  g/mL, 1500  $\mu$  g/mL y 7500  $\mu$  g/mL). Se dejó incubando durante 24 horas, después se retiró el medio, se lavó con 200  $\mu$  L de PBS y posteriormente se adicionó 10  $\mu$  L del reactivo de MTT a cada pozo. Se dejó incubando durante 4 horas y posteriormente se retiró el medio cuidadosamente. A cada pozo se le adicionó 200  $\mu$  L de HCl 4 mM en isopropanol al 100%. Se dejó incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos hasta que se disuelvan los cristales. Finalmente se realizó la medición en un equipo (Synergy HTX, multi-mode reader) para leer la absorbancia a 570 nm.

El siguiente procedimiento experimental consiste en varias etapas para finalmente evaluar la expresión del RNA mensajero que codifica para la taxina. Primero se realizó la transfección de los polímeros cargados con siRNA a células HeLa, posteriormente la extracción de RNA, tratamiento de RNA con DNase, síntesis de cDNA utilizando SuperScript III, RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) de GAPDH y ATAXINA y finalmente se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

---

### **III.7.2 Transfección de los copolímeros cargados con siRNA a células HeLa**

Para realizar la transfección se utilizaron células HeLa con una confluencia del 70%. Se retiró el medio y se lavó con PBS. Posteriormente se adicionaron las nanopartículas cargadas con siRNA y se dejaron incubando durante 24 horas. Las nanopartículas se prepararon a una concentración de 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y posteriormente se cargaron con 3  $\mu\text{L}$  de una concentración de 10 nM de siRNA.

### **III.7.3 Extracción de RNA**

El reactivo de trizol se utiliza para obtener RNA total de células y tejidos. Se trata de una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina. Este reactivo mantiene la integridad del RNA mientras se rompen las células y se disuelven componentes celulares, también tiene actividad contra RNAsas para evitar la degradación de la muestra.

Después de 24 horas de incubación de las células HeLa con las nanopartículas cargadas con siRNA, se retiró el medio y se lavó con PBS, después de este tratamiento se adicionó 1 mL de triazol, posteriormente se adicionó 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se mezcló y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó durante 15 min a 11000 rpm a 4°C. Se obtuvieron dos fases, una orgánica y una fase acuosa. Se recuperó la fase acuosa, evitando tomar la interfase. El RNA se mantiene en la fase acuosa el cual se recuperó por medio de precipitación con 1 mL de isopropanol. Se dejó incubando durante 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó durante 15 min a 11000 rpm a 4°C, y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se agregó 750  $\mu\text{l}$  de etanol al 75% (con agua previamente tratada con DEPC al 0.1%) para lavar el RNA. Se centrifugó durante 10 min a 8500 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla aproximadamente 5 min a temperatura ambiente en campana de flujo laminar. Finalmente se realizó la cuantificación de 1  $\mu\text{L}$  de la muestra donde la relación de las absorbancias en promedio medidas 260/280 nm es de 1.8, y la verificación de la integridad del RNA en un gel de agarosa al 1% (agregar al pozo 1  $\mu\text{L}$  de RNA, 4  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O y 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga (glicerol 30%, azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%). En este deben observarse claramente las bandas 28 s y 18 s. El RNA extraído se conservó a una temperatura de -20°C para posteriormente realizar un tratamiento con DNasa.

---

### **III.7.4 Tratamiento de RNA con DNAsa**

Se colocó 1 µg de RNA en un tubo estéril y se adicionó 1 µL de buffer de DNAsa (Tris 10 mM- EDTA 10 mM 10:1) y 1 µL de DNAsa (10 mg/µL), se dejó incubando a 37°C durante 30 min, posteriormente se añadió 1 µL de EDTA (10 mM) y se dejó incubando por 65°C por 10 min. Finalmente, este se conservó a una temperatura de -20°C para el experimento posterior que es la síntesis de cDNA.

### **III.7.5 Síntesis de cDNA utilizando SuperScript III**

Mediante este Kit es posible sintetizar cDNA a partir de RNA con contenido desde 100 pb a más de 12kb. La síntesis se realizó utilizando primers de genes específicos.

Se realizaron dos mezclas, la primera corresponde a la mezcla de RNA para desnaturalizar, para ello se adicionó 1 µL de RNA (concentración de aproximadamente 100 ng/mL), 1 µL de oligo dT (0.5 µg/µL), 1 µL de dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato; 10 mM), 10 µL de H<sub>2</sub>O cbp. La segunda corresponde a la mezcla complementaria para la síntesis de cDNA, se adicionó 2 µL de buffer 10X RT (100 mM de Tris-HCl (pH 9.0), 500 mM KCl y 1% Triton), 4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µL de DTT (ditiotreitól; 1M), 1µL de RNAsa (40 U/µL) y 1 µL de superScript III RT (enzima, 200 U/µL).

Una vez preparadas las mezclas de reacción, se utilizó el programa rtpcrinvitrogen del termociclador Veriti. La mezcla 1 se colocó en el termociclador y se dejó incubando a 65°C durante 5 min, después de este tiempo, se colocaron los tubos en hielo durante 1 minuto y se adicionó 10 µL de la mezcla 2. Los tubos nuevamente se colocaron en el termociclador a 50°C durante 50 min, para finalizar la reacción se debe aumentar la temperatura a 85°C durante 5 min. Al finalizar la reacción las muestras se congelaron a -20°C para experimentos posteriores.

### **III.7.6 RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) de GAPDH y ATAXINA**

Una vez obtenido el cDNA se llevó a cabo la reacción de RT-PCR para obtener los amplicones de ATAXINA y GAPDH (control de carga). Para ello se mezcló 1.25 µL de buffer 10X (200 mM de tris HCl (pH 8.4) y 500 mM de KCl), 0.25 µL de dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato; 10 mM), 1.2 µL de oligo Fw (10µM), 1.25 µL de oligo R

---

(10 $\mu$ M), 0.125  $\mu$ L de Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ L), 0.75  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM), 6.63  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 1  $\mu$ L de cDNA (concentración de 500 nM). Posteriormente se colocó en el termociclador (se utilizó el programa rtpcrinvitrogen del termociclador Veriti) bajo las siguientes condiciones, figura 7.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron:

ATAXINA

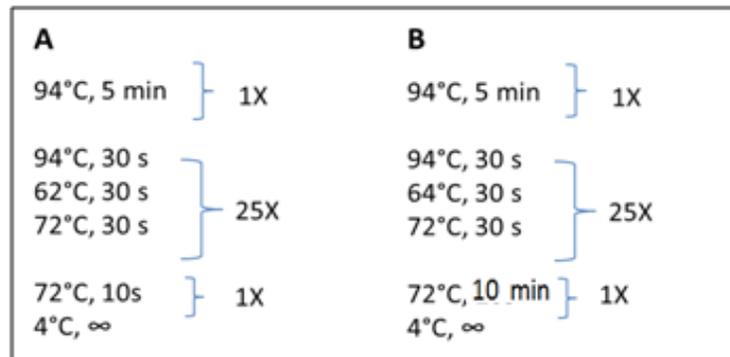
5'- CCCTGCTGAATCCATCAAGA- 3' [forward]

5'- AGGCTTCCAAACTTCCTGGG- 3' (reverse)

GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)

5'- TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG- 3' (forward)

5'- TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT- 3' (reverse)



**Figura 7.a)** condiciones de RT-PCR para GAPDH, b) condiciones de RT-PCR para ATAXINA (sugerencia del fabricante (kit taq DNA polimerasa ).

### III.7.7 Electroforesis en gel

Se preparó un gel de agarosa al 1 % con TAE 1x ( 0.04 M de tris- acetato y 0.001 M de EDTA). Una vez disuelta la agarosa en el TAE 1x, se adicionó 1.6  $\mu$ L de bromuro de etidio (1.25  $\mu$ M). Una vez que el gel se polimerizó, este se colocó dentro de una cámara de electroforesis y se cubrió con una solución de TAE 1x. Luego en cada pozo del gel se adicionó la muestra preparada (5 $\mu$ L de cDNA y 1  $\mu$ L de buffer de carga (glicerol 30%,

---

azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%). Posteriormente la muestra se dejó corriendo a 60 mV durante 40 min. Después de 1 hora, el gel se observó en luz UV en el equipo fotodocumentador (BIO-RAD modelo 680).

### **III.7.8 Estabilidad de siRNA frente a RNAasa (ribonucleasa)**

Para evaluar la capacidad de los copolímeros para proteger siRNA contra la degradación por nucleasas. Los complejos copolímero- siRNA (una relación molar de 30: 1) se incubaron a temperatura ambiente en presencia de 0.5  $\mu$  L de RNAasa (10 mg/mL). Se tomaron alícuotas de 10  $\mu$  L a la hora y a las 24 horas. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel se preparó como se indica en la sección III.7.7.

---

# Capítulo IV

## IV. Resultados y discusión

En la primera parte se muestran los resultados (sección IV.1) de la caracterización de los copolímeros por espectroscopia de infrarrojo (FITIR-ATR), resonancia magnética nuclear en estado sólido ( $^{13}\text{C}$  RMN), análisis termogravimétrico (TGA), microscopía electrónica de barrido (SEM) y la evaluación de viabilidad celular en cultivos HeLa. En la segunda parte (sección IV.2) se muestran los resultados de los copolímeros cargados con RNA ribosomal (se evaluó la incorporación de material genético en los copolímeros, se analizó la estabilidad del complejo (copolímero-siRNA) a diferentes valores de pH y se evaluó su respuesta a pH). En la tercera parte (sección IV.3) se muestran los resultados de los copolímeros cargados con siRNA (se evaluó la estabilidad de siRNA frente a nucleasas, se determinó la eficiencia de incorporación del siRNA en los copolímeros y se analizó la expresión del RNA mensajero que codifica para ataxina 7).

### IV.1 Copolímeros carboximetilcelulosa-polietilenglicol funcionalizados con aminoácidos

#### IV.1.1 Estructura y estabilidad térmica

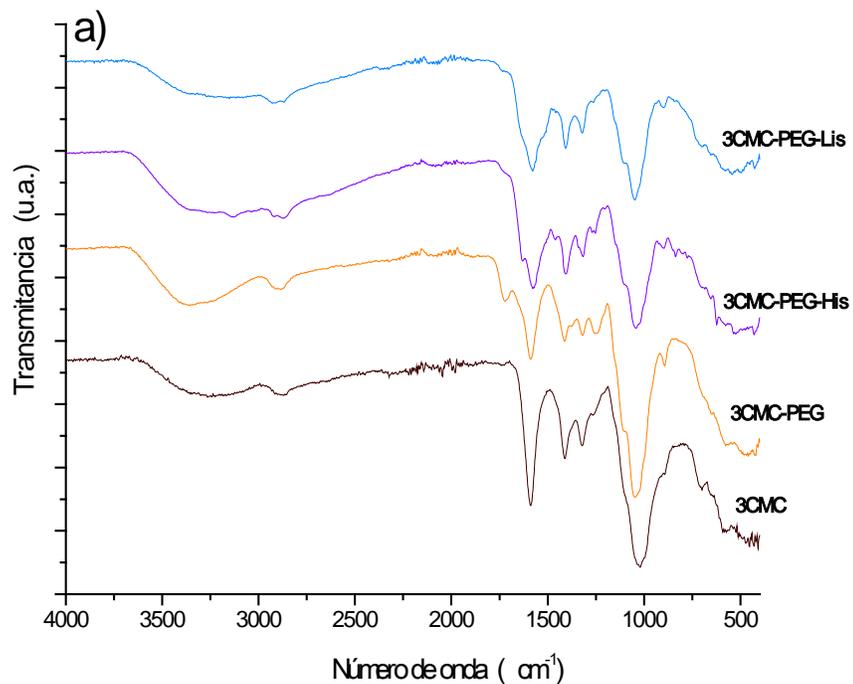
Los espectros FITIR de carboximetilcelulosa de bajo peso molecular (3CMC), carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol, (3CMC-PEG), carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol e histidina (3CMC-PEG-His) y carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol y lisina (3CMC-PEG-Lis) se observan en la Figura 8.

Los espectros FITIR de carboximetilcelulosa de alto peso molecular (7CMC), carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol, (7CMC-PEG), carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol e histidina (7CMC-PEG-His) y carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol y lisina (7CMC-PEG-Lis) se pueden observar en la Figura 9.

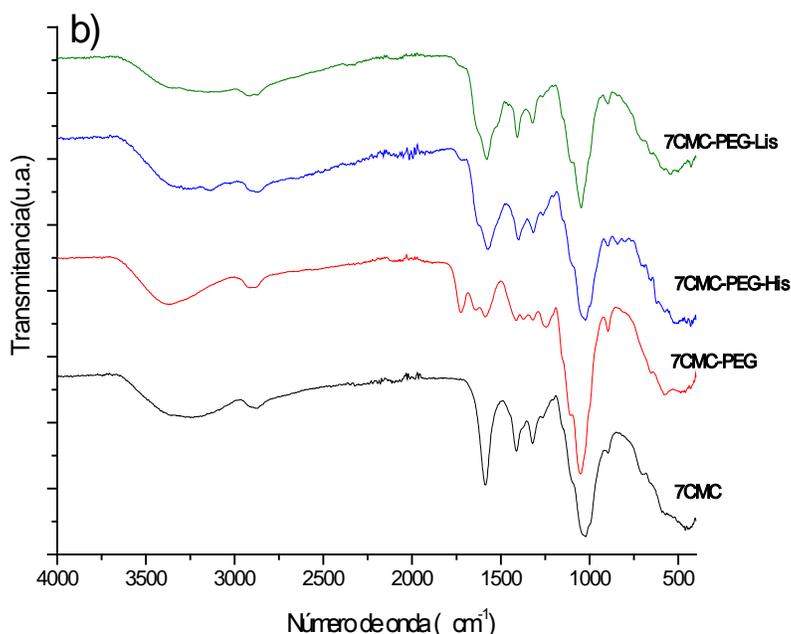
---

En los espectros de 3CMC y 7CMC, la banda que aparece a alrededor de  $3422\text{ cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones de estiramiento de los grupos hidroxilo. La banda a  $2924\text{ cm}^{-1}$  y  $1613\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C-H y a la banda de absorción de C=O presente en el grupo carboxilo respectivamente. A bajos número de onda, en  $1062\text{ cm}^{-1}$ , se distingue una banda que se atribuye al estiramiento del enlace C-O-C.

En el caso de los espectros de los copolímeros carboximetilcelulosa-polietilenglicol, 3CMC-PEG y 7CMC-PEG, presentan las bandas de absorción características de la carboximetilcelulosa (7CMC y 3CMC), sin embargo, se observa una banda adicional a  $1740\text{ cm}^{-1}$  para 3CMC-PEG y a  $1742\text{ cm}^{-1}$  para 7CMC-PEG, que se atribuyen al modo de estiramiento del enlace C=O que corresponden al grupo éster [258-259]. Esta banda confirma que la carboximetilcelulosa se ha funcionalizado con polietilenglicol (PEG-OH). Los espectros de los copolímeros funcionalizados con histidina (3CMC-PEG-His) y lisina (3CMC-PEG-Lis) no mostraron diferencias significativas respecto al espectro de 3CMC. Lo mismo se observó al comparar los espectros de 7CMC-PEG-His y 7CMC-PEG-Lis con el espectro de 7CMC.



**Figura 8.** Espectro de infrarrojo de carboximetilcelulosa de bajo peso molecular (3CMC) (a), carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol (3CMC-PEG) (b), carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol e histidina (3CMC-PEG-His) (c), carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol y lisina (3CMC-PEG-Lis) (d).

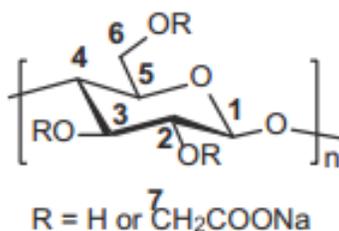


**Figura 9.** Espectro de infrarrojo de carboximetilcelulosa de alto peso molecular (7CMC) (a), carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol (7CMC-PEG) (b), carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol e histidina (7CMC-PEG-His) (c), carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol y lisina (7CMC-PEG-Lis) (d).

En la Figura 10, 11 y 12 se muestran las estructuras químicas de carboximetilcelulosa, L-histidina y L-lisina respectivamente. En cada una de las estructuras químicas se numeran los carbonos para identificar la señal correspondiente en el espectro de resonancia.

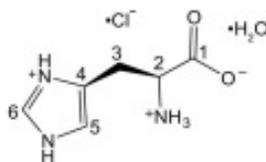
Las muestras se analizaron por  $^{13}\text{C}$  RMN en estado sólido para obtener información complementaria sobre la estructura de los copolímeros. La Figura 13 muestran los espectros correspondientes a Lis, His y los copolímeros con bajo peso molecular: 3CMC-PEG, 3CMC-PEG-His, 3CMC-PEG-Lis. La Figura 14 contiene los espectros de los copolímeros con alto peso molecular: 7CMC-PEG, 7CMC-PEG-His, 7CMC-PEG-Lis.

En los espectros de 3CMC y 7C MC, Figura 13 y 14, se observa la señal a 178 ppm que corresponde al carbono del grupo carbonilo, la señal a 104 ppm corresponde al C-1, el pico a 83 ppm corresponde al C-4, la señal a 75 ppm corresponde a la superposición de C2, C3, C5, C7 y 63 ppm corresponde a la señal del C6 [260].



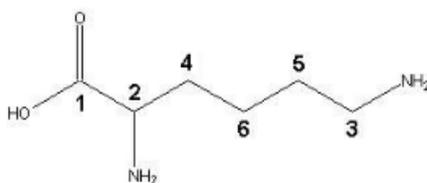
**Figura 10.** Estructura química de la carboximetilcelulosa.

Las señales de la histidina se observan en 174.94, 137.36, 134.42, 110,50.06 y 26.86 ppm que corresponde a los carbonos C-1, C-6, C-4, C-5, C-2 y C-3 respectivamente, Figura 11



**Figura11.** Estructura química de L-histidina.

En la Figura 12 se muestran las señales características de la lisina, con desplazamiento en 25, 31, 35, 46, 58 y 176 ppm que corresponden a los carbonos C-6, C-5, C-4, C-3, C-2, C-1 respectivamente.



**Figura 12.** Estructura química de L-lisina

---

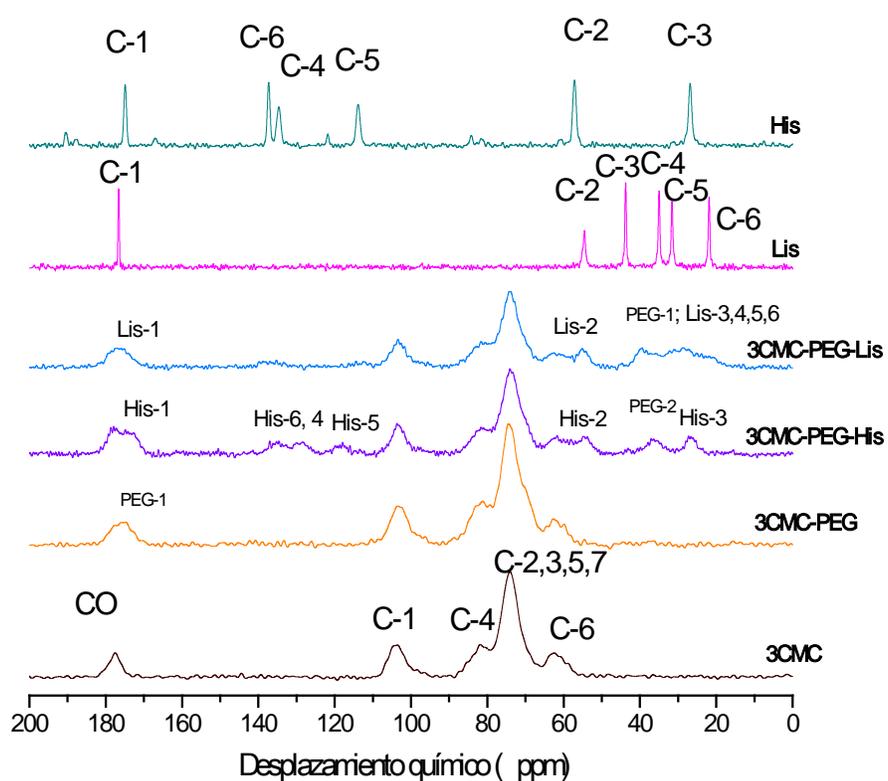
Los espectros de <sup>13</sup>C MC-PEG y <sup>13</sup>C MC-PEG presentan las señales características de la carboximetilcelulosa y una señal adicional cercana a 177 ppm. Esta señal se atribuye a la formación del grupo éster debido a la interacción de los grupos -COOH de carboximetilcelulosa con los grupos hidroxilo del PEG-OH.

Al comparar el espectro de <sup>13</sup>C MC-PEG-His con <sup>13</sup>C MC-PEG, se observan diferencias significativas en el intervalo de 110 y 140 ppm, que corresponden a los carbonos aromáticos de la histidina, en los que la intensidad de las señales se vuelven más anchas, sugiriendo que el anillo aromático de la histidina interacciona con la superficie de <sup>13</sup>C MC-PEG. También se observa un desplazamiento a campo bajo del carbono C-2 (carbono unido a la amina en la histidina) y se observó un pico adicional a 174 ppm, debido a que <sup>13</sup>C MC-PEG reacciona con los grupos amino (C-2) de la histidina para formar el enlace amida.

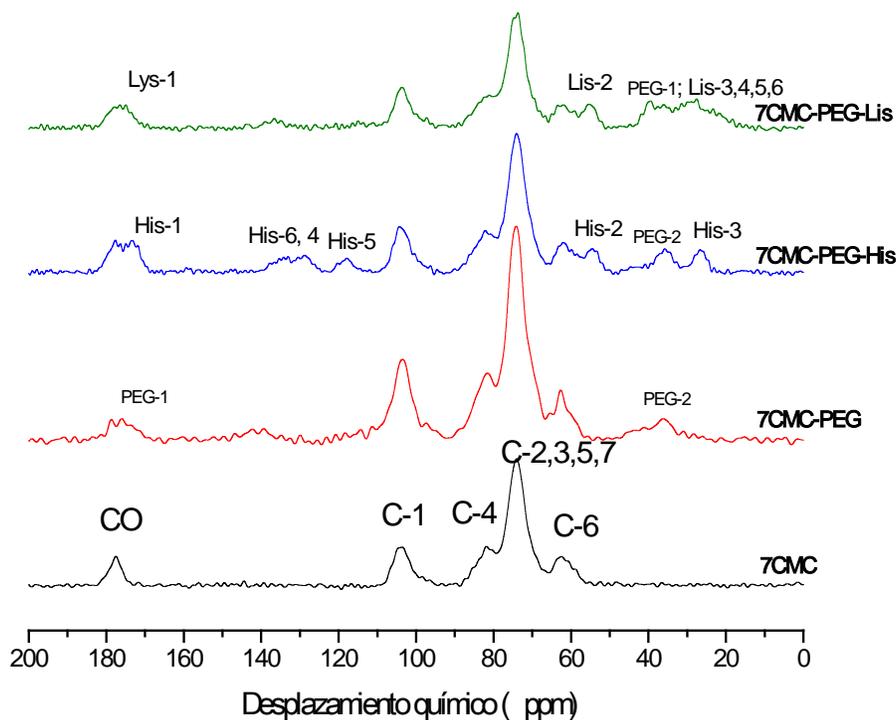
Con respecto al espectro del copolímero con lisina, <sup>13</sup>C MC-PEG-Lis, se observa la amplitud de los carbonos alifáticos C3, C4, C5 y C6 en la región de 20-39 ppm, esto probablemente como consecuencia de una interacción de la lisina con el copolímero a través del grupo amino terminal del aminoácido, reduciendo así el movimiento de los cuatro carbonos.

En el caso de los espectros de los copolímeros <sup>13</sup>C MC-PEG-Lis y <sup>13</sup>C MC-PEG-His, se observa el mismo comportamiento respecto a los copolímeros de bajo peso molecular <sup>13</sup>C MC-PEG-Lis y <sup>13</sup>C MC-PEG-His.

Se obtuvieron copolímeros funcionalizados con polietilenglicol, a través de enlaces tipo éster, y aminoácidos a través de enlaces tipo amida.



**Figura 13.** Espectro  $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN de la carboximetilcelulosa de bajo peso molecular (3CMC), carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol (3CMC-PEG), carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol e histidina (3CMC-PEG-His), carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol y lisina (3CMC-PEG-Lis), lisina (Lis), histidina (His).



**Figura 14.** Espectro  $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN de la carboximetilcelulosa de alto peso molecular (7CMC), carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol (7CMC-PEG), carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol e histidina (3CMC-PEG-His); carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol y lisina (7CMC-PEG-Lis).

En la Figura 15, se presentan las curvas termogravimétricas de las muestras 3CMC, 3CMC-PEG, 3CMC-PEG-His y 3CMC-PEG-Lis. En la Figura 16 se presentan los termogramas de las muestras 7CMC, 7CMC-PEG, 7CMC-PEG-His y 7CMC-PEG-Lis. En general la degradación de los polímeros se produce en dos etapas. La primera etapa ocurre de 30 a 150°C y se pierde del 2 al 15% en peso, que se atribuye a la pérdida de agua adsorbida (fisisorbida en superficie). En la segunda etapa, entre 250-460 °C, las muestras pierden el 30-40% en peso debido a la degradación de la cadena lateral y la pérdida de  $\text{CO}_2$  [261-262].

En la Tabla 8 se resumen los porcentajes de pérdida en peso de los copolímeros y las temperaturas a las cuales ocurren. Comparando los termogramas de 3CMC y 3CMC-PEG, se observa que se desorbe más agua físiosorbida en 3CMC-PEG. En la segunda etapa de pérdida de peso, la presencia de PEG marca una diferencia del 6 % en pérdida en peso.

Las curvas de las muestras con lisina e histidina, 3CMC-PEG-His y 3CMC-PEG-Lis, muestran más de dos etapas de degradación. Las dos pérdidas de masa entre 150 y 260 °C se pueden atribuir no solo a la pérdida de CO<sub>2</sub>, sino también a la pérdida a los grupos -OCH<sub>3</sub> provenientes del PEG y los grupos -NH<sub>2</sub>-R de los aminoácidos.

