



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Polímeros Covalentes Dinámicos en el Desarrollo de Vectores de Entrega
de Material Genético

Dynamic Covalent Polymers for the Development of Gene Delivery Vectors

Autor

Álvaro Peña Moreno

Directores

Jesús del Barrio Lasheras

Silvia Hernández Ainsa

Facultad de Ciencias - Departamento de Química Orgánica

Grupo de Cristales Líquidos y Polímeros

Agradecimientos

Antes de empezar, me gustaría agradecer la elaboración de este Trabajo Fin de Grado a mis directores Jesús Del Barrio y Silvia Hernández, por su total disposición ante cualquier duda. Darles las gracias por su ayuda y atención en todo momento en este curso tan atípico. Dar las gracias también a los investigadores del INA, que me han tratado como uno más y me han ayudado en todo lo que he necesitado. Todos ellos personas magníficas.

Por último, pero no menos importante, dar las gracias a mi familia y amigos que son un pilar fundamental en mi vida.

Resumen: “Polímeros Covalentes Dinámicos en el Desarrollo de Vectores de Entrega de Material Genético”.

La QCD ha surgido debido a que la química supramolecular no puede suplir ciertas aplicaciones en las que se requiere mayor grado de adaptabilidad. Con la QCD se obtiene este grado de adaptabilidad mediante enlaces covalentes reversibles, junto con el carácter dinámico que otorga la reversibilidad de los enlaces. Para la transfección génica es necesario el uso de vectores. Se ha puesto énfasis durante los últimos años en diseñar vectores sintéticos no virales que tengan todos los requisitos necesarios para llevar a cabo la transfección génica de forma eficaz y segura. Los polímeros catiónicos son uno de los vectores sintéticos frecuentemente empleados. Sin embargo, los polímeros catiónicos tradicionales tienen desventajas tales como su citotoxicidad y la difícil liberación de los ácidos nucleicos. Es aquí donde se usa la QCD como estrategia para diseñar determinados vectores que respondan a estímulos pudiendo así liberar los ácidos nucleicos una vez llegan al sitio de entrega. Aquí se verán diferentes sistemas poliméricos basados en el uso de enlaces disulfuro e hidrazona propios de la QCD para llevar a cabo la transfección génica.

Palabras clave: Química covalente dinámica, enlaces disulfuro, enlaces hidrazona, polímeros dinámicos covalentes catiónicos, poliplejos, respuesta a estímulos externos, ácidos nucleicos, transfección génica.

Abstract: “Dynamic Covalent Polymers for the Development of Gene Delivery Vectors”.

DCvC emerged because traditional supramolecular chemistry could not access to certain applications where a higher adaptability is required. With DCvC, adaptability can be obtained through reversible covalent bonds, which due to their dynamic character, result into reversible bonds. For gene transfection, the use of vectors is essential. Research efforts have been placed in recent years on designing synthetic non-viral vectors with all the needed requirements to yield gene transfection efficiently and safely. Cationic polymers are frequently used synthetic vectors. However, traditional cationic polymers have some disadvantages such as their cytotoxicity and the difficult release of nucleic acids. In this context, DCvC can be used as a strategy to design stimuli-responsive vectors, thus being able to release nucleic acids once they reach the delivery site. In this Project, we will approach different polymeric systems based on the use of common bonding in DCvC: disulfide and hydrazone, to obtain gene transfection.

Key words: Dynamic Covalent Chemistry, disulfide bond, hydrazone bond, cation dynamic covalent polymers, polyplexes, stimuli-responsive, nucleic acids, gene transfection.

Glosario

PLL: Poli(L-lisina)

PEG: Polietilenglicol

PEI: Polietilenimina

QCD: Química Covalente Dinámica

DTT: Ditionitrosito

mRNA: RNA mensajero

siRNA: RNA pequeño de interferencia

pDNA: Plásmido circular de DNA

PPC: Péptidos penetrantes de células

GSH: Glutathión

GSSG: Disulfuro de glutathión

Zn-DPA: Zinc dipicolilamina

CBA-Bu: N-N'-bis(cistamina)acrilamida-buformina

MPDS: Piridilo metilado catiónico

LMW: Polímeros catiónicos de bajo peso molecular

dsRNA: RNA bicatenario

Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	4
3. Química Covalente Dinámica.....	5
4. Polímeros Covalentes Dinámicos.....	9
4.1 Estructura de los polímeros covalentes dinámicos.....	9
4.2 Polímeros basados en enlaces hidrazona.....	9
4.3 Polímeros basados en enlaces disulfuro.....	15
5. Conclusiones.....	18
6. Referencias.....	20

1. Introducción

Los ácidos nucleicos terapéuticos se están utilizando para regular la expresión génica como tratamiento para enfermedades hereditarias, el uso de vacunas basadas en DNA, terapias antivirales o inmunoterapia contra el cáncer.¹ Para ello es necesario la transfección génica, que consiste en la transferencia de material genético a las células del paciente con el objeto de reemplazar genes supresores de tumores defectuosos, “silenciar” oncogenes sobre-expresados, modular la respuesta inmune antitumoral (inmunoterapia genética) o provocar la apoptosis en células tumorales a partir de genes suicidas. Estos ácidos nucleicos terapéuticos, que no son muy estables, deben