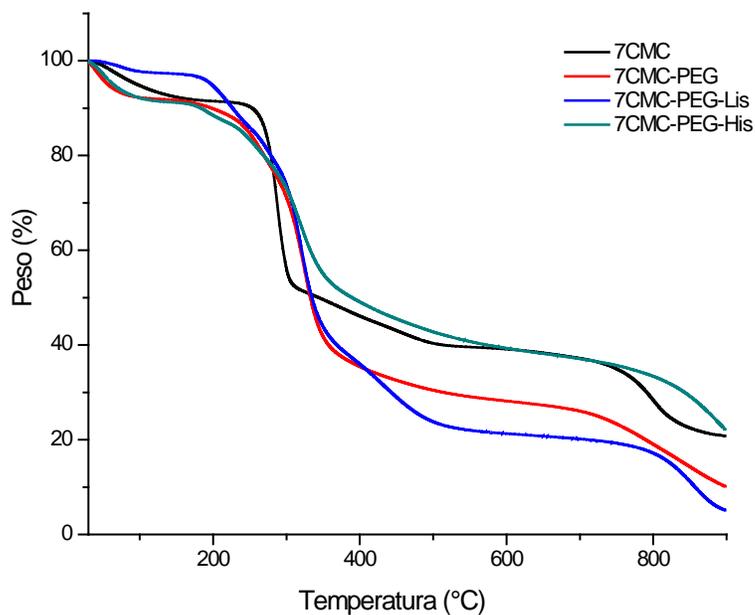
El termograma de la muestra 7CMC-PEG respecto a 7CMC muestra una diferencia muy significativa del 28% de pérdida en peso en la segunda etapa. En el caso de las muestras con aminoácidos, 7CMC-PEG-Lis y 7CMC-PEG-His, se observan 2 etapas más de pérdida de peso respecto a 7CMC debido a la presencia de aminoácidos y PEG.

**Tabla 8.** Datos de las curvas termogravimétricas de la carboximetilcelulosa y de los copolímeros.

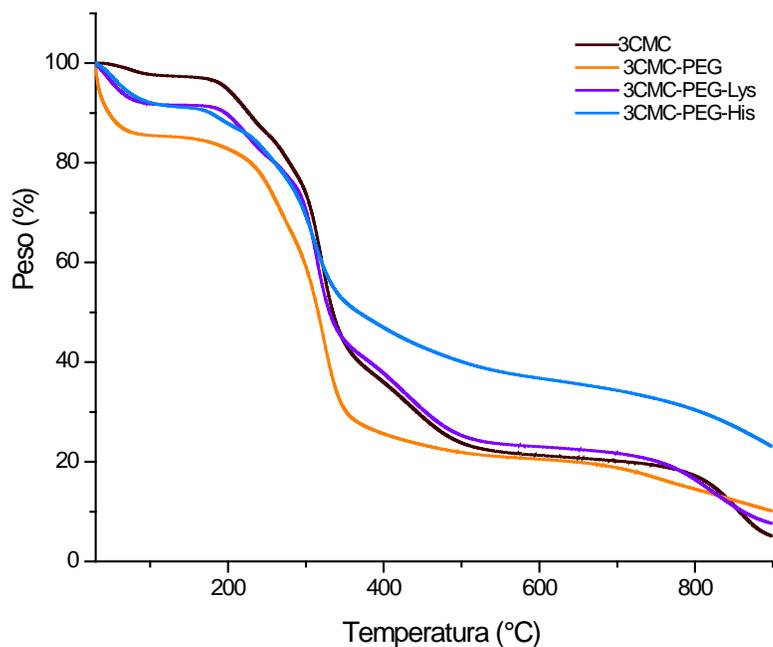
Muestra	Región de descomposición	Temperatura (°C)		Pérdida de peso (%)
		Inicio	fin	
7CMC	1°	30	175	8%
	2°	175	350	42%
7CMC-PEG	1°	30	150	8%
	2°	150	280	14%
	3°	280	420	43%
7CMC-PEG-His	1°	30	150	8%
	2°	150	215	5%
	3°	215	270	10%
	4°	270	450	30%
7CMC-PEG-Lis	1°	30	150	2%
	2°	150	250	13%
	3°	250	280	9%
	4°	280	400	40%
3CMC	1°	30	150	2%
	2°	150	255	14%
	3°	250	380	40%
3CMC-PEG	1°	30	150	15%
	2°	150	285	20%
	3°	285	450	40%
3CMC-PEG-His	1°	30	150	8%
	2°	150	250	8%
	3°	250	382	39%
3CMC-PEG-Lis	1°	30	150	8%
	2°	150	210	6%
	3°	210	270	8%
	4°	270	460	34%

---

La funcionalización de la carboximetilcelulosa con polietilenglicol y aminoácidos conlleva a una temperatura mayor de descomposición en comparación a la carboximetilcelulosa, es decir, los copolímeros son térmicamente más estables que 7CMC y 3CMC.



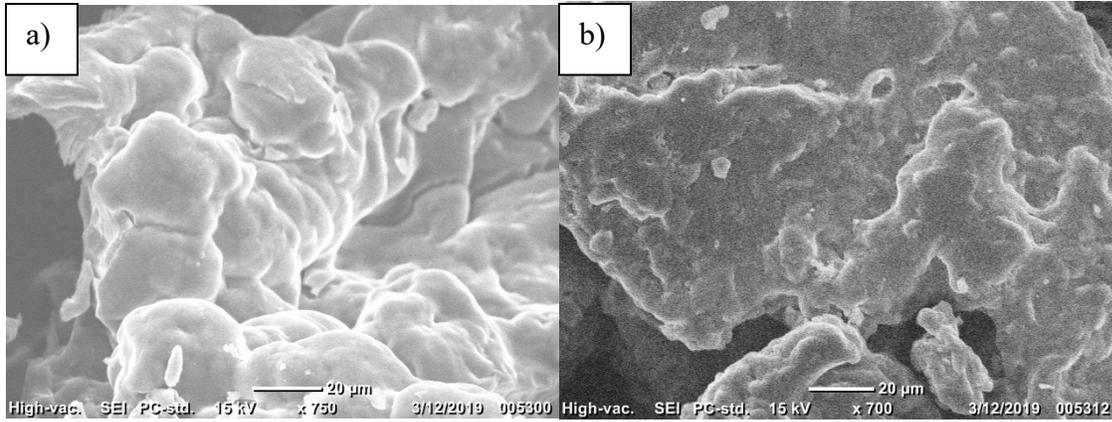
**Figura 15.** Curvas termogravimétricas de la carboximetilcelulosa de alto peso molecular (7CMC), carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol (7CMC-PEG), carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol e histidina (7CMC-PEG-His) y carboximetilcelulosa de alto peso molecular funcionalizada con polietilenglicol y lisina (7CMC-PEG-Lis).



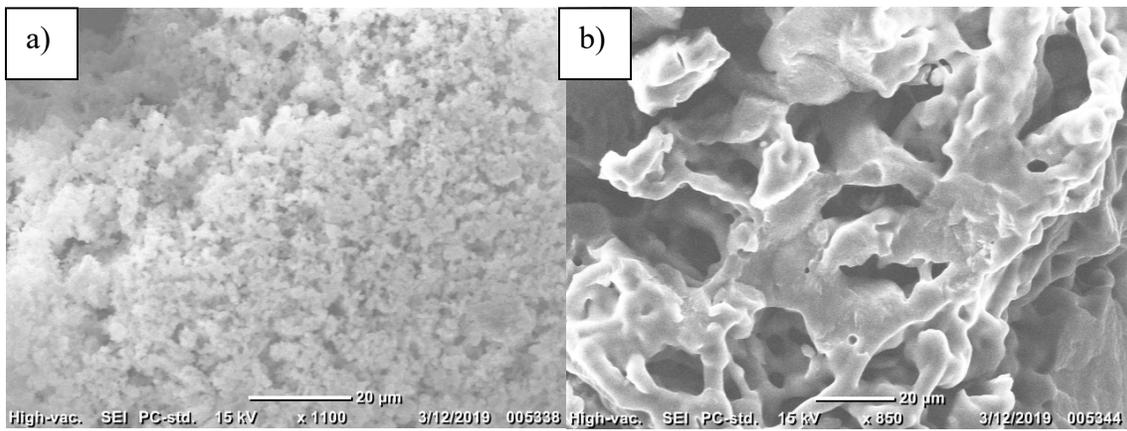
**Figura 16.** Curvas termogravimétricas de la carboximetilcelulosa de bajo peso molecular (3CMC), carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol (3CMC-PEG), carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol e histidina (3CMC-PEG-His) y carboximetilcelulosa de bajo peso molecular funcionalizada con polietilenglicol y lisina (3CMC-PEG-Lys).

#### IV.1.2 Morfología de los copolímeros

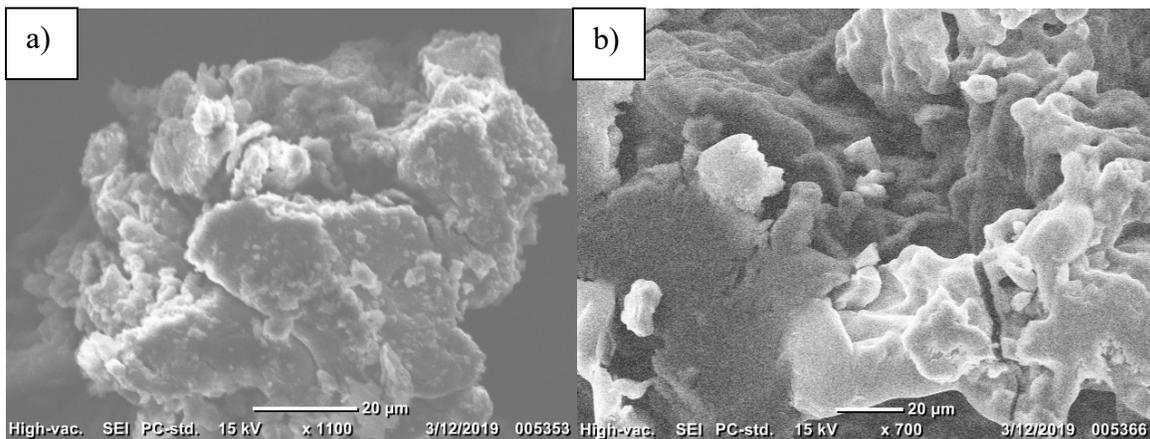
En las Figuras 17, 18 y 19 se presentan las micrografías SEM de los copolímeros obtenidos con carboximetilcelulosa, PEG y aminoácidos. En la Figura 17, las micrografías muestran diferencias morfológicas significativas entre los copolímeros 3CMC-PEG y 7CMC-PEG. La muestra de alto peso molecular se construye de partículas laminadas que se apilan para formar una superficie que tiende a ser lisa, mientras que las muestras de bajo peso molecular forma glomerados con una superficie rugosa. Es importante decir que la diferencia en el peso molecular durante la síntesis es crucial para provocar cambios morfológicos.



**Figura 17.** Micrografías de los copolímeros sin aminoácido. a) 3CMC-PEG, b) 7CMC-PEG



**Figura 18.** Micrografías de los copolímeros con aminoácido-lisina. a) 3CMC-PEG-Lis, b) 7CMC-PEG-Lis



**Figura 19.** Micrografías de los copolímeros con aminoácido-histidina. a) 3CMC-PEG-His, b) 7CMC-PEG-His

---

En la Figura 18 se muestran las imágenes obtenidas de los copolímeros con lisina, 3CMC-PEG-Lis y 7CMC-PEG-Lis. Las propiedades morfológicas se modifican con la adición de lisina, en el caso de la muestra con 7CMC-PEG-Lis no se mantiene con una superficie tipo láminas apiladas como las observadas en 7CMC-PEG, al contrario, se forman aglomerados para formar partículas de forma irregular, observándose una superficie más porosa. La muestra 3CMC-PEG-Lis presenta una superficie mucho menos densa respecto a la muestra 3CMC-PEG, es decir, aumenta la porosidad en la escala microscópica, donde las partículas muestran formas esféricas.

En la Figura 19 se muestran las imágenes de los dos copolímeros que contienen histidina. Donde también se observan cambios evidentes como consecuencia de la presencia del aminoácido. Por un lado, el copolímero de bajo peso molecular, 3CMC-PEG-His, provoca que la superficie sea menos rugosa y resulta en una morfología de láminas apiladas. Por otro lado, en 7CMC-PEG-His las partículas se aglomeran para formar partículas irregulares. Con esto se confirma que la funcionalización con aminoácidos genera cambios morfológicos. La aglomeración de las partículas deja espacios vacíos que posiblemente pueden contribuir a la adsorción de material genético.

Los copolímeros 3CMC-PEG y 7CMC-PEG se funcionalizaron con 30% de lisina e histidina. En la Tabla 9 se muestra el análisis elemental de los copolímeros con aminoácidos que consisten principalmente de C, O y N. Se observa que el contenido de nitrógeno tanto en % en peso como % en átomos varía en dos unidades entre el copolímero de alto peso molecular y bajo peso molecular. Eso quiere decir que el copolímero de alto peso molecular tiene un mayor grado de funcionalización con lisina respecto a 3CMC-PEG-Lis, que se atribuye al mayor número de unidades que tiene la carboximetilcelulosa de alto peso molecular.

Se observó el mismo comportamiento con los copolímeros de histidina, donde el copolímero de alto peso molecular varía en tres unidades entre el copolímero de bajo peso molecular.

**Tabla 9.** Análisis elemental de los copolímeros por EDS (Espectrometría de dispersión de energía de rayos X)

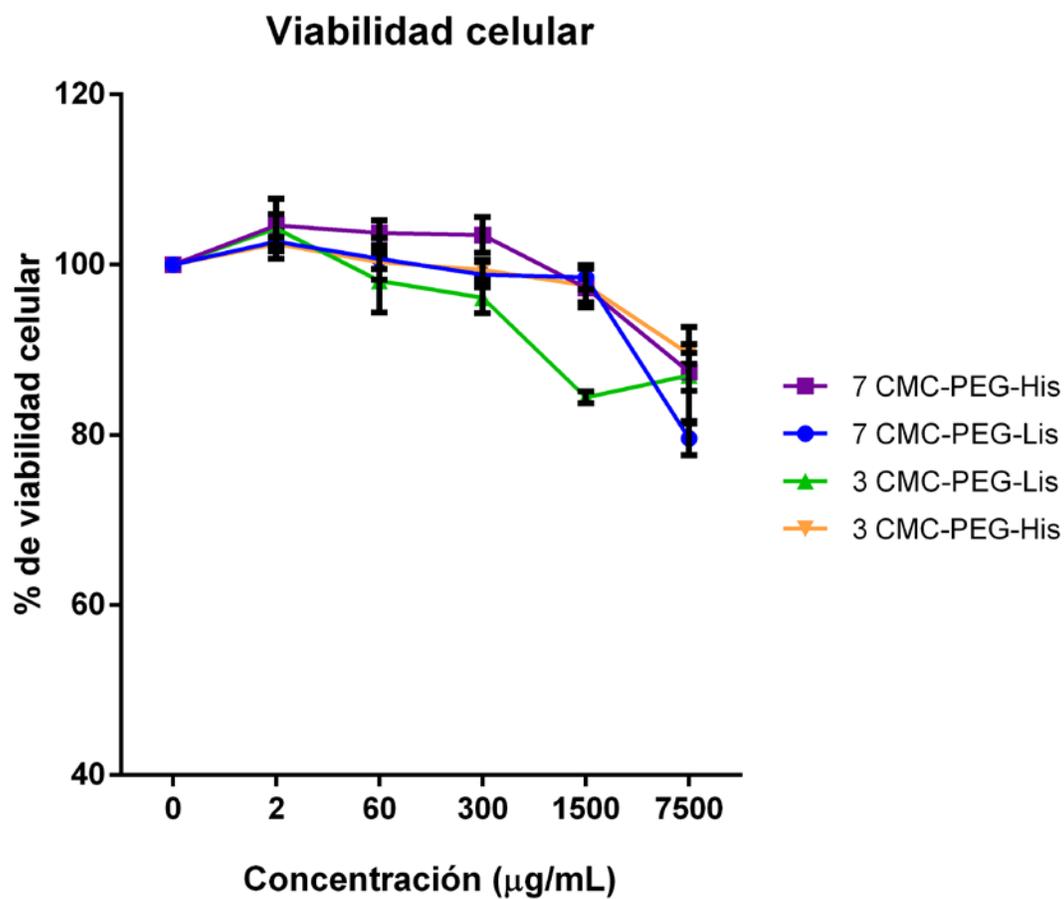
Copolímeros	% peso	% átomos
3CMC-PEG	C 46.82 O 53.18	C 53.98 O 46.02
7CMC-PEG	C 45.41 O 54.59	C 52.56 O 47.44
3CMC-PEG-Lis	C 36.75 O 23.55 N 39.70	C 42.36 O 23.28 N 34.36
7CMC-PEG-Lis	C 32.70 O 25.33 N 41.97	C 38.06 O 25.27 N 36.67
3CMC-PEG-His	C 34.82 O 32.31 N 32.97	C 39.94 O 31.68 N 28.38
7CMC-PEG-His	C 35.17 O 28.86 N 35.97	C 40.46 O 28.47 N 31.07

#### IV.1.3 Viabilidad celular

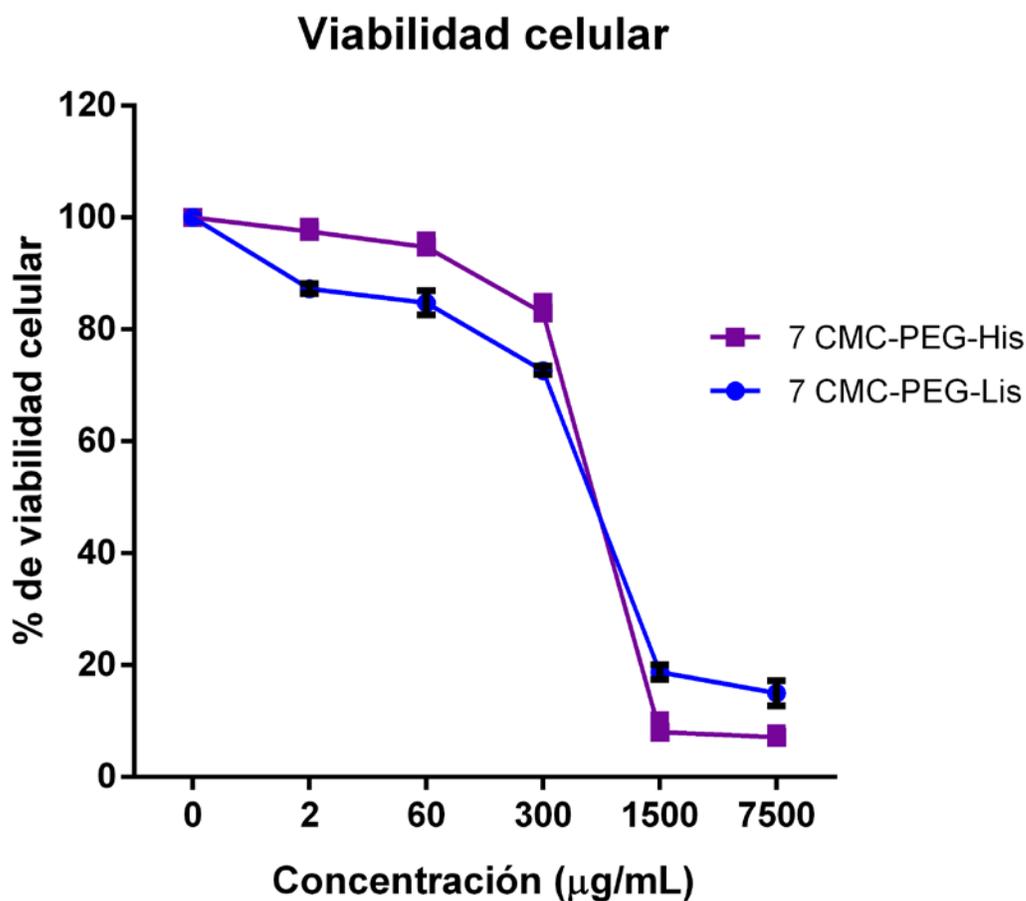
Una vez que se demostró que los aminoácidos pueden funcionalizar al copolímero, y que la naturaleza del aminoácido influye en las propiedades morfológicas del material resultante, fue momento de evaluar el efecto de los copolímeros en la viabilidad de las células HeLa, la cual se evaluó mediante un ensayo de MTT utilizando. Las células se incubaron con las nanopartículas y los copolímeros durante 24 h, posteriormente se cuantificó la viabilidad celular en función de la actividad metabólica total, resultante de la reducción del reactivo tipo azoico.

Primero se evaluó el efecto de los copolímeros en la viabilidad celular (en células HeLa) y posteriormente el efecto de las nanopartículas.

En general todos los copolímeros mostraron bajos niveles de citotoxicidad (75% de viabilidad), Figura 20. Por otra parte, los copolímeros de tamaño nanométrico, Figura 21, mostraron citotoxicidad a concentraciones mayores a 300 µg/mL (75 % de viabilidad), lo que sugiere, las nanopartículas son buenos candidatos como nanoacarreadores y a que mantienen la viabilidad celular,



**Figura 20.** Viabilidad por centual (%) de células HeLa expuestas a distintas concentraciones de l copolímero después de 24 horas. Cada punto es el valor promedio obtenido en tres experimentos independientes por triplicado. Las barras representan la desviación estándar.



**Figura 21.** Viabilidad porcentual de células HeLa expuestas a distintas concentraciones de nanopartículas poliméricas después de 24 horas. Cada punto es el valor promedio obtenido en tres experimentos independientes por triplicado. Las barras representan la desviación estándar.

Antes de evaluar la capacidad del copolímero para estabilizar y liberar siRNA, éste se evaluó primero con un estándar (RNA ribosomal).

## IV.2 Copolímeros cargados con RNA ribosomal

### IV.2.1 Tamaño de partícula y potencial Zeta

En la Tabla 10 se reportan los datos de tamaño de partícula, índice de polidispersidad (PDI por sus siglas en inglés) y los valores de potencial Zeta de cada uno de los copolímeros. En

---

general las muestras presentan un tamaño de partícula entre 9 y 14 nm. El tamaño de las nanopartículas de los copolímeros preparados con 7CMC fue más pequeño respecto a las preparadas a partir de 3CMC, lo que sugiere que el peso molecular es un parámetro importante que influye en la interacción entre celulosa y polietilenglicol.

Considerando los copolímeros con y sin carga de RNA ribosomal, no existe una correlación directa en el aumento de tamaño de partícula con la incorporación de los aminoácidos. Por otra parte la carga de los copolímeros de alto peso molecular respecto a los de bajo peso molecular sin RNA, muestran una carga más negativa que se puede atribuir al mayor número de unidades de carboximetilcelulosa en el polímero de mayor peso molecular, donde los grupos carboxilo aportan en su mayoría la carga total del polímero.

Por otra parte, se observa una notable diferencia en el potencial Z entre los polímeros que contienen 3CMC y 7CMC. Cuando los copolímeros con 7CMC se funcionalizan con aminoácidos, el potencial Z llega a valores más positivos con respecto al copolímero libre de aminoácidos. En contraste, se observó la tendencia opuesta para la serie que contiene 3CMC. Este resultado se puede explicar ya que el número de unidades repetitivas y el peso molecular entre 7CMC y 3CMC son muy diferentes, por lo tanto, la sustitución de los grupos carboxilo de finirá las interacciones en la superficie, así como la carga electrostática.

Se observó que los copolímeros que contienen 7CMC fueron los materiales con los valores más altos de polidispersidad. Donde el ancho del 30% de PDI a menudo se considera la frontera entre mono y polidisperso. Esto concuerda con un PDI igual a 0.09, lo que lleva a la recomendación, ya que  $PDI < 0.1$  es monodispersa y  $PDI > 0.1$  es multimodal. Por lo tanto, todos los copolímeros preparados son multimodales excepto 3CMC-PEG-Lis [263-265].

**Tabla 10.** Tamaño de partícula y potencial Z de los copolímeros

Muestra	Sin RNA ribosomal			Cargados con RNA ribosomal		
	Tamaño de partícula ± SD (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	Tamaño de partícula(nm)	PDI	Potencial Z (mV)
<b>7CMC-PEG</b>	9.83± 0.12	0.151	-25.3	12.98±0.07	0.22	-25.9
<b>7CMC-PEG-Lis</b>	12.24±0.07	0.34	-25.06	9.14±0.11	0.16	-17.6
<b>7CMC-PEG-His</b>	11.39±0.075	0.25	-24.66	11.27±0.09	0.22	-20.9
<b>3CMC-PEG</b>	11.2±0.035	0.25	-3.22	14.18±0.05	0.27	-27.6
<b>3CMC-PEG-Lis</b>	13.01±0.039	0.099	-5.95	11.92±0.15	0.22	-19.9
<b>3CMC-PEG-His</b>	13.9±0.049	0.175	-9.84	13.96±0.02	0.23	-23.4

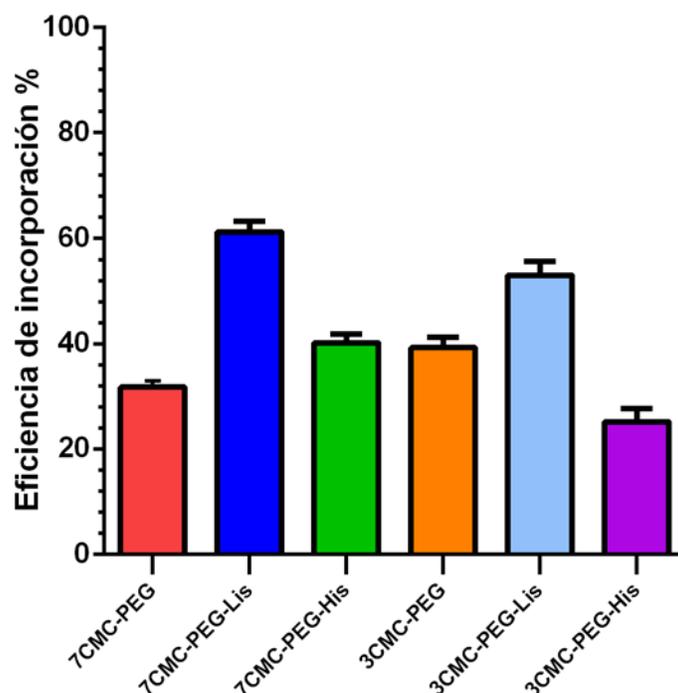
#### IV.2.2 Incorporación del material genético

Las diferencias encontradas en el tamaño de partícula y el potencial zeta como una función del aminoácido que funcionaliza al copolímero fueron claras y ahora se procedió a mostrar si estas diferencias son suficientes para conducir a diferencias significativas en la encapsulación de RNA. En la Figura 22 se muestra la gráfica de la cantidad de RNA ribosomal (expresado en % de RNA) que se adsorbió en los diferentes copolímeros. Se observó que los copolímeros funcionalizados con lisina presentaron un porcentaje de adsorción mayor respecto a los copolímeros con histidina. La muestra con menor RNA ribosomal adsorbido fue la muestra 3CMC-PEG-His.

La Tabla 10 incluye el tamaño de partícula antes y después de cargar el RNA ribosomal. En el caso de los copolímeros con lisina, 7CMC-PEG-Lis y 3CMC-PEG-Lis, se observa una disminución en el tamaño de partícula después de cargarlo con RNA ribosomal, en el caso de 7CMC-PEG-Lis, la disminución es alrededor de 3 nm, mientras que 3CMC-PEG-Lis solo disminuyó aproximadamente 1 nm. Esto se puede atribuir a la condensación de las cargas positivas del copolímero y las cargas negativas del grupo fosfato del RNA ribosomal, como consecuencia, se observa una disminución del tamaño de las partículas,

---

este fenómeno también se ha observado en complejos de tipo (lípidos catiónicos – material genético) [266-267]. No obstante, los copolímeros funcionalizados con histidina presentan casi el mismo tamaño de partícula antes y después de cargarlos con RNA.



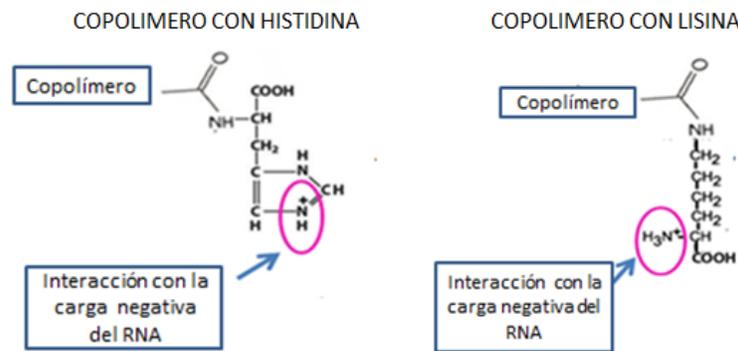
**Figura 22.** Eficiencia de incorporación (%) de RNA ribosomal en las nanopartículas poliméricas.

La funcionalización de los copolímeros con grupos ionizables es parte esencial para la condensación de RNA ribosomal. Aquí cabe mencionar que a pH 7.4 los grupos carboxilo del aminoácido están presentes en la forma  $-COOH$  y los grupos amino libres unidos al carbono (los otros grupos amino forman un enlace éster con CMC) están presentes en la forma protonada,  $NH_3^+$ .

El análisis por  $^{13}C$  RMN de los copolímeros concluyó que los grupos amino que formaron el enlace amida con las cadenas de carboximetilcelulosa son el amino terminal en el caso de la lisina y el grupo amino unido al carbono asimétrico de la histidina. Por lo tanto, el grupo amino libre que interacciona con la carga negativa del RNA es el grupo imidazol

en el caso de la histidina y el grupo amino unido al carbono asimétrico en el caso de la lisina, Figura 23.

Se observa una mayor absorción de RNA ribosomal en el caso del copolímero con lisina debido a que se favorece la condensación de RNA, por otra parte los copolímeros con histidina no son tan favorecidos cuando interactúan con el grupo imidazol. Por lo tanto, la interacción electrostática entre los RNA y los polímeros se convierte en un factor determinante en la interacción entre el grupo amino con carga positiva y el RNA negativo y esto puede afectar directamente en la cantidad de RNA adsorbido en el copolímero.



**Figura 23.** Copolímeros con lisina e histidina cargados con RNA ribosomal

Además, la presencia de RNA en las nanopartículas poliméricas cambia significativamente los valores del potencial Z. Con el RNA, el potencial z es más positivo para el grupo de copolímeros con 7CMC y más negativo para muestras preparadas a partir de 3CMC. El RNA está anclado a la superficie de los copolímeros, el cual está determinado por las propiedades de la superficie de los copolímeros.

Los materiales con RNA, presentan un potencial Z más positivo cuando están funcionalizados con lisina, mientras que los valores más negativos corresponden a los polímeros libres de aminoácidos. Por lo tanto, las propiedades de la superficie de los copolímeros son cruciales para obtener materiales híbridos (copolímeros-RNA), y a que eso será determinante tanto para el grado de encapsulamiento del material genético en el polímero, como tamaño de partícula y potencial Z.

### IV.2.3 Estabilidad de los complejos de tamaño nanométrico (copolímero/material genético)

Para evaluar la estabilidad de las nanopartículas cargadas con RNA se suspendieron en una solución buffer de fosfatos a diferentes valores de pH (5, 6 y 7.4) y se incubaron a temperatura ambiente a diferentes tiempos (1 hora, 24 horas y una semana). Bajo estas condiciones se midió el tamaño de partícula. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

El valor de pH es un parámetro que influye en el tamaño de partícula, se observa que los copolímeros funcionalizados con aminoácidos se mantuvieron estables durante períodos de hasta una semana, sin embargo, las muestras sin aminoácidos, 7CMC-PEG y 3CMC-PEG, forman aglomerados por períodos de hasta 24 h. Se debe concluir que la incorporación de aminoácidos en las cadenas poliméricas genera estabilidad en el medio acuoso.

**Tabla 11.** Tamaño de partícula de los copolímeros cargados con RNA ribosomal a diferentes valores de pH

Muestra		Agua desionizada			pH 5			pH 6			pH 7.4		
		1 hora	24 horas	1 semana	1 hora	24 horas	1 semana	1 hora	24 horas	1 semana	1 hora	24 horas	1 semana
7CMC-PEG	Tamaño (nm) PDI	12.98 0.22	29.09 0.2	50.72 0.38	9.75 0.05	9.49 0.1	9.74 0.16	9.81 0.09	11.72 0.28	120.86 0.34	9.73 0.06	11.51 0.24	10.32 0.16
7CMC-PEG-Lis	Tamaño (nm) PDI	9.34 0.16	8.97 0.14	9.53 0.15	10.01 0.13	10.04 0.19	10.02 0.13	9.82 0.1	9.81 0.16	9.89 0.09	9.89 0.13	45.95 0.15	10.04 0.18
7CMC-PEG-His	Tamaño (nm) PDI	11.27 0.22	11.94 0.15	13.71 0.32	9.22 0.12	9.78 0.09	9.88 0.1	9.66 0.07	9.75 0.11	9.98 0.13	10.04 0.08	9.96 0.16	10.09 0.14
3CMC-PEG	Tamaño (nm) PDI	14.18 0.27	26.37 0.16	176.3 0.28	10.12 0.12	10.17 0.16	10.28 0.16	9.74 0.08	10.39 0.2	9.96 0.13	10.3 0.31	10.01 0.22	11.65 0.31
3CMC-PEG-Lis	Tamaño (nm) PDI	11.92 0.22	12.12 0.24	12.31 0.22	10.05 0.08	11.52 0.22	9.67 0.06	9.76 0.07	9.89 0.09	10.54 0.15	11.16 0.12	119.1 0.23	59.75 0.18
3CMC-PEG-His	Tamaño (nm) PDI	13.96 0.23	15.39 0.4	14.62 0.45	10.43 0.17	10.58 0.16	10.41 0.18	11.02 0.24	13.62 0.35	11.0 0.26	14.09 0.21	10.04 0.21	10.51 0.25

El tamaño de partícula de los copolímeros con aminoácidos no varía drásticamente a pH ácido, en general podría sugerirse que son parcialmente estables desde pH 7,4 hasta pH 5. Curiosamente la muestra de 7CMC-PEG-Lis fue la que tuvo el tamaño de partícula más

---

estable dentro de este intervalo de pH. Esto se puede atribuir al valor del punto isoelectrico (pH donde la molécula tiene una carga neta de cero), en el caso de la lisina es 9.74, por lo tanto a pH 7.4 es probable que los grupos amino y el grupo carboxilo estén completamente protonados. La histidina tiene un punto isoelectrico de 7.59 por lo tanto a pH fisiológico, es probable que no todos los grupos  $-\text{COOH}$  y  $\text{NH}_2$  del copolímero estén protonados, Figura 24.

#### **IV.2.4 Complejos de tamaño nanométrico (copolímero/material genético) sensibles al pH**

La Figura 25 grafica el tamaño de partícula de los copolímeros con RNA ribosomal en función del pH. Se observa que el tamaño de las nanopartículas disminuye cuando el pH se vuelve más ácido. Como se mencionó anteriormente, los grupos carboxilo están presentes en la forma  $-\text{COOH}$  y los grupos amino libres están presentes en la forma protonada,  $\text{NH}_3^+$ . Por lo tanto, la interacción electrostática entre los RNA y los polinucleótidos está fuertemente asociada entre el grupo amino y el RNA negativo, por lo tanto, el tamaño de la partícula disminuye, el cual se favorece a pH bajo tanto en los copolímeros con histidina y lisina, Figura 24. Sin embargo, no se han observado cambios significativos en el tamaño de partícula en los copolímeros de 7CMC-PEG y 3CMC-PEG cuando se cambia el pH, debido a la falta de aminoácidos que le dan propiedades ionizables al polímero.

La incorporación de aminoácidos sensibles a cambios de pH en los copolímeros, resulta de gran relevancia al responder a estímulos internos de la célula como es el caso del escape endosomal, la acidificación del endosoma degradaría el complejo copolímero-RNA, evitando su liberación a las células blanco, sin embargo, la incorporación de grupos ionizables generan una “esponja de protones”, esto provoca la ruptura de la membrana endosómica como se ha reportado en algunos trabajos previos [268], evitando la degradación del copolímero-RNA. Los copolímeros obtenidos podrían funcionar como posibles candidatos para el transporte de material genético en diversos padecimientos.

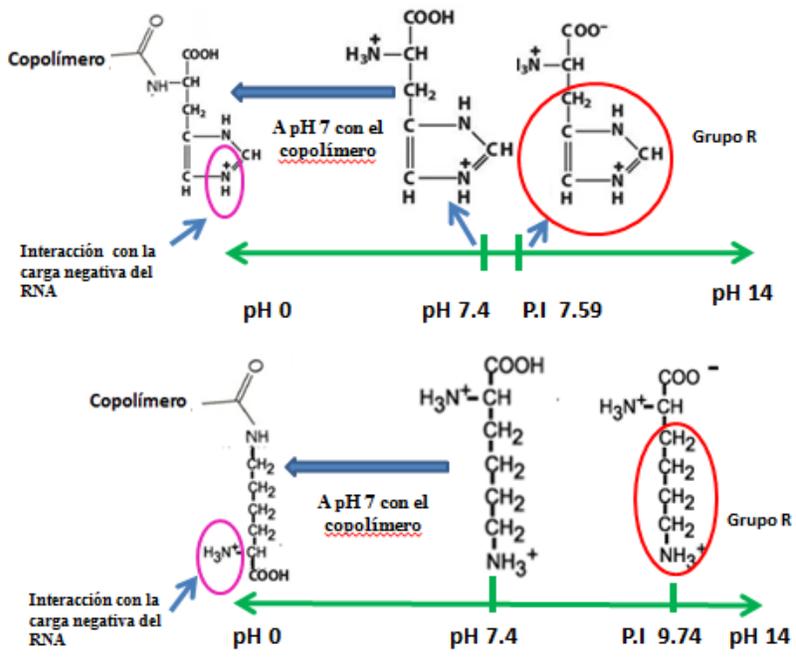


Figura 24. Ionización de los copolímeros en función del pH.

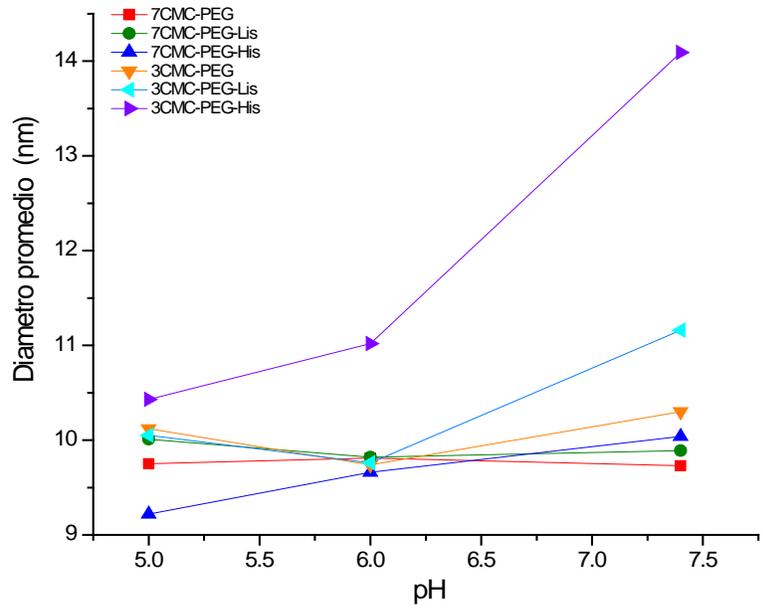
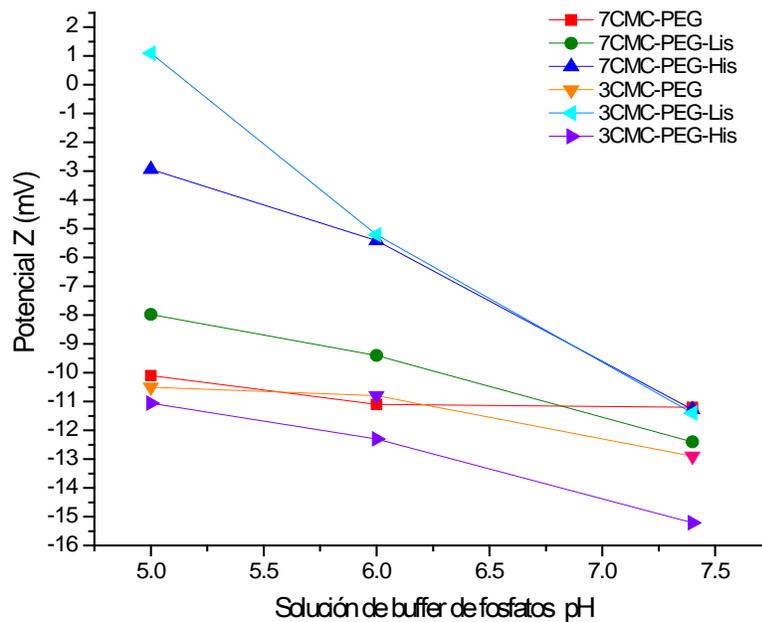


Figura 25. Diámetro promedio de tamaño de partícula en función de pH de los copolímeros cargados con RNA ribosomal.



**Figura 26.** Potencial Z en función de l pH de los copolímeros cargados con RNA ribosomal.

En la Figura 26 se muestra la gráfica de potencial Z en función del pH. Se observa que los polímeros presentaron una carga negativa en un entorno fisiológico (pH-7.4), no obstante, la carga de la superficie fue ligeramente más positiva a un pH más bajo. El cambio en el potencial Zeta se puede atribuir a la protonación de los grupo amino en condiciones de pH bajo.

Las cargas superficiales de los polímeros desempeñan un papel en la captación celular y la estabilidad de la sangre. Generalmente, los polímeros con carga positiva promueven la captación celular debido a la mayor afinidad por la membrana celular negativa, sin embargo se ha observado que los sistemas con cargas positivas altas generan citotoxicidad, además activan al sistema inmunológico ya que las proteínas séricas se ven afectadas al interactuar con los materiales cargados positivamente. Por ello es importante diseñar materiales que permiten una adecuada captación celular pero que a la vez eviten

---

citotoxicidad, el cual se puede lograr modulando adecuadamente la carga superficial de los materiales acarreadores de RNA [269].

En resumen, los resultados sugieren que los polímeros responden a cambios en el pH en el intervalo de 5 y 6. Por lo tanto, los polímeros podrían convertir reversiblemente las cargas de la superficie en respuesta al pH como consecuencia de la protonación de los grupos carboxilo y amina, lo que facilitaría el escape endosomal y la captación celular. La carga del copolímero dependiente del pH podría modularse variando la relación molar de grupos carboxilo o amino.

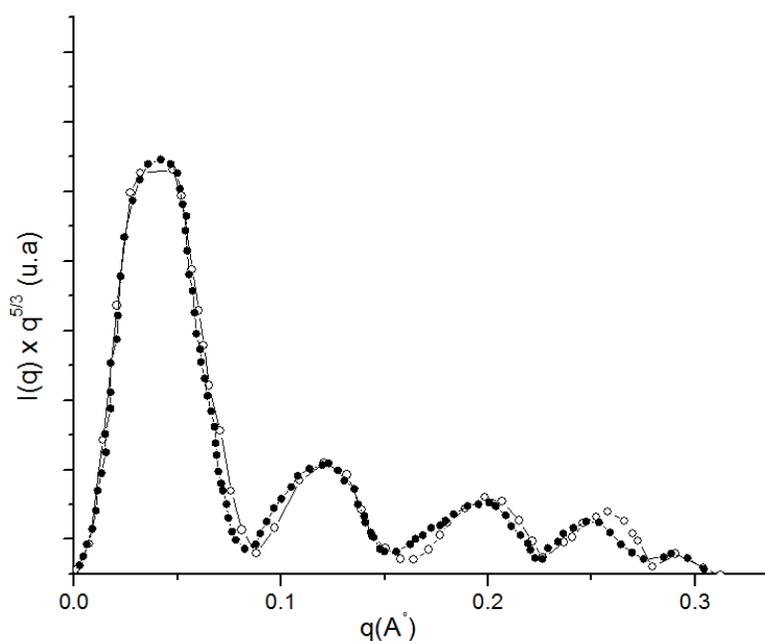
#### **IV.2.5 Naturaleza del ensamble copolímeros-RNA ribosomal**

El tamaño de las partículas de copolímero se estimaron a partir de las curvas de Kratky obtenidas por SAXS y suponiendo un sistema de esferas polidispersas como lo sugiere la gráfica  $I(q) \times q^{5/3}$  (u.a) versus  $q$  (Å), Figura 27, [253-257].

En la Tabla 12, se puede ver que el tamaño de los copolímeros con RNA varía entre 12.42 y 13.88 nm. El mayor tamaño de partícula se logra cuando los copolímeros se preparan a partir de 3CMC, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por DLS. En general, se observa que los copolímeros cargados con RNA y funcionalizados con histidina son más grandes que los funcionalizados con lisina, lo que confirma que la protonación de aminoácidos es importante para determinar la interacción del copolímero con el RNA. En este contexto, la dimensión fractal es un parámetro útil, ya que revela que la carga de los sistemas copolímeros-RNA sin aminoácidos conduce a partículas de nsas esféricas. Sin embargo, la dimensión fractal disminuye cuando el RNA se incorpora a los copolímeros funcionalizados con aminoácidos, es decir, genera el aumento del tamaño de las partículas y la disminución de la densidad, en otras palabras, las esferas no son "duras" sino que responden a las interacciones de los aminoácidos con el copolímero y el RNA.

**Tabla 12.** Tamaño de partícula y dimension fractal de los copolímeros cargados con RNA ribosomal por SAXS

Muestra	Cargado con RNA ribosomal	
	Tamaño de partícula (nm)	Dimensión fractal
7CMC-PEG	12.42	2.81
7CMC-PEG-Lis	12.61	2.76
7CMC-PEG-His	12.97	2.62
3CMC-PEG	13.01	2.89
3CMC-PEG-Lis	13.14	2.73
3CMC-PEG-His	13.88	2.66



**Figura 27.** Perfil de Kratky de 7CMC-PEG-Lis cargado con RNA ribosomal (círculos vacíos) y, 7CMC-PEG-His cargado con RNA ribosomal (círculos llenos).

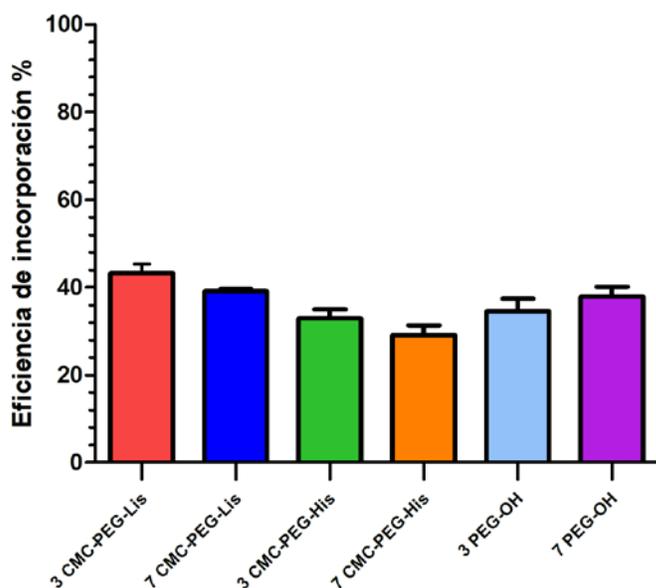
### IV.3 Copolímeros cargados con siRNA

#### IV.3.1 Eficiencia de incorporación de siRNA

En la Figura 28 se muestra la gráfica de la cantidad de siRNA, expresado en % de RNA, que se adsorbió en los diferentes copolímeros. Se observó que los copolímeros

---

funcionalizados con lisina presentaron un mayor porcentaje de adsorción (aproximadamente el 40%) respecto a los copolímeros con histidina, este mismo comportamiento se observó en el caso de los copolímeros cargados con RNA ribosomal.



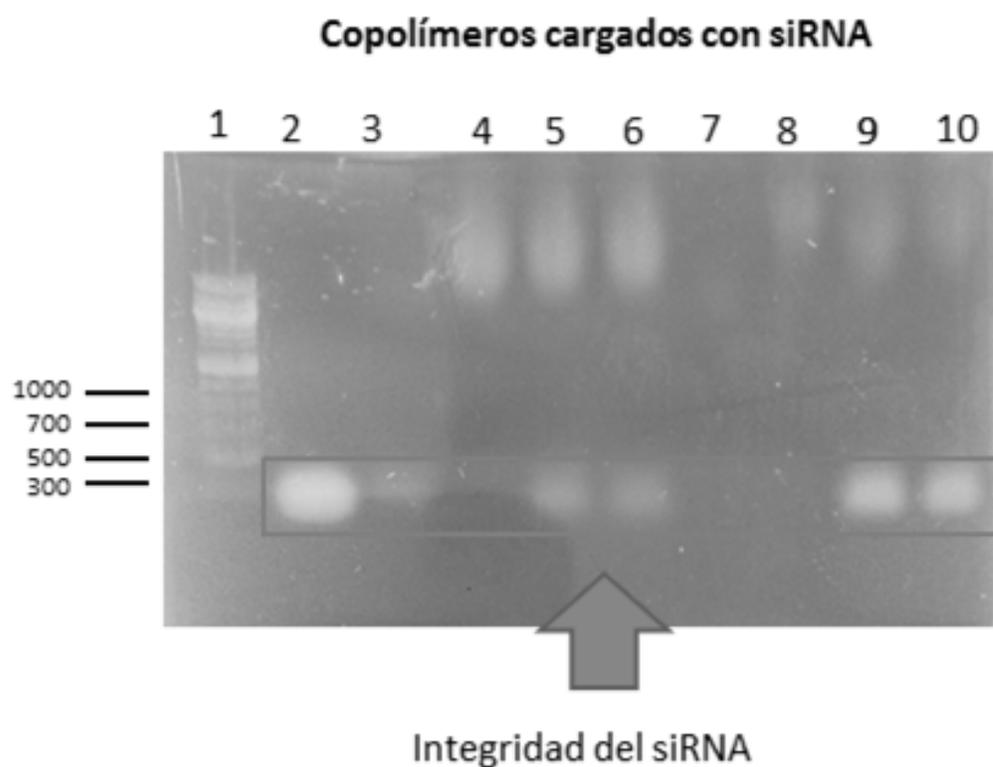
**Figura 28.** Eficiencia de incorporación (%) de siRNA en los copolímeros.

#### IV.3.2 Estabilidad de siRNA frente a RNAasa (ribonucleasa)

Antes de evaluar la capacidad del copolímero como acarreador de siRNA a células HeLa y ejercer su efecto de silenciamiento sobre el RNAm de ataxina, es importante evaluar su estabilidad frente a degradación por enzimas (RNAasa; ribonucleasa), debido a que los siRNA desnudos son vulnerables a la degradación por RNAasa.

En la Figura 29 se muestra la fotografía del gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio, donde se corrieron los copolímeros cargados con siRNA y el siRNA desnudo. Los complejos copolímeros-siRNA y el siRNA desnudo se incubaron a 8°C durante 1 hora y 24 horas en presencia de RNAasa. Se observa que durante una hora de incubación, la intensidad de la banda de siRNA (carril 3 de la fotografía) disminuye comparado con la banda de siRNA libre de nucleasas (carril 2), eso significa que el siRNA comienza a degradarse por la presencia de estas enzimas, mientras que a las 24 horas de incubación este se encuentra totalmente degradado (carril 7). Sin embargo, cuando este siRNA es

adsorbido en los copolímeros (7CMC-PEG-Lis y 7CMC-PEG-Lis), la integridad del siRNA permanece constante durante las 24 horas de incubación, observándose una mayor intensidad de la banda en el caso del complejo 7CMC-PEG-Lis-siRNA comparado con el complejo 3CMC-PEG-Lis-siRNA, por lo tanto se sugiere que hay una mayor estabilidad del siRNA con éste adsorbido en el copolímero 7CMC-PEG-Lis. Por lo anterior se considera que los copolímeros 3CMC-PEG-Lis y 7CMC-PEG-Lis ayudan a la estabilidad del siRNA frente a degradación por nucleasas, por lo tanto estos copolímeros se pueden utilizar para transportar siRNA ya que los protege de la degradación y además tienen la capacidad de adsorber siRNA como lo observamos en la Figura 28.



**Figura 29.** Fotografías de geles de agarosa representativos teñidos con bromuro de etidio en donde se corrieron los copolímeros cargados con siRNA. 1) Marcador de peso molecular, 2) siRNA sin RNasa, 3) siRNA incubado con RNasa durante 1 hora, 4) 3CMC-PEG-Lis en agua desionizada, 5) 3CMC-PEG-Lis cargado con siRNA, incubado en agua desionizada y RNasa durante 1 hora, 6) 3CMC-PEG-Lis cargado con siRNA,

---

incubado en agua desionizada y RNAsa durante 24 horas, 7) siRNA incubado con RNAsa por 24 horas, 8) 7CMC-PEG-Lis en agua desionizada, 9) 7CMC-PEG-Lis cargado con siRNA, incubado en agua desionizada y RNAsa durante 1 hora y 10) 7CMC-PEG-Lis cargado con siRNA, incubado en agua desionizada y RNAsa durante 24 horas.

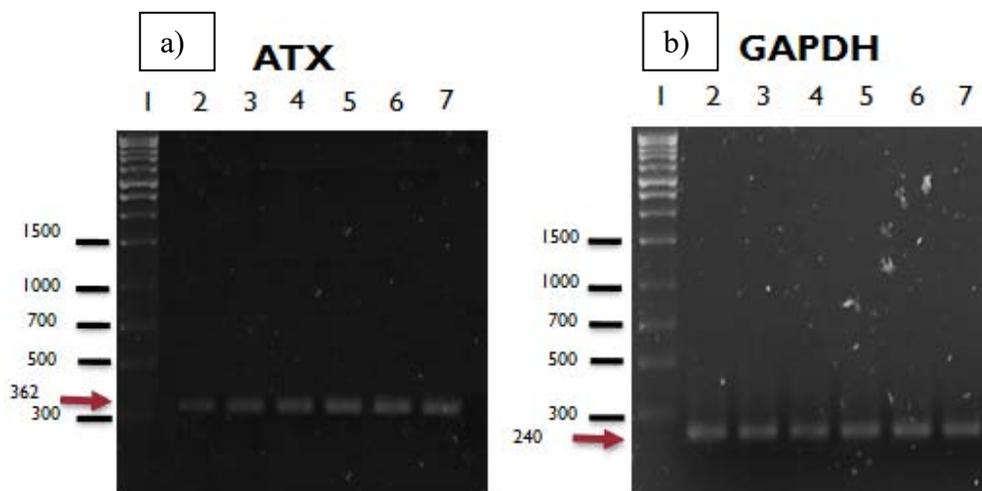
#### **IV.3.3 Evaluación de la expresión del RNA mensajero que codifica para ataxina 7.**

Se decidió analizar los niveles del RNAm de ataxina 7, debido a su asociación con la enfermedad de Ataxia tipo 7, que se caracteriza por tener una expansión repetida del triplete CAG en la región codificante del gen ATXN7 que codifica para dicha proteína.

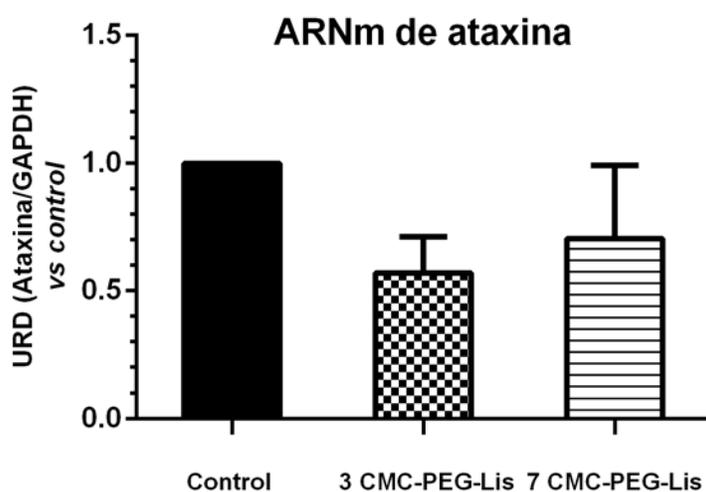
En la Figura 30 se observan fotografías representativas de los amplicones obtenidos por RT-PCR de ataxina y GAPDH (control de carga) en muestras tratadas con los nanovectores cargados con siRNA tranfectadas en células HeLa. En esta figura (inciso a) se observa que las células tratadas con los 3CMC-PEG-Lis y 7CMC-PEG-Lis cargadas con siRNA muestran una menor intensidad en sus bandas respecto al control, eso quiere decir que hubo una disminución en los niveles de RNAm de ataxina, sugiriendo que hay una actividad de silenciamiento del RNAm por parte del siRNA. Esto se comprueba con el análisis densitométrico de estas fotografías. En la Figura 31 se presentan los valores del análisis densitométrico. En este estudio se observa que hay diferencias en los niveles del RNAm que codifican para ataxina.

Las células tratadas con el copolímero 3CMC-PEG-Lis cargado con siRNA, muestra en el análisis densitométrico una disminución estadísticamente significativa en los niveles de RNAm de ataxina con respecto a los del grupo control. Lo anterior sugiere que hay una actividad de silenciamiento del mRNA que codifica para ataxina 7 por lo tanto regula la expresión de la proteína causante de la enfermedad.

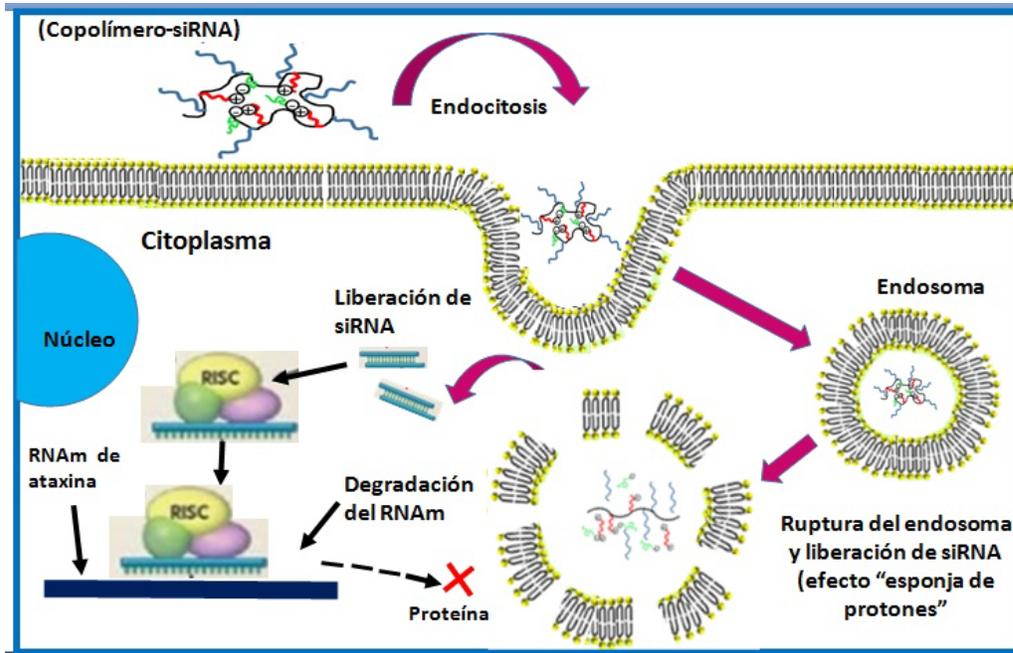
Estos resultados sugieren que los complejos (copolímero-siRNA) tienen la capacidad de transfectar a la célula, escapar del atrapamiento endosomal y finalmente ejercer su efecto sobre el RNAm de ataxina 7, Figura 32.



**Figura 30.** Fotografías de geles de agarosa representativos teñidos con bromuro de etidio en donde se corrieron los productos de RT-PCR de ataxina (a) y de GAPDH como control de carga (b). 1) marcador molecular, 2) IMAX, 3) lipo2000, 4) lipo 3000, 5) 3CMC-PEG-Lis, 6) 7CMC-PEG-Lis y 7) control



**Figura 31.** Gráfica del análisis densitométrico ajustado contra GAPDH y comparado contra el grupo control de todas las muestras estudiadas. Se utilizó el software Graph Pad 5.0 (San Diego CA, EUA) y un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró significativo.



**Figura 32.** Esquema representativo del ingreso del complejo de tamaño nanométrico (copolímero-siRNA) a la célula, la liberación de siRNA y su efecto de silenciamiento sobre el RNAm de ataxina 7 y finalmente su degradación.

Se propone que los copolímeros funcionan como acarreadores siRNA en células HeLa ya que logran penetrar a la célula con valores de potencial Z negativos y con tamaños de partícula entre 12 y 14 nm, evitan la degradación de siRNA frente a nucleasas. Además la incorporación de los grupos ionizables al copolímero favorece la incorporación de material genético y logran estabilizar las cargas negativas de siRNA, asimismo presentan respuesta a pH, la cual es conveniente para poder liberarse del atrapamiento endosomal.

Debido a que fue posible transportar siRNA a células HeLa, observándose una disminución en los niveles de RNAm de ataxina 7. Los polímeros podrían tener un gran potencial para liberar siRNA en el cerebro, para ellos sería necesario realizar pruebas *in vivo* (células gliales y neuronales) e *in vitro*.

---

# Capítulo V

## V. Conclusiones

Se sintetizaron copolímeros de carboximetilcelulosa y polietilenglicol y se logró su funcionalización con histidina y lisina a través de una reacción de condensación.

Esta funcionalización con lisina e histidina es crucial para la obtención de copolímeros protonados para estabilizar RNA ribosomal y siRNA a través de interacciones electrostáticas. Los copolímeros se forman como esferas, donde el tipo de aminoácido y el peso molecular de los polímeros, determina la carga eléctrica en la superficie externa de los copolímeros esféricos. Los copolímeros funcionalizados con lisina favorecen la incorporación de material genético respecto a los copolímeros con histidina.

Se sugiere que los copolímeros con RNA son parcialmente estables ya que las interacciones aminoácido-RNA varían con el pH, esto favorecería el escape endosomal y por lo tanto la liberación de siRNA. Estos resultados son deseables para sistemas copolímeros-RNA para su uso como liberadores de RNA.

Los copolímeros presentan baja citotoxicidad a altas concentraciones, sin embargo, las nanopartículas de estos copolímeros son citotóxicas a concentraciones, mayores a 300  $\mu\text{g/mL}$ .

Los copolímeros de tamaño nanométrico logran estabilizar a siRNA frente a la degradación por nucleasas, esto es indispensable para tener una mayor disponibilidad de siRNA y que estas logren llegar al sitio de acción. Los copolímeros cargados con siRNA lograron internalizar en células HeLa al mostrar una inhibición del RNA mensajero que codifica para ataxina 7

.

.

---

# Bibliografía

- [1]- Gouw L, Castañeda M, McKenna C, Digre K, Pulst S, Perlman S, Lee M, Gomez C, Fischbeck K, Gagnon D, Storey E, Bird T, Raul F, Ptáček L, Jeri R. Analysis of the dynamic mutation in the SCA7 gene shows marked parental effects on CAG repeat transmission. *Human Molecular Genetics*. 1998; 7(3): 525–532. doi:10.1093/hmg/7.3.525.
- [2]-Magaña J, Tapia-Guerrero Y, Velázquez-Pérez L, Cerecedo-Zapata C, Maldonado-Rodríguez M, Jano-Ito J, Leyva-García R, González-Piña E, Martínez-Cruz O, Hernández-Hernández B. Analysis of CAG repeats in five SCA1 loci in Mexican population: epidemiological evidence of a SCA7 founder effect, *Clin Genet*. 2014; 85: 159–165. doi:10.1111/cge.12114.
- [3]- Perlman S, Bolthausen E. Drug treatment. *Handbook of Clinical Neurology*. 2018;155: 371-377. doi.org/10.1016/B978-0-444-64189-2.00024-X.
- [4]- Grace Y, Caldecott K. Nonsyndromic cerebellar ataxias associated with disorders of DNA single-strand break repair. *Handbook of Clinical Neurology*. 2018;115;105-115. doi.org/10.1016/B978-0-444-64189-2.00007-X.
- [5]- Andrade-Filho A, Passos-Almeida J, Andrade-Souza M, Sena Pereira R. Clorhidrato de buspirona en el tratamiento de la ataxia cerebelosa. *Rev Neurol*. 2002; 35: 301–5. doi.org/10.33588/rn.3504.2001006.
- [6]- Wang J, Lu Z, Wientjes G, Au J. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers, *AAPS J*. 2010; 12:492–503. doi.org/b7hx8b.
- [7]- F. Leuschner P, Dutta R, Gorbato T, Novobrantseva J, Donahoe G, Courties K, Lee M, Kim J, Markmann J, Marinelli B, Panizzi P, Lee W, Iwamoto Y, Milstein S, Epstein-Barash H, Cantley W, Wong J, Cortez-Retamozo, Newton A, Love K, Libby P, Pittet M, Swirski F, Kotliansky V, Langer R, Weissleder R, Anderson D, Nahrendorf M. Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice, *Nat. Biotechnol*. 2011; 29: 1005–1010. doi.org/fk4533.
- [8]- Ginn S, Amaya A, Alexander I, Edelstein M, Abedi M. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med*. 2018;20:e3015. doi.org/10.1002/jgm.
- [9]-peptio
- [10]- Yan M, Liang M, Wen J, Liu Y, Lu Y. Single siRNA nanocapsules for enhanced RNAi delivery, *J. Am. Chem. Soc*. 2012; 134: 13542–13545. doi.org/f354bj.
- [11]- Li W, Szoka F. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery, *Pharm. Res*. 2007; 24: 438–449. doi.org/cgk8wk.
- [12]- Kim S, Chompoosor A, Yeh Y, Agasti A, Solfiell D, Rotello M. Dendronized Gold Nanoparticles for siRNA Delivery *Small*, 2012; 8: 3253–3256. doi.org/fz5rqf.
- [13]- Daneman R, Prat A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7:a020412.
- [14]- Hong C, Goins W, Goss J, Burton E, Glorioso J. Herpes simplex virus RNAi and neprilysin gene transfer vectors reduce accumulation of Alzheimer's disease-related amyloid-beta peptide *in vivo*, *Gene Ther*. 2006; 13: 1068–1076. doi : 10.1038/sj.gt.3302719.
- [15]- Mandel R, Spratt S, Snyder R, Leff S. Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson

- disease in rats, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1997; 94: 14083–14088. doi: 10.1073/pnas.94.25.14083.
- [16]- Zhang Y, Schlachetzki F, Zhang Y, Boado R, Pardridge W. Normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism with intravenous nonviral gene therapy and a brain-specific promoter, *Hum. Gene. Ther.* 2004; 15: 339–350. doi: 10.1089/104303404322959498.
- [17]- Xia H, Mao Q, Eliason S, Harper S, Martins I, Orr H, Paulson H, Yang L, Kotin R, Davidson B. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia, *Nat. Med.* 2004; 10: 816–820. doi: 10.1038/nm1076.
- [18]- Scholefiel J, Greenberg J, Weinberg M, Arbutnot P, Abdelgany A, Wood M. Design of RNAi Hairpins for Mutation-Specific Silencing of Ataxin-7 and Correction of a SCA7 Phenotype. *PLoS ONE*. 2009; 4. doi:10.1371/journal.pone.0007232.s005.
- [19]- Bhattarai S, Singh P, Boudreau R, Thompson S, LaSpada A, Drack A, Davidson B, Pavitra R. RNA Interference-Based Therapy for Spinocerebellar Ataxia Type 7 Retinal Degeneration. *PLOS ONE*. 2014; 9. doi: 10.1371/journal.pone.0095362.
- [20]- Helmschrodt C, Höbel S, Schöniger S, Bauer A, Bonicelli J, Gringmuth M, Fietz S, Aigner A, Richter A, Richter F. Polyethylenimine Nanoparticle-Mediated siRNA Delivery to Reduce  $\alpha$ -Synuclein Expression in a Model of Parkinson's Disease, *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017; 9: 57–68. doi: 10.1016/j.omtn.2017.08.013.
- [21]- Shyam R, Ren Y, Lee Y, Braunstein K, Mao H, Wong P. Intraventricular Delivery of siRNA Nanoparticles to the Central Nervous System, *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015; 4. doi:10.1038/mtna.2015.15.
- [22]- Wong Y, Markham K, Xu Z, Chen M, Lu G, Bartlett P, Cooper H. Efficient delivery of siRNA to cortical neurons using layered double hydroxide nanoparticles, *Biomaterials*, 2010; 31 doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.077.
- [23]- Malmo J, Sandvig A, Va K, Strand S. Nanoparticle Mediated P-Glycoprotein Silencing for Improved Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier: A siRNA-Chitosan Approach, *PLoS ONE*. 2013;8(1). doi:10.1371/journal.pone.0054182.
- [24]- Wang J, Lu Z, Wientjes G, Au J. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers, *AAPS J*. 2010; 12:492–503. doi.org/b7hx8b.
- [25]- Godfray J, Estibeiro P. The potential of antisense as a CNS therapeutic, *Expert. Opin. Ther. Targets*. 2003; 7: 363. doi.org/bnqh9b.
- [26]- Pardridge W.M. Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses, *Nat. Rev. Drug Discov*. 2002; 1:131. doi.org/bzpj95.
- [27]- Altmann K.H, Fabbro D, Dean N.M, Geiger T, Monia B.P, Muller M, Nicklin, P. Second-generation antisense oligonucleotides: structure-activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors, *Biochem. Soc. Trans.* 1996, 24:630. doi.org/c4r7.
- [28]- Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*. 1998; 391: 806-811. doi: 10.1038/35888.
- [29]- Leuschner P, Dutta R, Gorbato T, Novobrantseva J, Donahoe G, Courties K, Lee M, Kim J, Markmann J, Marinelli B, Panizzi P, Lee W, Iwamoto Y, Milstein S, Epstein-Barash H, Cantley W, Wong J, Cortez-Retamozo, Newton A, Love K, Libby P, Pittet M, Swirski F, Kotliansky V, Langer R, Weissleder R, Anderson D, Nahrendorf M.

- Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice, *Nat. Biotechnol.* 2011; 29: 1005–1010. doi.org/fk4533.
- [30]- Davis M, Zuckerman J, Choi C, Seligson D, Tolcher A, Alabi A, Yen Y, Heidel D, Ribas A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles, *Nature*. 2010; 464:1067-1070. doi.org/cgjv7.
- [31]-Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*. 2001; 411: 494–498. doi.org/cdm8m4.
- [32]-Kanasty R , Dorkin J , Vegas A , Anderson D . Delivery materials for siRNA therapeutics, *Nat. Mater.* 2013. 12: 967–977. http://doi.org/cdm8m4
- [33]- Behr J.Synthetic Gene Transfer Vectors II: Back to the Future.,*Acc. Chem. Res.*2012; 45: 980–984. doi.org/c4r8.
- [34]-Whitehead K, Langer R, Anderson G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery, *Nat. Rev. Drug Discovery.*2009; 8: 129–138. doi.org/cxh42p.
- [35]- Casstanotto D , Rossi J . The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics, *Nature*; 2009;457(7228):426-33. doi: 10.1038/nature07758.
- [36]-Lee J , Lee S , Oh M , Kim J , Park T, Nam Y . Prolonged gene silencing by siRNA/chitosan-g-deoxycholic acid polyplexes loaded within biodegradable polymer nanoparticles, *J. Control. Release.* 2012; 162: 407–413. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.07.006.
- [37]- Wang J , Feng S , Wang S , Chen Z. Evaluation of cationic nanoparticles of biodegradable copolymers as siRNA delivery system for hepatitis B treatment, *Int. J. Pharm.* 2001; 400: 194–200. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.08.026.
- [38]- Li S , Chen Y , Hackett M, Huang L . Tumor-targeted delivery of siRNA by self-assembled nanoparticles, *Mol. Ther.* 2008; 16: 163–169. doi:10.1038/sj.mt.6300323.
- [39]- Fitzgerald K, Rahme K, Guo J, Holmes J, O'Driscoll C. Anisamide-targeted gold nanoparticles for siRNA delivery in prostate cancer–synthesis, physicochemical characterisation and in vitro evaluation, *J. Mater. Chem. B* .2016; 4: 2242–2252. doi : 10.1039/C6TB00082G .
- [40]- Laroui H , Theiss A , Yan Y , Dalmaso G, Nguyen H , Sitaraman S, Merlin D . Functional TNF $\alpha$  Gene silencing mediated by polyethyleneimine/TNF $\alpha$  siRNA nanocomplexes in inflamed colon, *Biomaterials.* 2011;32: 1218 –1228. doi : 10.1016/j.biomaterials.2010.09.062.
- [41]- Li S, Liu Z, Ji F, Xiao Z, Wang M, Peng Y, Zhang Y, Liu L, Liang Z, Li F. Delivery of quantum dot siRNA nanoparticles in SK-N-SH cells for BACE1 gene silencing and intracellular imaging, *Mol. Ther.–Nucleic Acids* 1.2012. 1, e20; doi:10.1038/mtna.2012.11.
- [42]-Spuch C, Ortolano S, Navarro C. Advances in the Treatment of Neurodegenerative Disorders Employing Nanoparticles, *Recent Patent Drug Delivery & Formulation*, 2012; 6: 2-18. doi.org/fxkp5t.
- [43]-Satya P, Meenakshi M. Recent Advancements in Targeted Delivery of Therapeutic Molecules in Neurodegenerative Disease - Spinocerebellar Ataxia - Opportunities and Challenges, *Drug Target Insights.* 2008; 99. Auckland 3 . doi.org/c4r9.
- [44]-Kumari A, Kumar S, Subhash Y. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces.* 2010; 75: 1–18. doi.org/fdb5m9.
- [45]-Oropesa R , Jáuregui U . Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 2012;43:1-21.

- 
- [46]-Karatas H , Aktas Y , Gursoy-Ozdemir Y , Bodur E, Yemisci M , Caban S . A nanomedicine transports a peptide caspase-3 inhibitor across the blood–brain barrier and provides neuroprotection, *J. Neurosci.* 2009;29: 13761–13769. doi.org/c9rs73.
- [47]-Aktas Y, Yemisci M, Andrieux K, Gursoy R, Alonso M, Fernandez E. Development and brain delivery of chitosan-PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26, *Bioconjug. Chem.* 2005;16: 1503–1511. doi.org/b522x5.
- [48]-Brannon L, Blanchette O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 1649–1659. doi.org/b75srs.
- [49]-Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 55:329–347. doi.org/dv6s9g.
- [50]-Kubik T, Bogunia K, Sugisaka M. Nanotechnology on duty in medical applications, *Curr Pharm Biotechnol.* 2005; 6:17–33. doi.org/c4sb.
- [51]-Sahoo S, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug Discov Today.* 2003; 8:1112–1120. doi.org/bnm7wz.
- [52]-Ravi M, Hellermann G , Lockey R , Mohapatra S . Nanoparticle-mediated gene delivery: state of the art., *Expert Opin Biol Ther.* 2004; 4:1213–1224. doi.org/b8gpz2.
- [53]-Sahoo S, Ma W, Labhasetwar V. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer, *Int J Cancer.* 2004; 112: 335–340. doi.org/d25mqx.
- [54]-Panyam J, Lof J, O’Leary E, Labhasetwar V. Efficiency of Dispatch and Infiltrator cardiac infusion catheters in arterial localization of nanoparticles in a porcine coronary model of restenosis, *J Drug Target* 2002; 10:515–523. doi.org/fc26v8.
- [55]-Panyam J, Labhasetwar V. Sustained cytoplasmic delivery of drugs with intracellular receptors using biodegradable nanoparticles, *Mol Pharm.* 2004; 1:77–84. doi.org/xf9pf
- [56]-Panyam J, Zhou Z, Prabha S, Sahoo K, Labhasetwar V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery, *FASEB J.* 2002; 16:1217–1226. doi.org/dvnr5g.
- [57]-Prabha S, Labhasetwar V. Nanoparticle-mediated wild-type p53 gene delivery results in sustained antiproliferative activity in breast cancer cells. *Mol Pharm* 2004; 1:211–219. doi.org/bgxtvf.
- [58]-Moghimi S, Hunter AC. Capture of stealth nanoparticles by the body’s defences. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2001; 18:527–550. doi.org/c4sc.
- [59]-Moghimi S, Hunter C, Murray J. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice, *Pharmacol Rev.* 2001; 53:283–318.
- [60]-Shive S, Anderson J . Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Adv Drug Deliv Rev.* 1997; 28:5–24. doi.org/bc8zcz.
- [61]-Sahoo K , Panyam J , Prabha S , Labhasetwar V . Residual polyvinyl alcohol associated with poly(D,L-lactide-co-glycolide) Nanoparticle Interface in Nanoparticle-Mediated Drug/Gene Delivery 155 nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake, *J Control Release.* 2002; 82:105–114. doi.org/b7sjt6.
- [62]-Schöttler S, Becker G, Winzen S. Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers, *Nat Nanotechnol.* 2016; 11(4): 372-7. doi.org/c4sd.
- [63]-Alam MI, Beg S, Samad A, et al. Strategy for effective brain drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2010; 40(5): 385-403. doi.org/fgj94k.

- 
- [64]-Yoo W, Doshi N, Mitragotri S. Endocytosis and Intracellular Distribution of PLGA Particles in Endothelial Cells: Effect of Particle Geometry, *Macromol Rapid Commun.* 2010; 31(2): 142-8. doi.org/c5t79b.
- [65]-Beningo A, Wang L. Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target, *J Cell Sci.* 2002; 115(4): 849-56.
- [66]-Yoo W, Irvine J, Discher E, Mitragotri S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers, *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(7): 521-35. doi.org/dg396j.
- [67]-Lippi G, Franchini M, Banfi G. Red blood cell-mimicking synthetic biomaterial particles: the new frontier of blood doping?, *Int J Sports Med.* 2010; 31(2): 75-86. doi.org/dfhgvx.
- [68]-Doshi N, Zahr S, Baskar S, Lahann J, Mitragotri S. Red blood cell-mimicking synthetic biomaterial particles, *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(51): 21495-9. doi.org/fdvp9.
- [69]-Kozlovskaya V, Alexander F, Wang Y. Internalization of Red Blood Cell-Mimicking Hydrogel Capsules with pH-Triggered Shape Responses, *ACS Nano.* 2014; 8(6): 5725-37. doi.org/f58j3t.
- [70]-Jahangir A, Hu Q, Yu K. Simulation of Red Particles in Blood Cell, *Appl Mech Mater.* 2013; 477-478: 330-4. doi.org/c4sg.
- [71]-Naeem S, Kiew V, Yong L, Yin T, Misran B. Drug delivery and innovative pharmaceutical development in mimicking the red blood cell membrane, *Rev Chem Eng.* 2015; 31(5): 491-508. doi.org/f7s9nr.
- [72]-Fox M, Szoka F, Fréchet J. Soluble polymer carriers for the treatment of cancer: the importance of molecular architecture, *Acc Chem Res.* 2009; 42(8): 141-51. doi.org/d8ngxk.
- [73]-Mahringer A, Ott M, Fricke G. The Blood-Brain Barrier: An Introduction to Its Structure and Function, In *Topics in Medicinal Chemistry.* 2013; pp. 1-20. doi.org/c4sh.
- [74]-Weiss N, Müller F, Czaubon S, Couraud P. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1788(4):842-57. doi: 10.1016/j.bbame.2008.10.022.
- [75]-Prabha S, Zhou Z, Panyam J, Labhasetwar V. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles, *Int J Pharm.* 2002; 244:105-115. doi.org/c6bzwj.
- [76]-Cherng J, van de Wetering P, Talsma H, Crommelin J, Hennink E. Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles, *Pharm Res.* 1996; 13:1038-1042. doi.org/dx9dff.
- [77]-Prabha S, Labhasetwar V. Critical determinants in PLGA/PLA nanoparticle-mediated gene expression, *Pharm Res.* 2004; 21: 354-364. doi.org/czgw3x.
- [78]-Bivas M, Romeijn S, Junginger E, Orchard G. PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium, *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 58:1-6. doi.org/fc6wrz.
- [79]-Ravi N, Bakowsky U, Lehr M. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers, *Biomaterials.* 2004; 25:1771-1777. doi.org/cpsgkt.
- [80]-Gaur U, Sahoo K, De K, Ghosh C, Maitra A, Ghosh K. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system, *Int J Pharm.* 2000; 202:1-10. doi.org/cp23kp.

- 
- [81]-Tsaïoun K , B otlaender M , Mabondzo A . Alzheimer's Drug Discovery Foundation, ADDME—Avoiding Drug Development Mistakes Early: central nervous system drug discovery perspective, *BMC Neurol.* 2009. doi.org/bkt5vm.
- [82]-Pardridge W. Drug targeting to the brain, *Pharm. Res.* 2007;24: 1733–1744. doi.org/dvbksr
- [83]-Goldsmith M, Abramovitz L, Peer D. Precision nanomedicine in neurodegenerative diseases. *ACS Nano.*2014;8: 1958–1965. doi.org/f5v9w9.
- [84]-Wohlfart S, Gelperina S, Kreuter J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J Control Release.* 2012 ;161(2):264-73. doi : 10.1016/j.jconrel.2011.08.017.
- [85]-Kreuter J. Drug targeting with nanoparticles, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 1994; 19: 253–256. doi.org/d52ccg.
- [86]-Kreuter J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know?, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 71 (2014) 2–14. doi.org/c4sj
- [87]- Daneman R, Prat A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7:a020412.
- [88]-Gao X, Qian J, Zheng S, Changyi Y, Zhang J, Ju S. Overcoming the blood– brain barrier for delivering drugs into the brain by using adenosine receptor nanoagonist, *ACS Nano*, 2014; 8: 3678–3689. doi.org/f52dv7.
- [89]-Choi C, Alabi C, Webster P, Davis M. Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010; 107: 1235–1240. http://doi.org/cpdq9h.
- [90]-Wiley D, Webster P, Gale A, Davis M. Transcytosis and brain uptake of transferrin-containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;210: 8662–8667. doi.org/f43k3r.
- [91]-Kong S, Lee J, Ramachandran S, Eliceiri B, Shubayev V, Lal R. Magnetic targeting of nanoparticles across the intact blood–brain barrier, *J. Control. Release.* 2012; 164:49–57. doi.org/f4dvc3.
- [92]-Zhou Y , Peng Z, Steven E , Leblanc R. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of Controlled Release.* 2018; 270: 290-303. doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.015.
- [93]-Etame A, Smith C, Chan W, Rutka J. Design and potential application of PEGylated gold nanoparticles with size-dependent permeation through brain microvasculature, *Nanomedicine.* 2011; 7:992–1000. doi.org/fvjdht.
- [94]-Hanada S, Fujioka K, Inoue Y, Kanaya F, Manome Y, Yamamoto K. Cell-based in vitro blood–brain barrier model can rapidly evaluate nanoparticles' brain permeability in association with particle size and surface modification, *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15: 1812–1825. doi.org/f5ttpb
- [95]-Sonavane G , Tomoda K . Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2008; 66: 274–280. doi.org/dq689v.
- [96]-Kolhar P , Anselmo A , Gupta V , Pant K , Prabakar Pandian B , Ruoslahti E . Using shape effects to target antibody-coated nanoparticles to lung and brain endothelium, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110: 10753–10758. doi.org/f49hz9.

- 
- [97]-Decuzzi P, Godin B, Tanaka T, Lee S, Chiappini C, Liu X. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles, *J. Control. Release.*2010; 141: 320–327. doi.org/cwn2qs.
- [98]-Bramini M, Ye D, Hallerbach A, Nic R aghnaill M, Salvati A, A berg C .Imaging approach t o mechanistic s tudy of na noparticle i nteractions w ith t he bl ood–brain barrier, *ACS Nano.* 2014; 8: 4304–4312. doi.org/f58922.
- [99]- Huang X, Li L, L iu T, Hao N, Liu H, C hen D, T ang F .The sha pe ef fect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo. *ACS Nano.* 2011; 5(7):5390-9. doi: 10.1021/nn200365a.
- [100]- Kreuter J, Hekmatara T, D reis S, Vogel T, Gelperina S, Langer C . Covalent attachment of a polipoprotein A -I and a polipoprotein B -100 t o a lbumin na noparticles enables dr ug t ransport into the b rain. *Journal of Controlled Release.* 2007; 118: 54–58. doi.10.1016/j.jconrel.2006.12.012
- [101]-Jallouli Y, Paillard A, Chang J, Sevin E, Betbeder D. Influence of surface charge and inner c omposition of por ous nanoparticles t o cross b lood–brain ba rrier i n v itro, *Int. J. Pharm.* 2007; 344: 103–109. doi.org/fb2tb7.
- [102]-Arvizo R, Miranda O, Moyano D, Walden C, Giri K, Bhattacharya R. Modulating pharmacokinetics, t umor upt ake a nd bi odistribution by e ngineered n anoparticles, *PLoS One.*2011;6. doi.org/b2d9ct.
- [103]-Petri B, Bootz A, Khalansky A, Hekmatara T, Müller R, Uhl R. Chemotherapy of brain t umour us ing doxor ubicin bound t o s urfactant-coated pol y(butyl c yanoac- rylate) nanoparticles: re visiting the rol e of s urfactants, *J. C ontrol. R elease.* 2007; 117: 51 –58. doi.org/c9tnp7.
- [104]-Gromnicova R, Davies H, Sreekanthreddy P, Romero I, Lund T, Roitt I. Glucose-coated gold nanoparticles transfer across human brain endothelium and enter astrocytes in vitro, *PLoS One.*2013;8. doi.org/c4sk.
- [105]- Shilo M, Motiei M, Hana P, Popovtzer R. Transport of na noparticles through the blood–brain barrier for imaging and therapeutic applications. *Nanoscale.* 2014;6(4):2146-52. doi: 10.1039/c3nr04878k.
- [106]-Wiley D, Webster P, Gale A, Davis M. Transcytosis and brain uptake of trans- ferrin-containing nanoparticles by t uning a vidity to transferrin receptor, *Proc. Natl. Acad. S ci. U. S. A.* 2013; 110: 8662–8667. doi.org/f43k3r.
- [107]-Guerrero S, Araya E, Fiedler J, Arias J, Adura C, Albericio F. Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide, *Nanomedicine (Lond.).* 2010; 5: 897–913. doi.org/b242mr.
- [108]-Choi C, Alabi C, Webster P, Davis M. Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold na noparticles, *Proc. Natl. Acad. S ci. U. S. A.*2010; 107: 1235–1240. doi.org/cpdq9h.
- [109]-Ulbrich K, Hekmatara T, Herbert E, Kreuter J. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood–brain barrier (BBB), *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009; 71: 251–256. doi.org/fj8vg3.
- [110]-Jiang W, Xie H, Ghoorah D, Shang Y, Shi H, Liu F. Conjugation of function- alized SPIONs with transferrin for targeting and imaging brain glial tumors in rat model, *PLoS One.* 2012; 7 e37376. doi.org/10.1371/journal.pone. 0037376. doi.org/f3x67c.

- 
- [111]- Ulbrich K, Knobloch T, Kreuter J. Targeting the insulin receptor: nanoparticles for drug delivery across the blood–brain barrier (BBB). *J Drug Target.* 2011; 19(2):125-32. doi: 10.3109/10611861003734001.
- [112]-Martinez-Veracochea F, Frenkel D. Designing super selectivity in multivalent nanoparticle binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108: 10963–10968. doi.org/fjvzrm.
- [113]-Walkey C , Olsen J , Guo H, Emili A , Chan W. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake, *J. Am. Chem. Soc.* 2012;134: 2139–2147. doi.org/fzqtm5.
- [114]- Doshi N, Prabhakarandian B, Rea-Ramsey A, Pant K, Sundaram S, Mitragotri S. Flow and adhesion of drug carriers in blood vessels depend on their shape: a study using models synthetic microvascular networks, *J. Control. Release.* 2010;146: 196 –200. doi.org/bpjbq7.
- [115]- Massimo M. Nanoparticles for Brain Drug Delivery. *ISRN Biochemistry.* 2013. doi.org/10.1155/2013/238428.
- [116]-Li S , Huang L . Nanoparticles evading the reticuloendothelial system: role of the supported bilayer, *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1788: 2259–2266. doi.org/dfgjc3.
- [117]-Lee S, Ferrari M, Decuzzi P. Shaping nano-/micro-particles for enhanced vascular interaction in laminar flows, *Nanotechnology.* 2009, 20: 495101. doi.org/c3nscw.
- [118]-Nance E , Woodworth G , Saylor K , Shih T , Xu Q, Swaminathan G . A dense poly(ethylene glycol) coating improves penetration of large polymeric nanoparticles within brain tissue, *Sci. Transl. Med.* 2012; 4: 149-119. doi.org/gbbhft.
- [119]- Gene Therapy Clinical Trials [online] < <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/> > (2005). Website tabulating important statistics regarding gene therapy clinical trials, including their classification by disease and type of vector.
- [120]-During J. Adeno-associated virus as a gene delivery system, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997; 27: 83–94. doi.org/bx484w.
- [121]-Vile G , Tuszyński A , Castleden S . Retroviral vectors: from laboratory tools to molecular medicines, *Mol. Biotechnol.* 1996; 5: 139–158. doi.org/fnj4k9.
- [122]- Ginn S, Amaya A, Alexander I, Edelstein M, Abedi M. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med.* 2018;20:e3015. doi.org/10.1002/jgm.
- [123]- Li W , Szoka F . Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery, *Pharm. Res.* 2007; 24: 438–449. doi.org/cgk8wk.
- [124]-Yan M, Liang M, Wen J, Liu Y, Lu Y. Single siRNA nanocapsules for enhanced RNAi delivery , *J. Am. Chem. Soc.* 2012; 134: 13542–13545. doi.org/f354bj.
- [125]-Zheng M, Pavan G, Neeb M, Schaper A, Danani A, Klebe G, Merkel M, Kissel T. Targeting the binding spot of polycationic nanocarrier-based siRNA delivery, *ACS Nano.* 2012; 6: 9447–9454. doi.org/c4sm.
- [126]- Kim S, Chompoosor A, Yeh Y, Agasti A, Solfiell D, Rotello M. Dendronized Gold Nanoparticles for siRNA Delivery *Small*, 2012; 8: 3253–3256. doi.org/fz5rqf.
- [127]- Lee M, Park S, Park K, Kim K, Lee H, Hahn S. Target-specific gene silencing of layer-by-layer assembled gold-cysteamine/siRNA/PEI/HA nanocomplex, *ACS Nano.* 2011; 5: 6138–6147. doi.org/b4zp4h.
- [128]-Song W, Du J , Sun T , Zhang P , Wang J . Gold nanoparticles capped with polyethyleneimine for enhanced siRNA delivery, *Small.* 2010; 6: 239–246. doi.org/b4rb5m.

- 
- [129]-Lee J, Green J, Love K, Sunshine J, Langer R, Anderson D. Gold, poly(beta-amino ester) nanoparticles for small interfering RNA delivery, *Nano Lett.* 2009; 2402–2406. doi.org/cs7wnt.
- [130]-Shen J, Xu R, Mai J, Kim H, Guo X, Qin G, Yang Y, Wolfram J, Mu C, Xia X, Gu J, Liu X, Mao Y, Ferrari M, Shen H. High capacity nanoporous silicon carrier for systemic delivery of gene silencing therapeutics, *ACS Nano.* 2013; 9867–9880. doi.org/f5jkv5.
- [131]-Lin D, Cheng Q, Jiang Q, Huang Y, Yang Y, Han S, Zhao Y, Guo S, Liang Z, Dong A. Intracellular cleavable poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate) functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient siRNA delivery in vitro and in vivo, *Nanoscale.* 2013; 5: 4291–4301. doi.org/c4sn.
- [132]-Hartono S, Gu W, Kleitz F, Liu J, He L, Middelberg A, Yu C, Lu G, Qiao S. Poly-L-lysine functionalized large pore cubic mesostructured silica nanoparticles as biocompatible carriers for gene delivery, *ACS Nano.* 2012; 6: 2104–2117. doi.org/c4sp.
- [133]-Xia T, K ovochich M , L iong M , M eng H , K abehie S , G eorge S , Z ink J , N el J . Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs, *ACS Nano.* 2009; 3: 3273–3286. doi.org/bf7358.
- [134]-Siu K, Chen D, Zheng X, Zhang X, Johnston N, Liu Y, Yuan K, Koropatnick J, Gillies E. Non-covalently functionalized single-walled carbon nanotube for topical siRNA delivery into melanoma, *Biomaterials.* 2014; 35: 3435–3442. doi.org/f5tzqw.
- [135]- Jiang X, Wang G, Liu R, Wang Y, Wang Y, Qiu X, Gao X. RNase non-sensitive and endocytosis independent siRNA delivery system: delivery of siRNA into tumor cells and high efficiency induction of apoptosis. *Nanoscale,* 2013; 5: 7256–7264. doi.org/c4sq.
- [136]-Foillard S, Zuber G, Doris E. Polyethylenimine–carbon nanotube nanohybrids for siRNA-mediated gene silencing at cellular level, *Nanoscale.* 2011; 3: 1461–1464. doi.org/b4qwbq.
- [137]- Singh P, Samori C, Toma F, Bussy C, Nunes A, Al-Jamal K, Bianco A. Polyamine functionalized carbon nanotubes: Synthesis, characterization, cytotoxicity and siRNA binding, *Journal of Materials Chemistry.* 2011;21(13): 4850-4860. doi.org/dbw9q2.
- [138]-Kam N, Liu Z, Dai H. Functionalization of Carbon Nanotubes via Cleavable Disulfide Bonds for Efficient Intracellular Delivery of siRNA and Potent Gene Silencing, *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127: 12492–12493. doi.org/dhths2.
- [139]- Sokolova V, Epple M. Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2008; 47: 1382–1395. doi.org/bkzqxb.
- [140]-Sahay G, Querbes W, Alabi C, Eltoukhy A, Sarkar S, Zurenko C, Karagiannis E, Love K, Chen D, Zoncu R, Buganim Y, Schroeder A, Langer R, Anderson D. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling, *Nat. Biotechnol.* 2013; 31: 653–658. doi.org/f44fbw.
- [141]-Alabi C, Love K, Sahay G, Yin H, Luly K, Langer R, Anderson D. Multiparametric approach for the evaluation of lipid nanoparticles for siRNA delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013; 110: 12881–12886. doi.org/f46kvf.
- [142]-Tan S, Kiatwuthinon P, Roh Y, Kahn Y, Luo D. Engineering Nanocarriers for siRNA Delivery, *Small,* 2011; 7: 841–856. doi.org/b7tpf9.
- [143]-Aliabadi H, Landry B, Sun C, Tang T, Ulluda H. Biomaterials, Supramolecular assemblies in functional siRNA delivery: where do we stand?. 2012 ; 33: 2546–2569. doi.org/fixsjc9.

- 
- [144]-Kesharwani P, Gajbhiye, Jain N. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA, *Biomaterials*. 2012; 33: 7138–7150. doi.org/f37w5b.
- [145]-Tian H, Chen J, Chen X. Nanoparticles for gene delivery, *Small*. 2013; 9: 2034–2044. doi.org/f2cqgc.
- [146]-Buyens K, De Smedt S, Braeckmans K, Demeester J, Peeters L, Van Grunsven L, Mollerat X, Sawant R, Torchilin V, Farkasova K, Ogris M, Sanders J. Liposome based systems for systemic siRNA delivery: stability in blood sets the requirements for optimal carrier design, *Controlled Release*, 2012; 158: 362–370. doi.org/bwgnnk.
- [147]- Wagner E. Polymers for siRNA delivery: inspired by viruses to be targeted, dynamic, and precise, *Acc. Chem. Res.* 2012; 45: 1005–1013. doi.org/fx423x.
- [148]-Jones C, Chen C, Ravikrishnan A, Rane S, Pfeifer B. Overcoming Nonviral Gene Delivery Barriers: Perspective and Future. *Mol Pharm.* 2013; 10 (11): 4082–4098. doi:10.1021/mp400467x.
- [149]-Syvänen S, Lindhe O, Palner M, Kornum B, Rahman O, Långström B. Species differences in blood–brain barrier transport of the positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport, *Drug Metab. Dispos.* 2009; 37: 635–643, doi.org/cngf3s.
- [150]-Yang L, Shah K, Abbruscato T. An in vitro model of ischemic stroke, *Methods Mol. Biol.* 2012, 814: 451–466. doi.org/d4gk68.
- [151]-Etame A, Smith C, Chan W, Rutka J. Design and potential application of PEGylated gold nanoparticles with size-dependent permeation through brain microvasculature, *Nanomedicine*. 2011; 7: 992–1000. doi.org/fvjdh.
- [152]-Shilo M, Motiei M, Hana P, Popovtzer R. Transport of nanoparticles through the blood–brain barrier for imaging and therapeutic applications, *Nanoscale*. 2014; 6: 2146–2152. doi.org/c4sr
- [153]-Guerrero S, Araya E, Fiedler J, Arias J, Adura C, Albericio F. Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide, *Nanomedicine (Lond.)*. 2010; 5: 897–913. doi.org/b242mr.
- [154]-Wadhwa M, Collard W, Adami R, McKenzie D, Rice K. Peptide-mediated gene delivery: influence of peptide structure on gene expression, *Bioconjug. Chem.* 1977; 8: 81–88. doi.org/cb8459
- [155]-Plank C, Tang M, Wolfe A, Szoka F. Branched cationic peptides for gene delivery: role of type and number of cationic residues in formation and in vitro activity of DNA polyplexes, *Hum. Gene Ther.* 1999; 10: 319–332. doi.org/b7dg8k.
- [156]-Schaffer D, Fidelman V, Dan N, Lauffenburger D. Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol. Bioeng.* 2000; 67: 598–606. doi.org/dbfgjq.
- [157]- Plank C, Tang M, Wolfe R, Szoka F. Branched cationic peptides for gene delivery: role of type and number of cationic residues in formation and in vitro activity of DNA polyplexes, *Hum Gene Ther.* 1999; 10(2):319–32. doi: 10.1089/10430349950019101.
- [158]- Lorenzer C, Streubnig S, Tot E, Winkler A, Merten H, Brandl F, Sayers E, Watson P, Jones A, Uwe Z, Plückthun A, Winkler J. Targeted delivery and endosomal cellular uptake of DARPIn-siRNA bioconjugates: Influence of linker stability on gene silencing, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019; 141: 37–50. doi:10.1016/j.ejpb.2019.05.015.

- 
- [159]-Tuszynski M. Growth-factor gene therapy for neuro- degenerative disorders, *Lancet Neurol.* 2002;1: 51–57. doi.org/d5w79n.
- [160]-Dash P, Read M, Barrett L, Wolfert M, Seymour L. Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery, *Gene Ther.* 1999; 6: 643–650. doi.org/bq467z.
- [161]- Ogris M, Brunner S, Schuller S, Kircheis R, Wagner E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery, *Gene Ther.* 1999; 6:595–605. doi.org/frw2c2.
- [162]-Toncheva V. Novel vectors for gene delivery formed by self-assembly of DNA with poly(L-lysine) grafted with hydrophilic polymers, *Biochim. Biophys. Acta.* 1988; 1380: 354–368 (1998). doi.org/dcmcjk.
- [163]- Adam W, Faqing H, Cormick C. Rational Design of Targeted Cancer Therapeutics through the Multiconjugation of Folate and Cleavable siRNA to RAFT-Synthesized (HPMA-s-APMA) Copolymers, *Biomacromolecules.* 2010; 11 (2): 505–514. doi : 10.1021/bm901249n.
- [164]- Moran G, Feinshtein V, Ayelet D. Conjugates of HA2 with octarginine-grafted HPMA copolymer of effective siRNA delivery and gene silencing in cancer cells, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2016; 109: 103-112.
- [165]-Johnson R, Chu D, Shi J, Schellinger J, Carlson P, Pun S. HPMA-oligolysine copolymers for gene delivery: Optimization of peptide length and polymer molecular weight, *Journal of Controlled Release.* 2011; 155: 303–311. doi:10.1016/j.jconrel.2011.07.009.
- [166]-Howard K. Influence of cationic polymers on the biophysical properties of polyelectrolyte complexes formed by self-assembly with DNA, *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1475: 245–255. http://doi.org/bb88v9.
- [167]-Wang W, Tetley L, Uchegbu I. The level of hydrophobic substitution and the molecular weight of amphiphilic poly-L-lysine-based polymers strongly affects their assembly into polymeric bilayer vesicles. *J. Colloid. Int. Sci.* 2001; 237: 200–207. doi.org/cfhs8n.
- [168]-Erbacher P. Gene transfer by DNA/glycosylated polylysine complexes into human blood monocyte-derived macrophages. *Hum. Gene Ther.* 1996; 7: 721–729. doi.org/fmr8ds.
- [169]-Nishikawa M, Takemura S, Takakura Y, Hashida M. Targeted delivery of plasmid DNA to hepatocytes in vivo optimization of the pharmacokinetics of plasmid DNA galactosylated poly(L-lysine) complexes by controlling their physicochemical properties. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1988; 287: 408–415. http://doi.org/d394x7.
- [170]-Kircheis R. et al. Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther.* 2001; 8: 28–40. doi.org/d5g8nk
- [171]-Mishra S, Webster P, Davis M. PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles. *Eur. J. Cell Biol.* 2004; 83: 97–111. doi.org/cfjvsw.
- [172]-Huang Y, Wang X, Huang W, Cheng Q, Zheng S, Guo S, Cao H, Liang X, Du Q, Liang Z. Systemic Administration of siRNA via a RGD-containing Peptide. *Scientific Reports.* 2015; 5: 12458. doi: 10.1038/srep12458.

- 
- [173]-Erbacher P , Roche A , Monsigny M , Midoux P . Glycosylated polylysine/DNA complexes: gene transfer efficiency in relation with the size and the sugar substitution level of glycosylated polylysines and with the plasmid size, *Bioconjug. Chem.* 1995;6: 401–410. doi.org/bcswk6.
- [174]-Zanta M , Boussif O , Adib A , Behr J . In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine, *Bioconjug. Chem.* 1997;8: 839–844. doi.org/fsjg26.
- [175]-Bettinger T , Remy J, Erbacher P . Size reduction of galactosylated PEI/DNA complexes improves lectin-mediated gene transfer into hepatocytes, *Bioconjug. Chem.* 1999; 10: 558–561. http://doi.org/cjgwgq3.
- [176]-Leamon C, Weigl D. Hendren R. Folate copolymer-mediated transfection of cultured cells. *Bioconjug. Chem.* 1999;10: 947–957. doi.org/fwg9sg.
- [177]-Cotton M. et al. Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 4033–4037. doi.org/crwp5b.
- [178]-Wagner E , Zinke M , Cotten M , Beug H, Birnstiel M. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 3410–3414. doi.org/d4s55v.
- [179]-Zenke M. et al. Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells; *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 3655–3659. doi.org/bjw6rj.
- [180]-Zatloukal K . et al. Transferrin infection: a highly efficient way to express gene constructs in eukaryotic cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 1992; 660: 136–153. doi.org/dkbpqw.
- [181]-Schaffer D , Neve R, Luffenburger D . Use of the green fluorescent protein as a quantitative reporter of epidermal growth factor receptor-mediated gene delivery. *Tissue Eng.* 1997;3:53-63. doi.org/dmqtgz.
- [182]-Kircheis, R. et al. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther.* 1997; 4: 409–418. doi.org/bq6h77.
- [183]-Harbottle R. et al. An RGD-oligolysine peptide: a prototype construct for integrin-mediated gene delivery. *Hum. Gene Ther.* 1998;9:1037–1047. doi.org/bc42mh.
- [184]-Schaffer, D . Luffenburger D . Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 28004–28009. doi.org/ffzqx4.
- [185]- Tseng W , Haselton F , Giorgio T . Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression. *J. Biol. Chem.* 1997;272: 25641–25647. doi.org/bm78g4.
- [186]-Mukherjee S, Ghosh R, Maxfield F. Endocytosis, *Physiol. Rev.* 1997; 77: 759–803. http://doi.org/c4ss.
- [187]-Sahay G , Alakhova D , Kabanov A . Endocytosis of nanomedicines. *J. Controlled Release.* 2010; 145: 182–195. doi.org/b98j9h.
- [188]-Nguyen J, Szoka F. *Acc. Chem. Res.* Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle?, 2012; 45: 1153–1162. doi.org/f335w6.
- [189]-Haensler J, Szoka F . Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture *Bioconjugate Chem.* 1993; 4: 372–379. doi.org/bmngjr.

- 
- [190]-Sonawane N , Szoka F , Verkman A . Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes, *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 44826–44831. doi.org/bjn9r8.
- [191]- Gilleron J , Querbes W , Zeigerer A , Brodovsky A , Marsico G , Schubert U , Manygoats K, Seifert S, Andree C, Stöter M, Epstein-Barash H, Zhang L, Kotliansky V, Fitzgerald K, Fava E, Bickle M, Kalaidzidis Y, Akinc A, Maier M, Zerial M. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape, *Nat. Biotechnol.* 2013; 31: 638–646. doi.org/f44hcn.
- [192]-Boussif O. et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 7297–7301. doi.org/ff8pq5.
- [193]- Behr J. The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit. This review paper provides the first clear description of the proton-sponge hypothesis, *Chimia.* 1997; 51: 34–36.
- [194]-Haensler J, Szoka F. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug. Chem.* 1993; 4: 372–379. doi.org/bmngjr.
- [195]- Sonawane N , Szoka R , Verkman S . Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine–DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 44826–44831. doi.org/bjn9r8.
- [196]- Desai M, Labhasetwar V, Walter E, Levy R, Amidon G. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent, *Pharm Res.* 1997; 14:1568–1573. doi.org/dpcq5p.
- [197]- Desai M , Labhasetwar V , Amidon L, Levy J . Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size, *Pharm Res.* 1996; 13: 1838–1845. doi.org/bfsvr9.
- [198]-Luby-Phelps K , Castle P , Taylor D , Lanni F . Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 1987; 84: 4910–4913. doi.org/dgkgt8
- [199]-Lukacs G. et al. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus, *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 1625–1629. doi.org/bdv9n5.
- [200]-Lechardaur D. et al. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer, *Gene Ther,* 1999; 6: 482–497. doi.org/fjwq96
- [201]-Suh, J, Wirtz D, Hanes J. Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003; 100: 3878–3882. doi.org/ckq746.
- [202]-Erbacher P, Roche A, Monsigny M, Midoux P. The reduction of the positive charges of polylysine by partial gluconoylation increases the transfection efficiency of polylysine/DNA complexes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1997; 1324: 27–36. doi.org/dzv4mr.
- [203]-Banaszczyk M. et al. Poly-L-lysine-graft-PEG-comb-type polycation copolymers for gene delivery. *J. Macromol. Sci.* 1999; 36: 1061–1084. doi.org/dzv4mr.
- [204]-Hunt R , MacGregor R . Engineering targeted in vivo drug delivery I . The physiological & physicochemical principles governing opportunities & limitations, *Pharm. Res.* 1986; 3: 333–344. doi: 10.1023/A:1016332023234.
- [205]-Gerweck L , Seetharaman K . Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer, *Cancer Res.* 1996; 56 (6): 1194–1198.

- [206]-Mishra S , Heidel J, Webster P , Davis M. J, I midazole groups on a linear, cyclodextrin-containing polycation produce enhanced gene delivery via multiple processes, . *Controlled Release*, 2006; 116: 179–191. doi.org/fjzf2r.
- [207]-Malamas A, Gujrati M, Kummitha C, Xu R , Lu R. Design and evaluation of new pH-sensitive amphiphilic cationic lipids for siRNA delivery. *J. Controlled Release*. 2013; 171: 296–307. doi.org/f5bvnh.
- [208]-Gu W, Jia Z , Truong P , Prasadam I, Xiao Y , Monteiro M . Polymer nanocarrier system for endosome escape and timed release of siRNA with complete gene silencing and cell death in cancer cells, *Biomacromolecules*. 2013; 14: 3386–3389. doi.org/f5fpcn.
- [209]-Benns J , Choi J , Mahato R , Park J , Kim S . pH -sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N -Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer, *Bioconjugate Chem*. 2000; 11: 637–645. doi.org/cktttdq.
- [210]- Felgner P.L. Gadeck T. Holm M , Roman R. Lipofection: A highly efficient lipid-mediated DNAtransfection. *Nature*. 1987; 337:387-388. doi:10.1073/pnas.84.21.7413.
- [211]- Zhang Ye, Anchordoquy T. The role of lipid charge density in the serum stability of cationic lipid/DNA complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004; 1663: 143 –157. doi:10.1016/j.bbamem.2004.03.004.
- [212]- Kulkarni J, Myhre J, Chen S, Tam Y, Danescu A, Richman J, Cullis P. Design of lipid nanoparticles for in vitro and in vivo delivery of plasmid DNA, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2017; 13 : 1377 –1387. doi.org/10.1016/j.nano.2016.12.014
- [213]- Young A, Lakey J, Murray A, Moore R. Gene Therapy: A Lipofection Approach for Gene Transfer Into Primary Endothelial Cells, *Cell Transplantation*. 2002;11(6): 573–582.
- [214]- Cheng X, Lee R. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 99: 129 – 137. doi:10.1016/j.addr.2016.01.022.
- [215]-Aravamudhan A, Ramos D, Nada A, Kumbar S. Natural Polymers: Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications, *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. 2014; 67-89. doi:10.1016/B978-0-12-396983-5.00004-1.
- [216]-Bruschi M, Borghi-Pangoni F, Junqueira M, Ferreira S. Nanostructured therapeutic systems with bioadhesive and thermoresponsive properties, *Nanostructures for novel therapy*. 2017; 313-342. doi:10.1016/B978-0-323-46142-9.00012-8.
- [217]- Stigsson V, Kloow G, Germgård U. Some aspects on the possibility to influence the viscosity of the carboxymethyl cellulose"2008" *OPAPEL-May*, (5) pp. 41-55.
- [218]-Heinze and Koschella. Carboxymethyl ethers of cellulose and starch- A review, *Macromol. Symp*. 2005; 223: 13-39. doi.org/c5t9f3.
- [219]- Caló E , Kutoryanskiy V . Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, *European Polymer Journal*. 2015; 65: 252–267. doi.org/f69jqr.
- [220]-Yang H, Park J, Jeon S, Park K. Carboxymethylcellulose (CMC) formed nanogels with branched poly(ethyleneimine) (bPEI) for inhibition of cytotoxicity in human MSCs as a gene delivery vehicles, *Carbohydrate Polymers*. 2015; 122: 265 –275. doi:10.1016/j.carbpol.2014.12.073
- [221]-Bhagavan N. Amino acids. *Medical Biochemistry ( Fourth Edition)*. 2002: 17-33. doi:10.1016/B978-012095440-7/50004-4.
- [222]-Meister A. *Biochemistry of the amino acids*. Academic Press, 2nd Edition. 1965.

- 
- [223]- Bhagavan N, Chung H. Amino acids. *Essential of Medical Biochemistry*. 2011;19-27. doi:10.1016/B978-0-12-095461-2.00003-5 .
- [224]-Cole L , Kramer P . Amino acids. *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*. 2016;31-38.doi:10.1016/B978-0-12-803699-0.00017-7.
- [225]- Mansano C, Macente B , Nascimento T. Determination of digestible lysine and estimation of essential amino acid requirements for bullfrogs, *Aquaculture*.2017;467:89-93. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.03.008.
- [226]-Morar A, Schrimsher L, Chavez M. PEGylation of proteins: A structural approach. *BioPharm International*. 2006: 34-48.
- [227]- Davis F. The origin of pegnology. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(4):457-8.
- [228]- Gaberc-Porekar V, Zore I, Podobnik B, Menart V. Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins, *Current Opinion in Drug Discovery & Development*.2008; 11: 242-250.
- [229]-Suk J, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign L. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 99: 28–51.doi:10.1016/j.addr.2015.09.012.
- [230]- Damodaram V, Fee C. Protein PEGylation: An overview of chemistry and process considerations. *European Pharmaceutical Review*. 2010: 18-26.
- [231]- Harris J, Chese R. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2(3):214-21. doi: 10.1038/nrd1033.
- [232]- Veronese F , Pasut G . PEGylation, a successful approach to drug delivery, *Drug Discov Today*. 2005;10(21):1451-8. doi:10.1016/S1359-6446(05)03575-0.
- [233]-Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Pharmacokinetic consequences of pegylation, *Drug Delivery*.2016; 13, 399-409. doi:10.1080/10717540600814402.
- [234]- Gaberc-Porekar V, Zore I, Podobnik B, Menart V. Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins, *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. 2008 11(2):242-250.
- [235]- Iversen F, Yang C, Dagnas-Hansen F, Schaffert H, Kjems J, Gao S. Optimized siRNA-PEG Conjugates for Extended Blood Circulation and Reduced Urine Excretion in Mice. *Theranostics* 2013, 3, 201. doi:10.7150/thno.5743.
- [236]- Gaziova Z, Baumann V, Winkler A, Winkler J. Oligonucleotides conjugated with short chemically defined polyethylene glycol chains are efficient antisense agents, *Bioorg. Med. Chem*. 2014, 22, 2320. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.10.045.
- [237]- Grace Y, Caldecott K. Nonsyndromic cerebellar ataxias associated with disorders of DNA single-strand break repair. *Handbook of Clinical Neurology*. 2018,115;105-115. doi.org/10.1016/B978-0-444-64189-2.00007-X.
- [238]- Jonathan F.Marsden. Cerebellar ataxia. *Handbook of Clinical Neurology*. 2018; 159: 261-281. doi.org/10.1016/B978-0-444-63916-5.00017-3.
- [239]- Brent L . Autosomal-recessive cerebellar ataxias.*Handbook of Clinical Neurology*. 2018; 147: 187-209. doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00013-0.
- [240]- Bing S , Morrison P.spinocerebellar ataxias. *Handbook of Clinical Neurology*.2018;155: 147-174. doi.org/10.1016/B978-0-444-64189-2.00010-X.
- [241]- Magaña J, Tapia Y, Velázquez L, Cerecedo C. Analysis of CAG repeats in five SCA loci in Mexican population: epidemiological evidence of a SCA7 founder effect. *Clin Genet*. 2014;85(2):159-65. doi: 10.1111/cge.

- [242]- Garcia R, Hernández R, Hernández O, Hernpández M. Neurodegenerative diseases: The spinocerebellar ataxia type 7 in Mexico, *Revista eNeurobiología*. 2013;4(8): 2-13.
- [243]- Perlam S, Bolthausen E. Drug treatment. *Handbook of Clinical Neurolog.* 2018;155: 371-377. doi.org/10.1016/B978-0-444-64189-2.00024-X.
- [244]- Andrade-Filho A , Passos-Almeida J, Andrade-Souza M, Sena Pereira R . Clorhidrato de buspirona en el tratamiento de la ataxia cerebelosa. *Rev Neurol* .2002; 35: 301-5. doi.org/10.33588/rn.3504.2001006.
- [245]- Gilles D avid, N acer A bbas, G iovanni S tevanin, A lexandra D ürr, G aël Yvert, Géraldine Cancel, Chantal Weber, Georges Imbert, Frédéric Saudou, Eric Antoniou, Harry Drabkin, Robert Gemmill, Paola Giunti, Ali Benomar, Nick Wood, Merle Ruberg, Yves Agid, Jean-Louis Mandel & Alexis B rice. Cloning of t he S CA7 ge ne r eveals a highly unstable CAG repeat expansion.. *Nature Genetics*. 1997; 17: 65–70. doi: 10.1038/ng0997-65.
- [246]- Gouw L, Castañeda M, McKenna C, Digre K, Pulst S, Perlman S, Lee M, Gomez C, Fischbeck K. G agnon D, Storey E , B ird T , Raul F , P tácek L , J eri R. A nalysis of t he dynamic mutation i n t he S CA7 g ene s hows m arked pa rental e ffects on CAG r epeat transmission. *Human M olecular G enetics*. 1998; 7( 3): 525 –532. doi.org/10.1093/hmg/7.3.525.
- [247]- Storey E1, Sart D, Shaw H, Lorentzos P, Kelly L, McKinley Gardner RJ, Forrest M, Biros I , N icholson A . Frequency of s pinocerebellar ataxia t ypes 1, 2 , 3, 6, a nd 7 i n Australian patients with spinocerebellar ataxia. *Am J Med Genet*. 2000 Dec 11;95(4):351-7. doi.org/10.1002/1096-8628(20001211)95:4<351::AID-AJMG10>3.0.CO;2-R.
- [248]- Soong B, Lu Y, Choo B, Lee Y . *Arch Neurol.*, Frequency a nalysis of a utosomal dominant cer ebellar ataxias i n T aiwanese pa tients and clinical and molecular characterization of s pinocerebellar a taxia t ype 6 . 2001; 58( 7): 1105 -9. doi:10.1001/archneur.58.7.1105.
- [249]- Smith D , Bryer A , Watson L , G reenberg L . I nherited pol yglutamine spinocerebellar a taxias i n S outh A frica, *S A fr M ed J* . 2012; 102( 8):683-686. doi:10.7196/SAMJ.5521.
- [250]- Magaña J, Tapia-Guerrero Y , Velázquez-Pérez L , Cerecedo-Zapata C, Maldonado-Rodríguez M, Jano-Ito J, Leyva-García R, González-Piña E, Martínez-Cruz O, H ernández-Hernández B . Analysis of C AG r epeats i n five S CA l oci i n Mexican population: epidemiological evidence of a SCA7 founder effect, *Clin Genet*. 2014; 85: 159–165. doi.org/10.1111/cge.12114.
- [251]- Ernsting M , T ang W, MacCallum N, Li S . Synthetic M odification of Carboxymethylcellulose and Use Thereof to Prepare a Nanoparticle Forming Conjugate of Docetaxel for Enhanced Cytotoxicity against Cancer Cells. *Bioconjugate Chem*. 2011; 22: 2474–2486. doi: dx.doi.org/10.1021/bc200284b.
- [252]- Petri B, Bootz A, Khalansky A, Hekmatara T, Müller R, Uhl R, Kreuter J, Gelperina S. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) na noparticles: R evisiting the role of s urfactants, *Journal of C ontrolled Release*. 2007; 117: 51–58. doi:10.1016/j.jconrel.2006.10.015.
- [253]- Glatter O. Data evaluation in small angle scattering: calculation of the radial electron density, *Acta Phys Aust*. 1977; 47:83–102.
- [254]- Glatter O. A new method for the evaluation of small-angle scatter- ing data, *J Appl Crystallogr*. 1977; 10:415–421. doi.org/cgjr3z.

- 
- [255]- Glatter O. Evaluation of small-angle scattering data from lamellar and cylindrical particles by the indirect transformation method. *J Appl Crystallogr.* 1980; 13: 7–577. doi.org/dh3ng2
- [256]- Guinier A, Fournet G. Small angle scattering of X-rays. Wiley, New York, 1955. doi.org/b4gx6c.
- [257]- Glatter O, Kratky O. Small angle X-ray scattering. Academic Press, New York, 1985. <https://doi.org/10.1002/actp.1985.010360520>.
- [258]- Biswall D, Singh R. Characterisation of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer, *Carbohydr Polym.* 2004; 57: 379–387. doi.org/b3sjc5.
- [259]- Barbucci R, Maggiani A, Consumis M. Swelling behavior of carboxymethylcellulose hydrogels in relation to cross-linking, pH, and charge density, *Macromolecules.* 2000; 33: 7475–7480. doi.org/dxjpsr.
- [260]- Kono H, Onishi K, Nakamura T. Characterization and bisphenol adsorption capacity of  $\beta$ -cyclodextrin–carboxymethylcellulose-based hydrogels, *Carbohydr Polym.* 2013; 15: 784–792. doi.org/f5d86v.
- [261]- Fang Y, Gang L, Yan-Gang H, Feng-Xia R, Gui-Xiang W. Synthesis, characterization, and applied properties of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer, *Carbohydr Polym.* 2009; 78: 95–99. doi.org/c2wvc2.
- [262]- Jasaswini T, Dinesh K, Kunj B. Graft copolymerization of N-vinylformamide onto sodium carboxymethylcellulose and study of its swelling, metal ion sorption and flocculation behaviour. *Carbohydr Polym.* 2009; 75: 604–611. doi.org/d5skc2.
- [263]- Zhou Z, Xia X, Bong D. Synthetic polymer hybridization with DNA and RNA directs nanoparticle loading, silencing delivery, and aptamer function, *J ACS.* 2015; 137: 8920–8923. <http://doi.org/f7kwfb>.
- [264]- Cheng C, Convertine A, Stayton P, Bryers J. Multifunctional triblock copolymers for intracellular messenger RNA delivery. *Biomaterials.* 2012; 33: 6868–6876. doi.org/f37xbz.
- [265]- Piotr S, Kowalski U, Palmiero Y, Arnab R, Langer R, Anderson D. Ionizable amino-polyesters synthesized via ring opening polymerization of tertiary amino-alcohols for tissue selective mRNA delivery, *Adv Mater.* 2018; 30: 180115. doi.org/gdts2x.
- [266]- Katayose S, Kataoka K. Water-soluble polyelectrolyte complexes of DNA and poly(ethylene glycol)–poly(L-lysine) block copolymer, *Bioconjug Chem.* 1997; 8: 702–707. doi.org/cjkvjv.
- [267]- Itaka K, Yamauchi K, Harada A, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K. Polyelectrolyte complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)–poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyelectrolyte system: physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency, *Biomaterials.* 2003; 24: 4495–4506. doi.org/d7gr8t.
- [268]- Malamas S, Gujrati M, Kummitha CM, Xu R, Lu ZR. Design and evaluation of new pH-sensitive amphiphilic cationic lipids for siRNA delivery, *J Control Release.* 2013; 171: 296–307. doi.org/f5bvnh.
- [269]- Lee Y, Miyata K, Oba M, Ishii T, Fukushima S, Han M, Koyama M, Nishiyama N, Kataoka K. Charge-conversion ternary polyelectrolyte with endosome disruption moiety: a technique for efficient and safe gene delivery. *Angew Chem.* 2008; 47: 5163–5166. doi.org/b98qs9.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# New copolymers as hosts of ribosomal RNA

Magali Hernández<sup>1</sup>, Gerardo Leyva<sup>2</sup>, Jonathan J. Magaña<sup>3</sup>, Ariel Guzmán-Vargas<sup>4</sup>, Carlos Felipe<sup>5</sup>, Víctor Lara<sup>6</sup> and Enrique Lima<sup>1\*</sup>

## Abstract

Functionalized copolymers were synthesized and are proposed as hosts of RNA. The copolymers are based on carboxymethyl cellulose and poly-(ethylene glycol)-OH. These copolymers were functionalized with two amino acids, either lysine or histidine, through amide bond formation. The functionalized copolymer was then used to adsorb ribosomal RNA. The RNA loading was based on the nature of the amino acid functionalization of the copolymer. The array of RNA-copolymers was observed to be soft sphere-like, where the density of spheres was a function of the molecular weight of the carboxymethyl cellulose and the nature of the amino acid. Such RNA-copolymer systems are very sensitive to changes in pH.

## Introduction

Nanoparticles are already being developed as effective carriers of drugs and gene delivery to target regions of the body that were previously hard to access using traditional drug formulation methods. Through manipulation of their elemental composition, charge, size, and chemical functionalization, it may be possible to target particles to specific organs [1].

Gene therapy uses nucleic acids as a powerful tool to cure genetic deficiencies or diseases that currently have no cure. This includes a number of brain diseases (Alzheimer's and Parkinson's disease), viral infections and cancer [2, 3]. Therapeutic RNA (SiRNA, ribozymes, and mRNA) and DNA (plasmid DNA; oligonucleotides) delivery have been limited by a number of factors. Naked, single-stranded RNA, degraded by a nuclease, activates the immune system and is negatively charged to passively cross the cell membrane; it must be able to enter the cell and escape from endosomes [4, 5].

Complex DNA nanostructures can be functionalized with different biomolecules or nanomaterials, such as different nanowires, nanoparticles, organic molecules, peptides or proteins, to combine the properties of both

DNA and nanomaterials for achieving the aimed functionality [6]. Nucleic acids require encapsulation, protection and stability in nanosized carriers by using viral or nonviral vectors that enable efficient intracellular delivery [6]. The use of nonviral vectors is gaining attention due to their low immunogenicity compared with that of viral vectors [7]. Various nonviral vectors, such as cationic polymers, including polylysine and polyamidoamine, are used to electrostatically balance the negatively charged RNA or DNA; however, excess cationic components cause adverse reactions, such as platelet aggregation and inflammatory reactions [8, 9]. Dendrimers, gold nanoparticles, quantum dots and methacrylate/methacrylamide polymers have also been proposed [10–12]. However, it is necessary to improve these materials and develop new materials to avoid gene delivery problems. Additionally, it is important to consider the protection of DNA, ease of fabrication, ability to target specific cell types, inexpensive synthesis, facile purification, stability, internalization, endolysosomal escape, efficient unpackaging, nontoxicity, and nonimmunogenicity [13].

Given their high degree of chemical flexibility, polymers are commonly used materials for nanoparticle-based delivery [14, 15]. Polysaccharides are used for pharmaceutical and biomedical applications due to their biocompatibility and nonimmunogenic properties. Currently, there is growing interest in applying these polymers for the development of nanomedicines [16]. In this sense, carboxymethyl cellulose sodium salt

\*Correspondence: lima@iim.unam.mx

<sup>1</sup> Laboratorio de Físicoquímica y Reactividad de Superficies (LaFRS), Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior s/n, Cd. Universitaria, Del. Coyoacán, CP 04510 Mexico City, CDMX, Mexico  
Full list of author information is available at the end of the article



(CMC) is a derivative of cellulose used in food, cosmetics and pharmaceutical products due to its high biocompatibility, biodegradability and low immunogenicity [17]. Another advantage is the ease of chemical modification due to the availability of various functional groups on the glycosidic units (hydroxyls, carboxylic acids) [18].

Furthermore, a polymer coating with polyethylene glycol (PEG) provides protection from uptake by human monocytes. Surface modification of nanoparticles with PEG prolongs the circulation time of the nanoparticles, temporarily avoiding the mononuclear phagocyte system [19]. This polymer is amphiphilic and soluble in water as well as in many organic solvents. This polymer is nontoxic and is approved by the U.S. Food and Drug Administration for use in different pharmaceutical formulations, cosmetics and foods [20].

The nucleic acid nanocarriers are usually captured by the cells and internalized via an endocytic uptake mechanism [21]; they should preferably escape from the endosomes in the cell cytoplasm to avoid nucleic acid degradation and release the encapsulated or complexed nucleic acid. Several strategies have been explored to improve the escape from endosomes such as the incorporation of fusogenic agents. The incorporation of histidine and imidazole into cationic polymers, cationic lipids or peptides has led to nucleic acid delivery [22]. Lipids/peptides in liposomes and polyplexes, with the introduction of an ionizable group, are efficient systems to generate a proton sponge effect inside endosomes [23, 24]. pH-responsive compounds, such as amino acids, have been incorporated into nanocarriers (conjugated) to achieve efficient intracellular delivery of complexed nucleic acid through electrostatic interactions. In this study, copolymers of carboxymethyl cellulose-polyethylene glycol were prepared and functionalized with histidine and lysine for use as carriers of ribosomal RNA.

## Experimental procedures

Carboxymethyl cellulose [CEKOL 700 (7CMC), MW-270,000; CEKOL 30 (3CMC), MW-80,000; degree of substitution (DS)=0.82] was obtained from CPKelco. Hydrochloric acid, acetonitrile, diethyl ether, methanol, poly(ethylene glycol) methyl ether (mPEG-OH, MW = 2000), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide HCl (EDC HCl), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), phosphate-buffered saline (PBS), sodium hydroxide, *L*-lysine, and *L*-histidine monohydrochloride monohydrate were purchased from Sigma-Aldrich. Quant-iT RiboGreen RNA Reagent was purchased from Fisher Scientific, Inc.

## Materials

### Copolymers of carboxymethyl cellulose-polyethylene glycol

Copolymers of carboxymethyl cellulose-polyethylene glycol were synthesized as follows: CMC (1.2 mmol acid) was dissolved in water (30 ml) and pH adjusted to 5 (HCl solution), to which EDC HCl (1.4 mmol), NHS (1.4 mmol), and DMAP (0.2 mmol) were added. The solution was stirred for 1 h at room temperature under dark conditions. After an hour, PEG-OH (0.36 mmol) reagent was added to the CMC-PEG solution. After overnight reaction, the product was precipitated with methanol and washed with a mixture of acetonitrile and diethyl ether (90:10). It was subsequently dissolved in water and precipitated in methanol, filtered and dried at room temperature. EDC HCl, DMAP, and NHS were dissolved in water (2 ml), and mPEG-OH was dissolved in water (4 ml). Two copolymers were synthesized and labeled 7CMC-PEG or 3CMC-PEG according to the precursor of CMC utilized in synthesis (Scheme 1).

### Functionalization of copolymers with amino acids

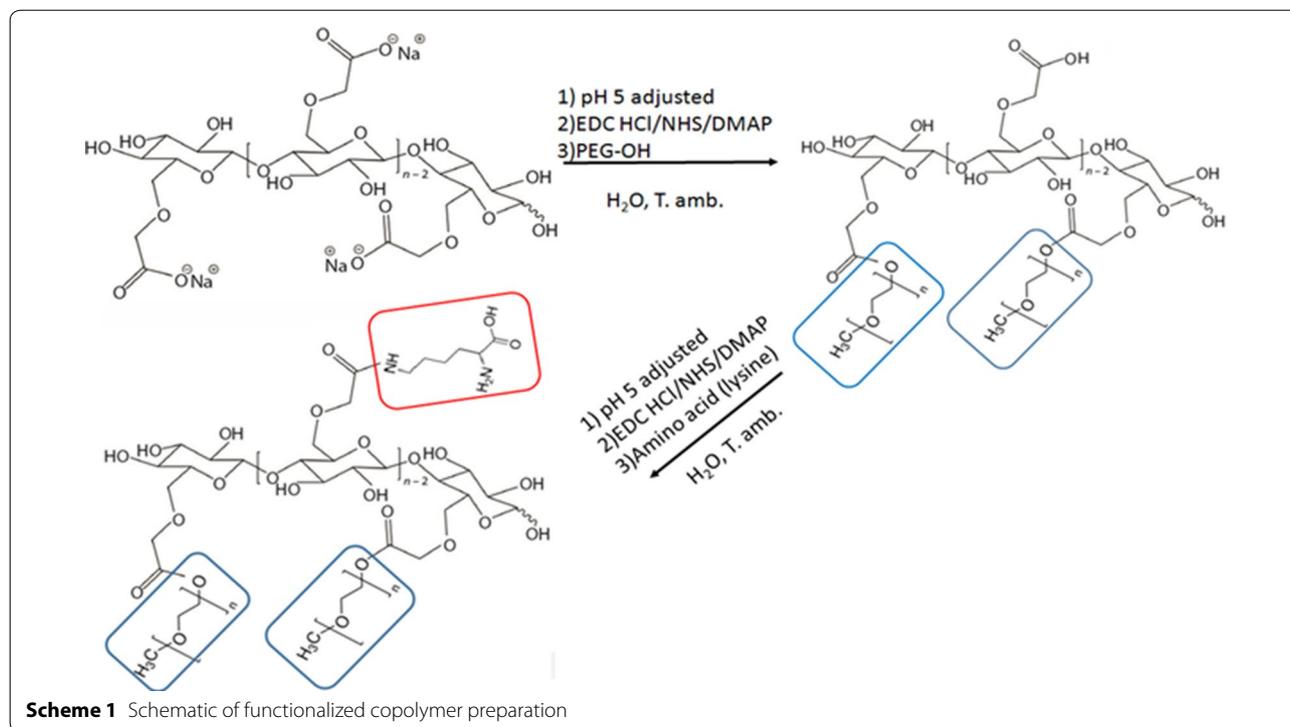
Water at pH 5 was used to dissolve 7CMC-PEG or 3CMC-PEG. Then, EDC HCl (1.4 mmol), NHS (1.4 mmol), and DMAP (0.2 mmol) were added. Lastly, after 1 h, 0.36 mmol of amino acid, histidine or lysine was added (Scheme 1).

### Preparation of nanoparticles of copolymers

The formulation, composed of copolymers (carboxymethyl cellulose-PEG-amino acid) and Tween 80 solution, was prepared by dissolving 3 mg of copolymer in 2.5 ml of sterile solution. The solution at 6% was prepared by diluting Tween 80 in sterile deionized water. The samples were sonicated for 2 h and centrifuged at 12,000 rpm for 30 min. The nanoparticles were suspended in sterile deionized water, and the size of the nanoparticles was measured by dynamic light scattering.

## Characterization

The structures of the materials were characterized by infrared (FTIR) and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (CP MAS NMR) spectroscopies. FTIR spectra (ATR mode) of samples were acquired using a Bruker Alpha FTIR spectrometer. The spectra were recorded at a resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$  in the spectral window  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ .  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR spectra were obtained at a Larmor frequency of 75.4 MHz using a Bruker Avance 300 spectrometer equipped with a 4 mm cross-polarization (CP) MAS probe. The samples were spun at a rate of 5 kHz. Spectra were recorded using a contact time of 5 ms and



$\pi/2$  pulses of 5  $\mu$ s. The chemical shifts were referenced to TMS.

The thermal properties of the materials were characterized by thermogravimetric analysis (TGA). TGA profiles were obtained using a TGA 500 system. Samples were heated at a heating rate of 10  $^{\circ}$ C/min from 30 to 900  $^{\circ}$ C under a nitrogen atmosphere with a flow rate of 1.0 ml/min.

The average hydrodynamic diameter, zeta potential and polydispersity index (PDI) of the nanoparticles were measured by dynamic light scattering (DLS) analysis using a Zeta sizer Nano ZS90 (Malvern Instruments). All measurements were carried out at 25  $^{\circ}$ C, at a detection angle of 90 $^{\circ}$  (for size and PDI) and 120 $^{\circ}$  for zeta potential.

#### Ribosomal RNA onto copolymers

The nanoparticles were suspended in ribosomal RNA solution (2 ml with a 100 ng/ml concentration). The solution was incubated at 8  $^{\circ}$ C for 10 min. Then, the mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 30 min to pellet the nanoparticles. The supernatant was removed and analyzed by the Quant-iT RiboGreen assay (Invitrogen). The amount of ribosomal RNA in the supernatant ( $w$ ) was then subtracted from the total amount of ribosomal RNA added ( $w$ , 100 ng). The experiments were conducted in triplicate. The percentage efficiency ( $E$ ) of ribosomal RNA entrapment to the nanoparticles was calculated using the following formula:

$$E = \frac{(\text{total amount of ribosomal RNA } (w) - \text{free ribosomal RNA in supernatant } (w))}{(\text{total amount of ribosomal RNA } (w))} \times 100$$

Measurement data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation; the comparison between two groups was analyzed using a two-sample t-test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism ver. 5.0 (GraphPad software, USA). P values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

The nanoparticles loaded with ribosomal RNA were suspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS) at a pH of 5, 6 and 7.4. The pH of the PBS was modified using 0.1 M NaOH or 0.1 M HCl. The mixture was then sonicated for 1 h. The nanoparticles were stored at 8  $^{\circ}$ C for periods as long as 1 week. The particle size and zeta potential of polymer complexes were measured at various time points (1 h, 24 h and 1 week).

#### Array of components of hybrid copolymer-RNA

Small-angle X-ray scattering profiles were obtained using a Kratky camera coupled to a copper anode tube. The distance between the sample and the linear proportional counter was 25 cm; a Ni filter selected the Cu KR radiation. The sample was introduced into a capillary tube. The intensity  $I(q)$  was measured for 9 min to obtain high-quality statistics. The SAXS data were processed with the

ITP program [25–27], where the scattering angle ( $q$ ) is defined as  $q = 2\pi\sin\theta/\lambda$ , where  $\theta$  and  $\lambda$  are the X-ray scattering angle and the wavelength, respectively. The shape and size distribution function of the scattering objects was estimated from the Kratky plot,  $q^2I(q)$  against  $q$ . Lastly, the fractal dimension of the scattering objects was estimated from the slope of the curve  $\log I(q)$  vs  $\log(q)$  [28, 29].

## Results and discussion

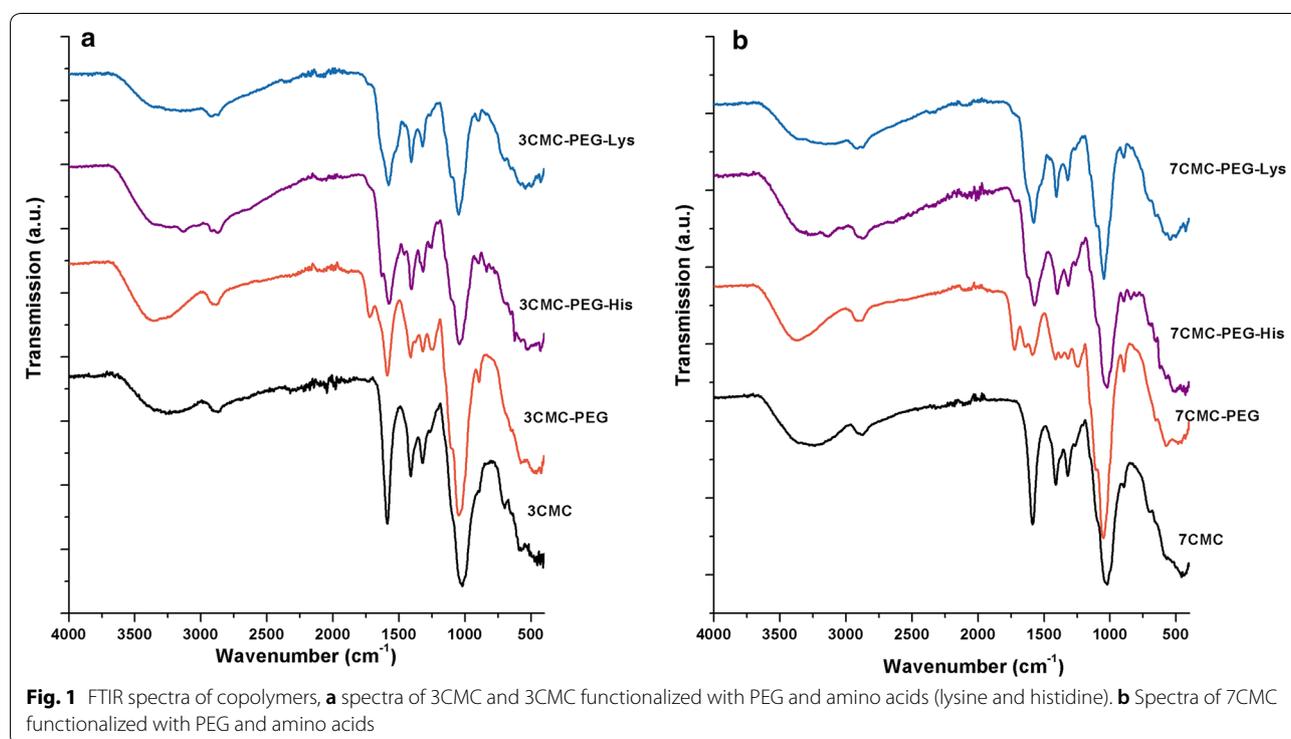
### Functionalization of copolymers

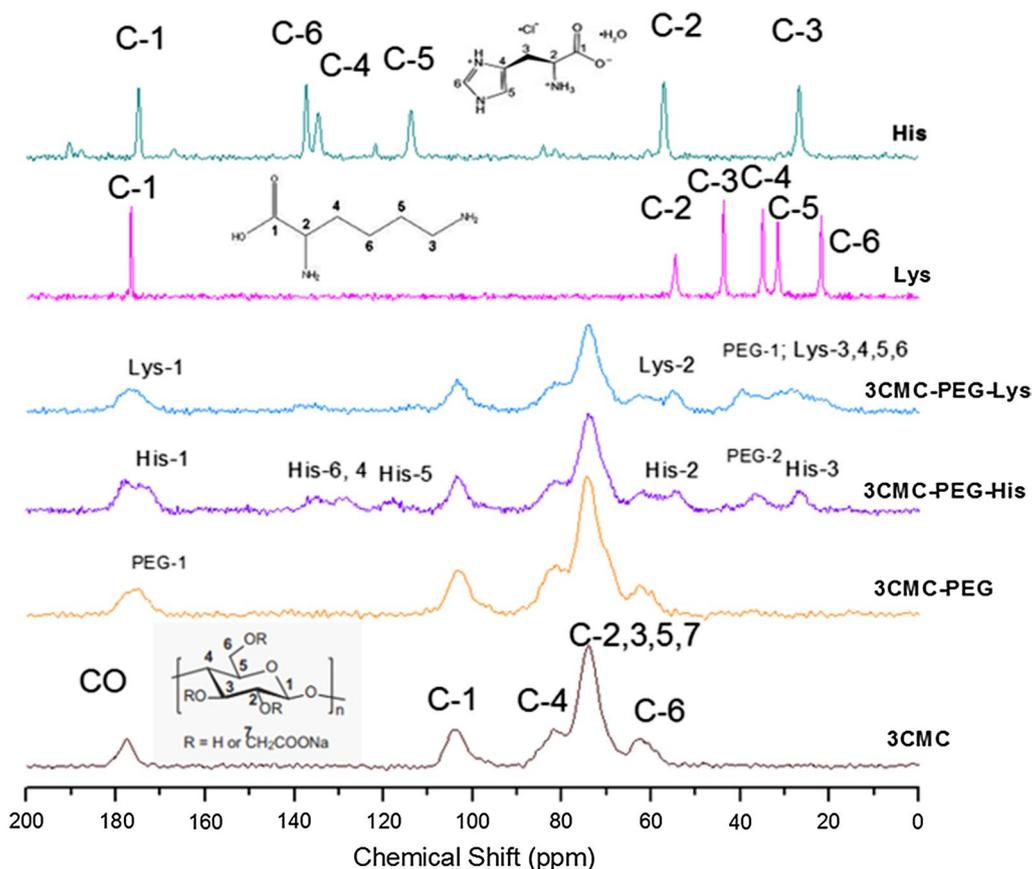
The FTIR spectra of two polymers functionalized with amino acids are shown in Fig. 1. The spectra of carboxymethyl celluloses are also included as a reference. The spectra of both celluloses, 3CMC and 7CMC, present a broad absorption band at  $3422\text{ cm}^{-1}$ , which is due to the stretching vibrational mode of the hydroxyl group. The band at  $2924\text{ cm}^{-1}$  is assigned to the  $\nu_{\text{C-H}}$  stretching vibration. The absorption band at  $1613\text{ cm}^{-1}$  is assigned to  $\nu\text{ C=O}$  present in carboxyl group. The band at  $1062\text{ cm}^{-1}$  is due to C–O–C stretching. The spectra of copolymers 3CMC-PEG and 7CMC-PEG fit relatively well with that of celluloses; however, it must be emphasized that the bands at  $1740\text{ cm}^{-1}$  for 3CMC-PEG and at  $1742\text{ cm}^{-1}$  for 7CMC-PEG are ascribed to the C=O stretching mode of the ester groups [30, 31]. These bands confirm that polyethylene glycol (PEGOH) had been linked to sodium carboxymethyl cellulose. The spectra

of copolymers functionalized with histidine and lysine, 3CMC-PEG-His and 3CMC-PEG-Lys, did not show significant differences from that of 3CMC. A similar behavior was observed with the spectra of functionalized copolymers 7CMC. To obtain complementary information about the structure of these materials, solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR measurements were performed.

Figure 2 displays the  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR spectra of celluloses and amino acids as references and their corresponding copolymers. In the spectra of 3CMC and 7CMC, the broad NMR peaks at 178, 104, 83, 75, and 63 ppm were assigned to the carbonyl carbons, C1 and C4, and the overlap of C2, C3, C5, C7, and C6, respectively [32]. The peaks due to histidine were resolved at 174.94, 137.36, 134.42, 67.06 and 26.86 ppm. The assignment of these peaks is performed for the corresponding spectrum according to the number of carbons in Fig. 2.

The spectra of 3CMC-PEG and 7CMC-PEG exhibit a new signal close to 177 ppm, in addition to the resonances of celluloses. This peak suggests that the  $-\text{COOH}$  groups of carboxymethyl cellulose reacted with the hydroxyl groups of PEGOH to form the ester crosslink. In the spectrum of 3CMC-PEG-His, Fig. 2, the peaks between 110 and 140 ppm, assigned to aromatic carbons, are broader, and a downfield shift was observed for carbons C-2 (carbon bonded to amine in histidine). Furthermore, an additional peak at 174 ppm was observed. These observations can be explained as the aromatic ring





**Fig. 2**  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR spectra of carboxymethylcellulose (low molecular weight, 3CMC) and carboxymethylcellulose functionalized with PEG and amino acids (lysine, histidine)

of histidine interacting with the 3CMC-PEG surface and CMC-PEG reacting with the amino groups (C-2) of histidine to form the amide link. Regarding the spectra of copolymers containing lysine, the broadness of aliphatic carbons C3, C4, C5, and C6 indicates that lysine interacts with the copolymer through the amine at the end of chain, reducing the motion of four carbons.

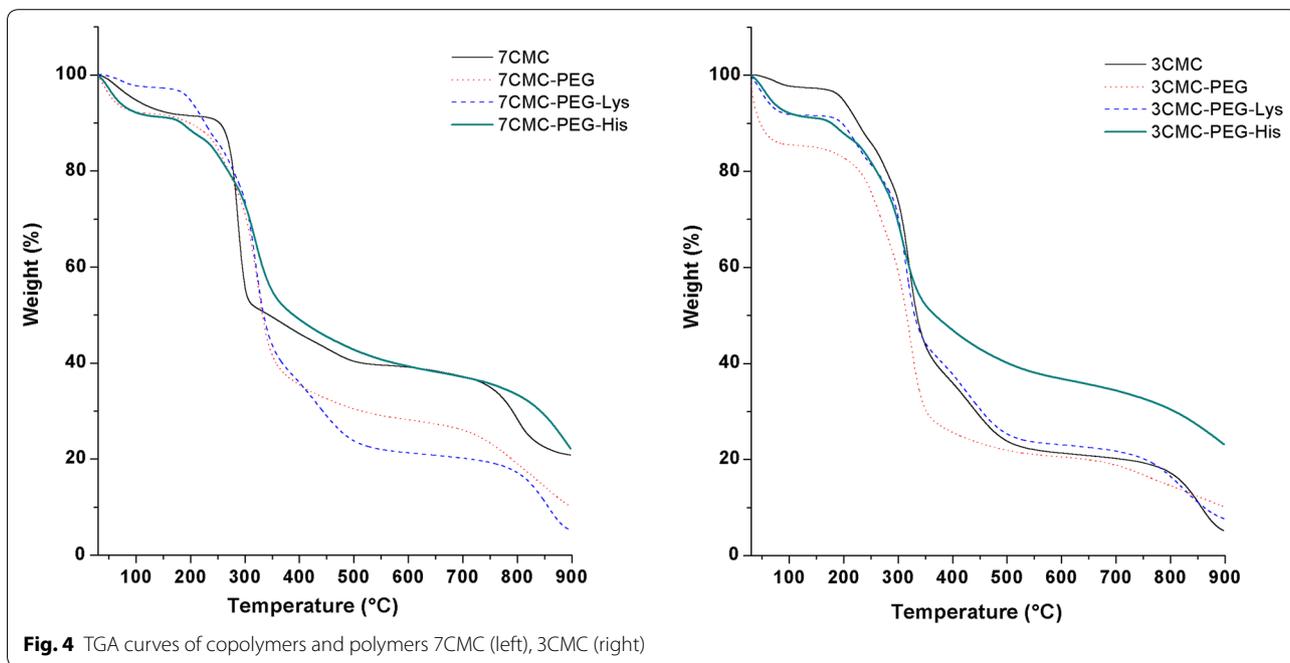
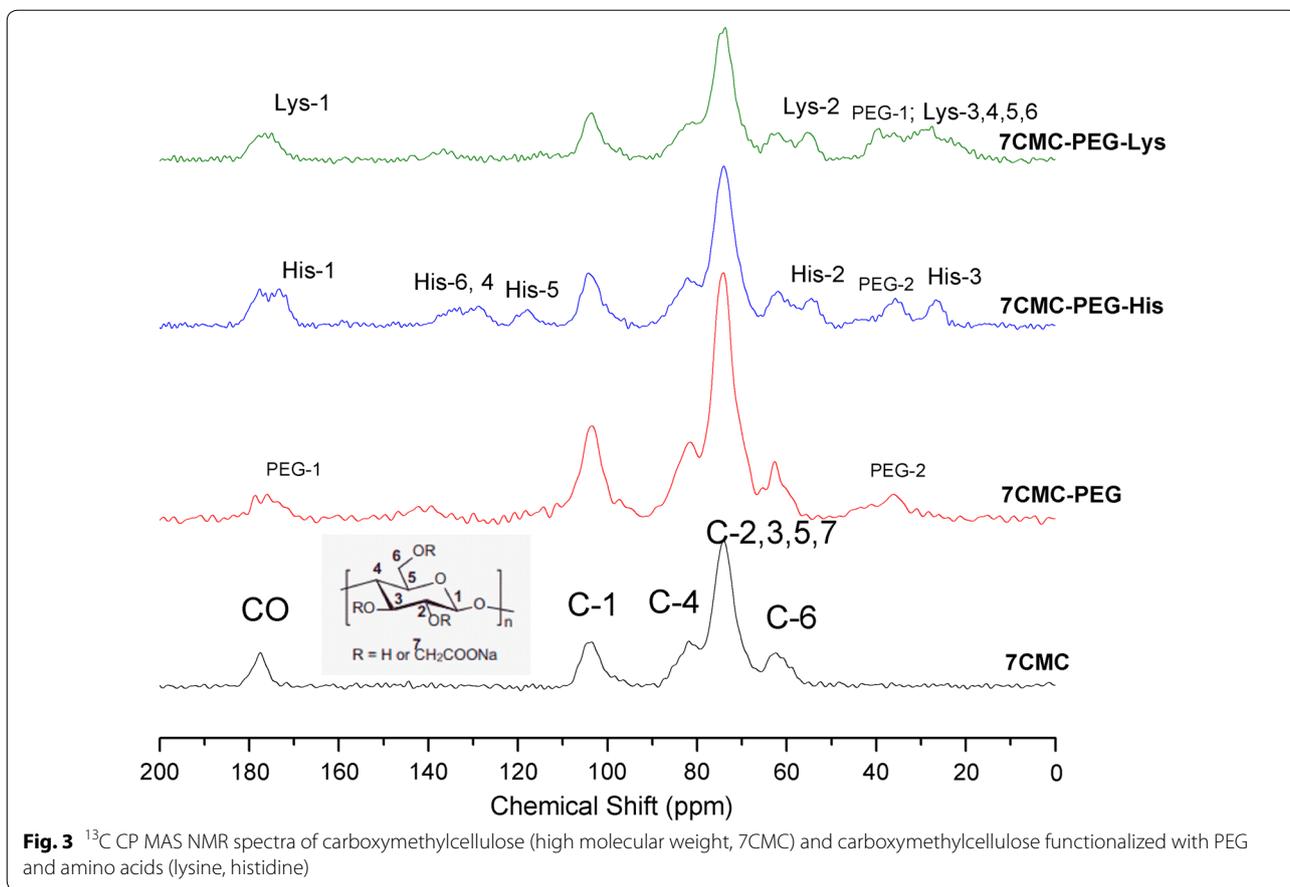
The  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR spectra in Fig. 3 correspond to samples synthesized with 7CMC, and a similar behavior to the series of samples with 3CMC was observed.

The TG curves of copolymers prepared from 7CMC are shown in Fig. 4. The degradation of polymers occurs in two steps. The first TG step (2–15% mass loss), due to the loss of adsorbed water, occurs in the range from 30 to 150 °C. The second TG step occurs in the 250–460 °C temperature range, with a mass loss (30–40%). This step is attributed to the degradation of the side chain and the loss of  $\text{CO}_2$  [33, 34]. The copolymers began to degrade at approximately 150 °C, and the final decomposition temperature was found at approximately 450 °C. The higher decomposition temperature indicates that copolymers

are more thermally stable than 7CMC and 3CMC. Table 1 compares the degradation temperatures and percentage mass for individual polymers and their blends. The TGA profiles of copolymers with PEG or amino acids show more than two degradation steps. The two mass losses between 150 and 260 can be attributed to the loss of  $\text{CO}_2$ ,  $-\text{OCH}_3$  groups of PEG and  $-\text{NH}_2-\text{R}$  groups.

#### Particle size distribution

The data reported in Table 2 include the particle size, the polydispersity index (PDI) and the zeta-potential values. The particle size ranged between 9 and 14 nm. Particles of copolymers prepared with 7CMC were smaller than those prepared from 3CMC, suggesting that molecular weight is an important parameter influencing the crosslinking between cellulose and polyethylene glycol. Loading amino acids induces an increase in particle size; however, no direct correlation was observed between amino acids and increasing particle size. It should be mentioned that particles of copolymers containing 7CMC were the materials with the largest PDI



**Table 1 TG data for carboxymethylcellulose and copolymers**

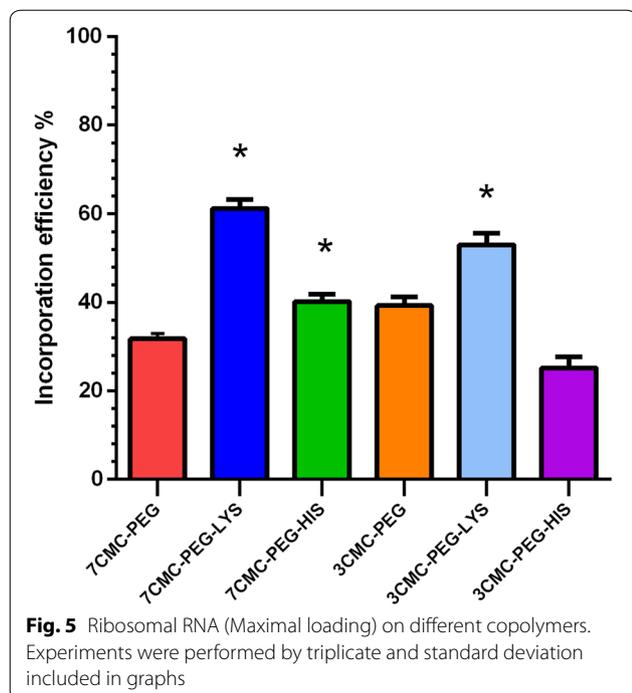
Sample	Decomposition step	Temperature (°C)		Weight loss %
		Start	End	
7CMC	1st	30	175	8
	2nd	175	350	42
7CMC-PEG	1st	30	150	8
	2nd	150	280	14
	3rd	280	420	43
7CMC-PEG-His	1st	30	150	8
	2nd	150	215	5
	3rd	215	270	10
	4th	270	450	30
7CMC-PEG-Lys	1st	30	150	2
	2nd	150	250	13
	3rd	250	280	9
	4th	280	400	40
3CMC	1st	30	150	2
	2nd	150	255	14
	3rd	250	380	40
3CMC-PEG	1st	30	150	15
	2nd	150	285	20
	3rd	285	450	40
3CMC-PEG-His	1st	30	150	8
	2nd	150	250	8
	3rd	250	382	39
3CMC-PEG-Lys	1st	30	150	8
	2nd	150	210	6
	3rd	210	270	8
	4th	270	460	34

values. In fact, a width of 30% PDI is often considered the frontier between mono- and polydisperse. This corresponds to PDI equal to 0.09, which leads to the recommendation that PDI < 0.1 is monodisperse and PDI > 0.1 is multimodal. Thus, all the prepared copolymers are multimodal, except 3CMC-PEG-Hys, and these results

are in line with previous results obtained for other polymeric systems [35–37]. Lastly, a remarkable difference was observed between polymers containing 3CMC and 7CMC. When amino acids are loaded onto copolymers with 7CMC, the Z-potential becomes more positive with respect to that of amino acid-free copolymers.

**Table 2 Particle size (diameter), polydispersity index (PDI) and Zeta potential of samples under study as determined by DLS data**

Sample	Without ribosomal RNA			Loaded with ribosomal RNA		
	Particle size ± SD (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	Particle size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
7CMC-PEG	9.83 ± 0.12	0.151	− 25.3	12.98 ± 0.07	0.22	− 25.9
7CMC-PEGLys	12.24 ± 0.07	0.34	− 25.06	9.14 ± 0.11	0.16	− 17.6
7CMC-PEGHis	11.39 ± 0.075	0.25	− 24.66	11.27 ± 0.09	0.22	− 20.9
3CMC-PEG	11.2 ± 0.035	0.25	− 3.22	14.18 ± 0.05	0.27	− 27.6
3CMC-PEGLys	13.01 ± 0.039	0.099	− 5.95	11.92 ± 0.15	0.22	− 19.9
3CMC-PEGHis	13.9 ± 0.049	0.175	− 9.84	13.96 ± 0.02	0.23	− 23.4



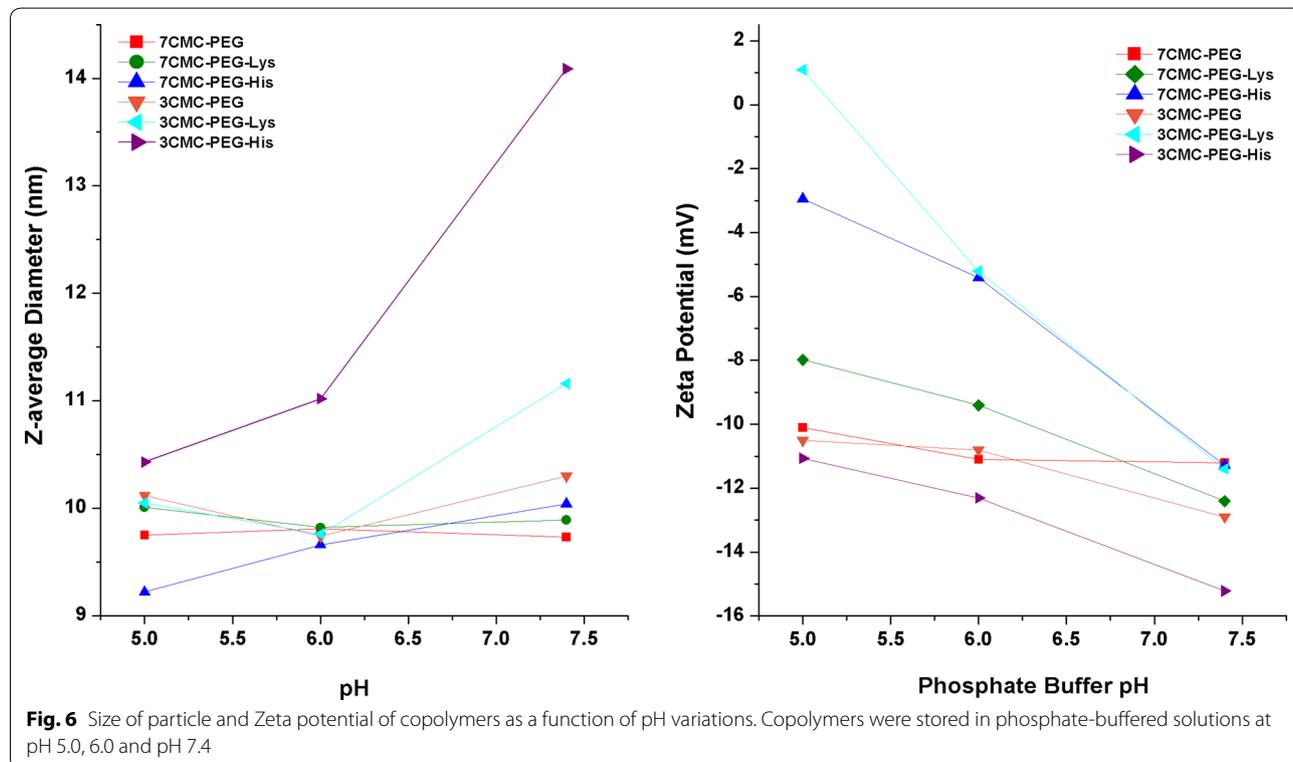
In contrast, the opposite trend was observed for the series containing 3CMC. This result can be explained as the degree of substitution between 7CMC and 3CMC

polymeric chains being very different because the substitution groups drive the surface interactions, which in turn determine the electrostatic charge.

**RNA as guest in CMC-PEG-amino acid hosts**

The histogram of Fig. 5 plots the amount of RNA adsorbed on different copolymers. The loaded RNA amount is expressed as a percentage of the RNA retained by copolymers from the total amount put in contact with particles. The highest fraction of RNA was loaded in both copolymers functionalized with lysine. The copolymer retaining the lowest fraction of RNA was 3CMC-PEG-His. The statistical parameters confirmed the efficiency of copolymers containing lysine. Compared to that in 7CMC-PEG, the incorporation efficiency in 7CMC-Lys was significantly increased ( $t=21.94$ ,  $P=0.0001$ ), as was the incorporation efficiency of 3 CMC-PEG LYS compared to that of 3 CMC PEG ( $t=7.236$ ,  $P=0.0019$ ).

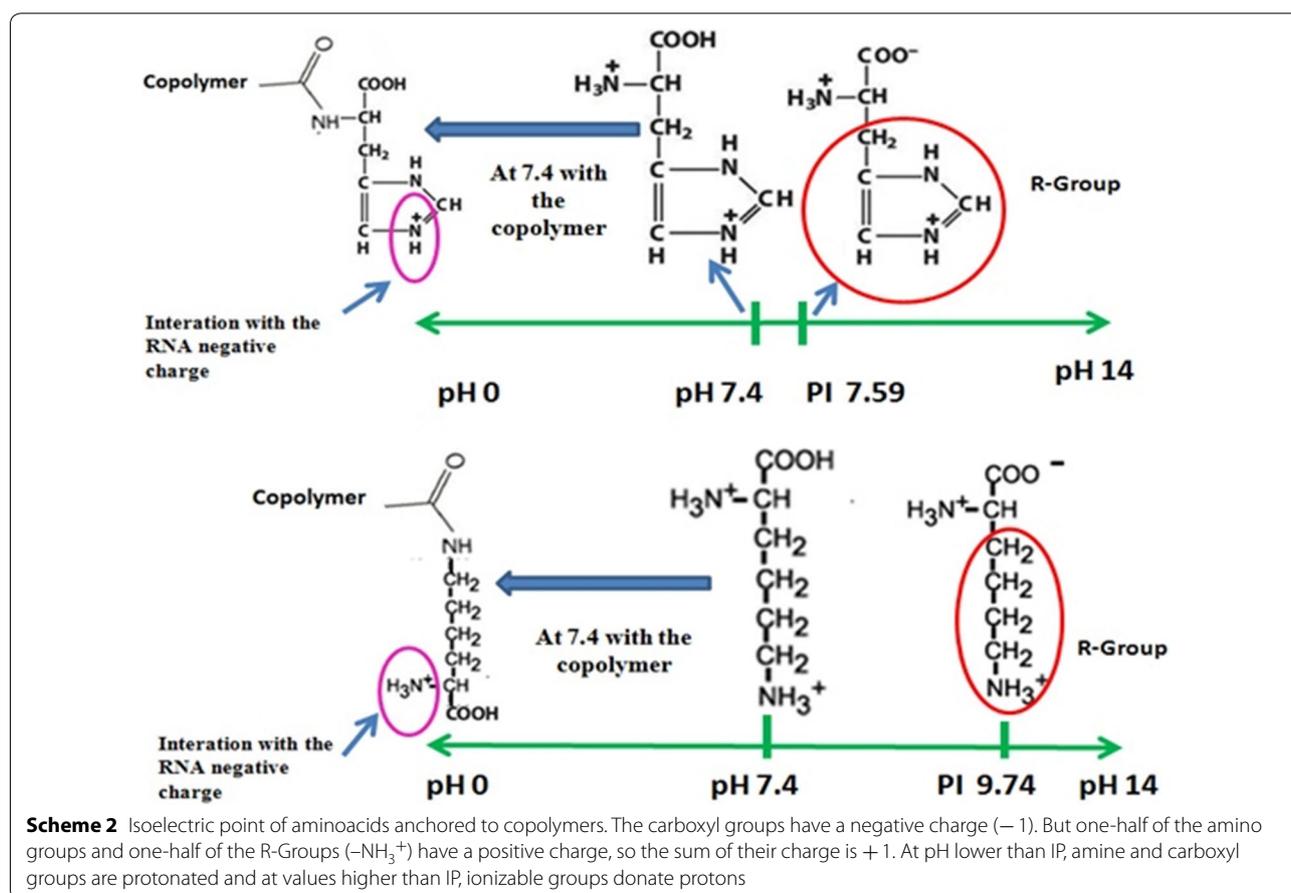
RNA loading, of course, changes the particle size, as shown in Table 2. In both amino acid-free copolymers, the particle size increases approximately 3 nm after RNA incorporation. The PDI value increases slightly upon RNA loading on both 7CMC-PEG and 3CMC-PEG copolymers. This result suggests that as a consequence of RNA loading, particles have a broader molecular weight distribution. This effect was observed earlier in polymeric systems where the RNA



loading did not reach a saturation level [38]. The size does not increase with RNA adsorption onto all amino acid-copolymer systems. The copolymers functionalized with histidine had almost the same particle size before and after the RNA loading. The size of particles containing lysine decreases by approximately 2 nm, which is an unexpected result explained as follows: the acidic hydrogen permits a strong interaction between the functionalized surface of the copolymer and RNA. This compactness (or condensation) behavior was also previously observed in other polymeric systems [39, 40], and it will be confirmed below by SAXS results. Furthermore, the presence of RNA on particles significantly changes the Z-potential values. With RNA, the Z-potential becomes more positive for samples prepared from 7CMC and more negative for samples prepared from 3CMC. Before RNA loading, the Z-potential value was very different between samples containing 3CMC and that prepared from 7CMC. However, this difference was clearly lessened after RNA loading. Interestingly, the most positive materials containing RNA are those using lysine in functionalization, and the most negative are those free of amino

acids. RNA is anchored to the surface of copolymers, but the surface properties of copolymers are crucial to the resulting hybrid RNA-copolymer materials. Because of these results, it is expected that materials differ significantly in response to changes in pH. The incorporation of pH-sensitive amino acids onto copolymers enables controlled endolysosomal escape. In this context, Fig. 6a plots the particle size of RNA-copolymers as a function of pH. The size of the nanoparticles decreases when the pH becomes acidic. At pH 7.4, the carboxyl groups are present in the form  $-\text{COOH}$ , and free amino groups (the other amino group forms the ester crosslink with CMC) are present in the protonated form,  $\text{NH}_3^+$ . Therefore, the electrostatic interaction between RNA and polymers becomes significantly favorable between the amino group and the negatively charged RNA, Scheme 2; consequently, the size of the particle decreases. No critical changes in the size of 7CMC-PEG and 3CMC-PEG were observed when the pH changed due to the absence of amino acids that give ionizable properties to the polymer.

To deduce the stability of particles, they were suspended in water at different pH values, and the particle



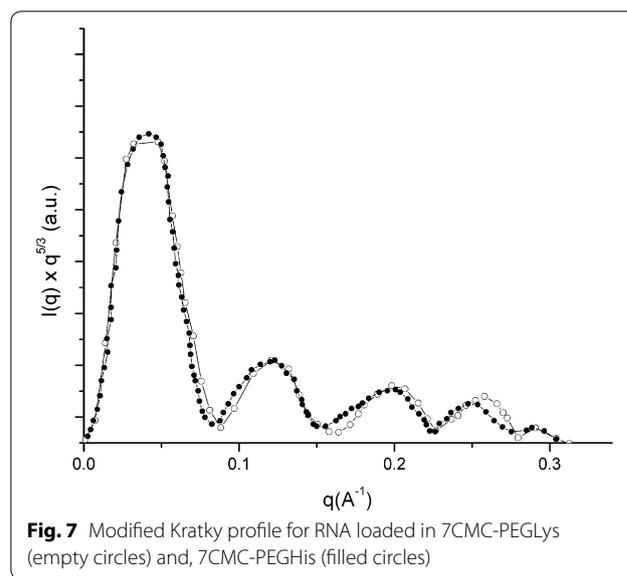
**Table 3 Particle size (diameter (nm)) of RNA-copolymers under different conditions of pH**

Sample	Deionized water pH 7			pH 5			pH 6			pH 7.4		
	1 h	24 h	1 week	1 h	24 h	1 week	1 h	24 h	1 week	1 h	24 h	1 week
7CMC-PEG												
Size	12.98	29.09	50.72	9.75	9.49	9.74	9.81	11.72	120.86	9.73	11.51	10.32
PDI	0.22	0.2	0.38	0.05	0.1	0.16	0.09	0.28	0.34	0.06	0.24	0.16
7CMC-PEGLys												
Size	9.34	8.97	9.53	10.01	10.04	10.02	9.82	9.81	9.89	9.89	45.95	10.04
PDI	0.16	0.14	0.15	0.13	0.19	0.13	0.1	0.16	0.09	0.13	0.15	0.18
7CMC-PEGHis												
Size	11.27	11.94	13.71	9.22	9.78	9.88	9.66	9.75	9.98	10.04	9.96	10.09
PDI	0.22	0.15	0.32	0.12	0.09	0.1	0.07	0.11	0.13	0.08	0.16	0.14
3CMC-PEG												
Size	14.18	26.37	176.3	10.12	10.17	10.28	9.74	10.39	9.96	10.3	10.01	11.65
PDI	0.27	0.16	0.28	0.12	0.16	0.16	0.08	0.2	0.13	0.31	0.22	0.31
3CMC-PEGLys												
Size	11.92	12.12	12.31	10.05	11.52	9.67	9.76	9.89	10.54	11.16	119.1	59.75
PDI	0.22	0.24	0.22	0.08	0.22	0.06	0.07	0.09	0.15	0.12	0.23	0.18
3CMC-PEGHis												
Size	13.96	15.39	14.62	10.43	10.58	10.41	11.02	13.62	11.0	14.09	10.04	10.51
PDI	0.23	0.4	0.45	0.17	0.16	0.18	0.24	0.35	0.26	0.21	0.21	0.25

size was measured over time. The results are summarized in Table 3. It is remarkable that at the same pH value, only slight changes were observed for the copolymers functionalized with amino acids, i.e., they were stable for periods as long as 1 week. At same time, the pH value is a parameter that also slightly influences the particle size, but no simple correlation was observed. The samples without amino acids, 7CMC-PEG and 3CMC-PEG, form agglomerates for periods as long as 24 h. It should be concluded that the incorporation of amino acids in the polymer chains generates stability in the aqueous medium.

Interestingly, the particle size of the sample with lysine (7CMC-PEG-Lys) remained stable from pH 7.4 to acidic pH. This can be attributed to the value of the isoelectric point (pH where the molecule has a net charge of zero), in the case of lysine, which is 9.74. At pH 7.4, it is probable that the amino groups and the carboxyl group are completely protonated. The histidine has an isoelectric point of 7.59. At physiological pH, it is probable that not all the  $-\text{COOH}$  and  $\text{NH}_2$  groups of the copolymer are protonated, Scheme 2.

In Fig. 6, the zeta potential measured in different copolymers stored at different pH values is plotted. The polymers presented a negative charge under a physiological environment (pH 7.4), but the surface charge became slightly more positive at lower pH. The change in zeta potential can be attributed to protonation of the amine



**Fig. 7** Modified Kratky profile for RNA loaded in 7CMC-PEGLys (empty circles) and, 7CMC-PEGHis (filled circles)

group under low-pH conditions. The surface charges of polymers play a role in cell uptake and blood stability. Generally, positively charged polymers promote cellular uptake due to the greater affinity for negatively charged cell membranes, but they tend to undergo rapid clearance from blood due to the strong interaction with the serum. Furthermore, negatively charged polymers can resist

**Table 4 Particle size and fractal dimension of RNA-copolymer particles as determined by SAXS data**

Sample	Loaded with ribosomal RNA	
	Particle size (nm)	Fractal dimension
7CMC-PEG	12.42	2.81
7CMC-PEGLys	12.61	2.76
7CMC-PEGHis	12.97	2.62
3CMC-PEG	13.01	2.89
3CMC-PEGLys	13.14	2.73
3CMC-PEGHis	13.88	2.66

protein absorption, leading to a longer blood circulation time [41].

In summary, the results suggest that changes in the pH allow the polymer complexes to escape endosomal entrapment at acidic pH values (5 and 6). Thus, as a consequence of the protonation of carboxyl and amine groups, the polymers could reversibly convert surface charges in response to pH, facilitating endosome escape and cellular uptake. The pH dependence of the charge could be modulated by varying the molar ratio of carboxyl or amino groups.

#### Array of the RNA-copolymer hybrid system

Figure 7 shows SAXS profiles, more precisely the Kratky modified plots [ $I(q) \times q^{5/3}$  vs  $q$ ], of the RNA-copolymers. The modified Kratky plots have a main peak as well as a number of secondary peaks, and these profiles indicate that scattered objects have a globular shape. No significant differences concerning the shape of scattered particles were observed among the copolymers under study. The copolymer particle sizes were estimated from the SAXS data curves by fitting to a poly-disperse system of spheres. Table 4 shows that the size of RNA-copolymers ranges between 12.42 and 13.88 nm. The highest particle size was achieved when copolymers were prepared from 3CMC, which is in line with results obtained from DLS data. In general, RNA-copolymers functionalized with histidine are larger than those functionalized with lysine, confirming that protonation of amino acids is an important parameter for determining the interaction of copolymers with RNA. In this context, the fractal dimension value is a useful parameter because the loading of RNA onto copolymers without amino acids leads to spherical dense particles. However, the fractal dimension decreases when RNA is incorporated into the copolymers functionalized with amino acids, i.e., the particle size increases but the density decreases. Among the two functionalized amino acids, the polymers containing histidine lead

to the most and least dense RNA copolymers; in other words, the spheres are not “hard” but respond to interactions of amino acids with copolymers and with RNA.

#### Conclusion

PEGylated link polymers of carboxymethyl cellulose were effectively synthesized by EDC-NHS reaction and coupling amino acids onto the side groups of CMC-PEG copolymers. Copolymers were formed as stable soft spheres. Functionalization with lysine and histidine is crucial to obtaining copolymers prone to adsorbing ribosomal RNA; the type of amino acid determines the electric charge on the external surface of the spherical copolymer where RNA is incorporated. RNA-copolymers are partially stable as the amino acid-RNA interactions vary with pH, which could facilitate the release of RNA; this is a promising result because this RNA-copolymer system could then be used for RNA delivery.

#### Authors' contributions

MH and GL conducted the preparation of copolymers and physicochemical characterization; MH and AG achieved the functionalization of copolymers; MH and JM performed the RNA loading onto copolymers. VL and CF performed SAXS characterization. MH and EL: Designed the experiments and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

#### Author details

<sup>1</sup> Laboratorio de Físicoquímica y Reactividad de Superficies (LaFRS), Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior s/n, Cd. Universitaria, Del. Coyoacán, CP 04510 Mexico City, CDMX, Mexico. <sup>2</sup> Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior s/n, Cd. Universitaria, Del. Coyoacán, CP 04510 Mexico City, CDMX, Mexico. <sup>3</sup> Departamento de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación, Calz. México Xochimilco No 289, CP 14389 Mexico City, CDMX, Mexico. <sup>4</sup> Instituto Politécnico Nacional - ESIQIE, Avenida IPN UPALM Edificio 7, Zacatenco, 07738 Mexico City, CDMX, Mexico. <sup>5</sup> Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo (CIIEMAD), Instituto Politécnico Nacional, Calle 30 de Junio de 1520 s/n, Barrio la Laguna Ticomán, 07340 Mexico City, CDMX, Mexico. <sup>6</sup> Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixo No. 186, Col. Vicentina, CP 09340 Mexico City, CDMX, Mexico.

#### Acknowledgements

We are grateful to G. Cedillo and A. Tejada for their technical assistance.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Availability of data and materials

All the data are mentioned. Not applicable.

#### Funding

This work was financially supported by CONACYT (Grant 220436) and PAPIIT-IN106517.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 2 June 2018 Accepted: 8 March 2019

Published online: 23 March 2019

## References

1. Parlea L, Puri A, Kasprzak W, Bindewald E, Zakrevsky P, Satterwhite E, Joseph K, Afonin KA, Shapiro BA (2016) Cellular delivery of RNA nanoparticles. *ACS Comb Sci*. 18:527–547
2. Uchida S, Kinoh H, Ishii T, Matsui A, Tockary T, Takeda K, Uchida H, Osada K, Itaka K, Kataoka K (2016) Systemic delivery of messenger RNA for the treatment of pancreatic cancer using polyplex nanomicelles with a cholesterol moiety. *Biomaterials* 82:221–228
3. Zheng X, Pang X, Yang P, Wan X, Wei Y, Guo Q, Zhang Q, Jiang X (2017) A Hybrid siRNA delivery complex for enhanced brain penetration and precise amyloid plaque targeting in Alzheimer's disease mice. *Acta Biomater* 49:388–401
4. Wang J, Lu Z, Wientjes G, Au J (2010) Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *AAPS J* 12:492–503
5. Sun Y, Zhao Y, Zhao X, Lee R, Teng L, Zhou C (2017) Enhancing the therapeutic delivery of oligonucleotides by chemical modification and nanoparticles encapsulation. *Molecules* 22:1724
6. Wang L, Arrabito G (2015) Hybrid, multiplexed, functional DNA nanotechnology for bioanalysis. *Analyst*. 140:5821–5848
7. Hardee C, Arevalo L, Hornstein B, Zechiedrich L (2017) Advances in non-viral DNA vectors for gene therapy. *Genes*. 8:65
8. Lai W (2014) Cyclodextrins in non-viral gene delivery. *Biomaterials* 35:401–411
9. Kodama Y, Kuramoto H, Mieda Y, Muro T, Nakagawa H, Kurosaki T, Sakaguchi M, Nakamura T, Kitahara T, Sasaki H (2017) Application of biodegradable dendrigraft poly-L-lysine to a small interfering RNA delivery system. *J Drug Target* 25:49–57
10. Gonzalez B, Howard K (2012) Polycation based nanoparticle delivery of RNAi therapeutics: adverse effects and solutions. *Adv Drug Deliv Rev* 64:1717–1729
11. Swati B, Torchilin V (2013) Dendrimers for siRNA delivery. *Pharmaceuticals* 6:161–183
12. Ding Y, Jiang Z, Saha K, Chang S, Sung T, Ryan L, Rotello V (2014) Gold nanoparticles for nucleic acid delivery. *Mol Ther* 22:1075–1083
13. Getz T, Mendintz I, Delehanty J, Susumu K, Dawson P, Dawson G (2016) Quantum Dot-mediated delivery of siRNA to inhibit sphingomyelinase activities in brain-derived cells. *J Neuro Chem*. 139:872–885
14. Pack D, Hoffman A, Pun S, Staylon P (2005) Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 4:581–593
15. Kamaly N, Yameen B, Wu Y, Farokhzad OC (2016) Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chem Rev* 116:2602–2663
16. Remdonck K, Martens T, Braeckmans K, Demeester J, Smedt S (2013) Polysaccharide-based nucleic acid nanoformulations. *Adv Drug Deliv Rev* 65:1123–1147
17. Kono H (2014) Characterization and properties of carboxymethyl cellulose hydrogels crosslinked by polyethylene glycol. *Carbohydr Polym* 106:84–93
18. Fekete T, Borsa J, Takács E, Wojnárovits L (2016) Synthesis of carboxymethylcellulose/acrylic acid hydrogels with superabsorbent properties by radiation-initiated crosslinking. *Radiat Phys Chem* 124:135–139
19. Nelson C, Kintzing J, Hanna A, Shannon J, Gupta M, Duvall C (2013) Balancing cationic and hydrophobic content of PEGylated siRNA polyplexes enhances endosome escape, stability, blood circulation time, and bioactivity in vivo. *ACS Nano* 7:8870–8880
20. Fuertges F, Abuchowski A (1990) The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *J Control Release* 11:139–148
21. Ma D (2014) Enhancing endosomal escape for nanoparticles. *Nanoscale*. 6:6415–6425
22. Hakamatani T, Asayama S, Kawakami H (2018) Synthesis of alkylated poly(1-vinylimidazole) for a new pH-sensitive DNA carrier. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 52:677–678
23. Malamas S, Gujrati M, Kummitha CM, Xu R, Lu ZR (2013) Design and evaluation of new pH-sensitive amphiphilic cationic lipids for siRNA delivery. *J Control Release* 171:296–307
24. Bennis JM, Choi J, Mahato R, Park J, Kim S (2000) pH sensitive cationic polymers gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. *Bioconjug Chem* 5:637–645
25. Glatter O (1977) Data evaluation in small angle scattering: calculation of the radial electron density. *Acta Phys Aust*. 47:83–102
26. Glatter O (1977) A new method for the evaluation of small-angle scattering data. *J Appl Crystallogr* 10:415–421
27. Glatter O (1980) Evaluation of small-angle scattering data from lamellar and cylindrical particles by the indirect transformation method. *J Appl Crystallogr* 13:7–577
28. Guinier A, Fournet G (1955) Small angle scattering of X-rays. Wiley, New York
29. Glatter O, Kratky O (1982) Small angle X-ray scattering. Academic Press, New York
30. Biswall D, Singh R (2004) Characterisation of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer. *Carbohydr Polym* 57:379–387
31. Barbucci R, Magnani A, Consumi M (2000) Swelling behavior of carboxymethylcellulose hydrogels in relation to cross-linking, pH, and charge density. *Macromolecules* 33:7475–7480
32. Kono H, Onishi K, Nakamura T (2013) Characterization and bisphenol adsorption capacity of  $\beta$ -cyclodextrin-carboxymethylcellulose-based hydrogels. *Carbohydr Polym* 15:784–792
33. Fang Y, Gang L, Yan-Gang H, Feng-Xia R, Gui-Xiang W (2009) Synthesis, characterization, and applied properties of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer. *Carbohydr Polym*. 78:95–99
34. Jasaswini T, Dinesh K, Kunj B (2009) Graft copolymerization of N-vinylformamide onto sodium carboxymethylcellulose and study of its swelling, metal ion sorption and flocculation behaviour. *Carbohydr Polym* 75:604–611
35. Zhou Z, Xia X, Bong D (2015) Synthetic polymer hybridization with DNA and RNA directs nanoparticle loading, silencing delivery, and aptamer function. *JACS*. 137:8920–8923
36. Cheng C, Convertine A, Stayton P, Bryers J (2012) Multifunctional triblock copolymers for intracellular messenger RNA delivery. *Biomaterials* 33:6868–6876
37. Piotr S, Kowalski U, Palmiero Y, Arnab R, Langer R, Anderson D (2018) Ionizable amino-polyesters synthesized via ring opening polymerization of tertiary amino-alcohols for tissue selective mRNA delivery. *Adv Mater* 30:1801151
38. Heyes J, Palmer L, Bremner K, MacLachlan I (2005) Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *J Contr Rel*. 107:276–287
39. Katayose S, Kataoka K (1997) Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) blockcopolymer. *Bioconjug Chem* 8:702–707
40. Itaka K, Yamauchi K, Harada A, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K (2003) Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency. *Biomaterials* 24:4495–4506
41. Lee Y, Miyata K, Oba M, Ishii T, Fukushima S, Han M, Koyama M, Nishiyama N, Kataoka K (2008) Charge-conversion ternary polyplex with endosome disruption moiety: a technique for efficient and safe gene delivery. *Angew Chem*. 47:5163–5166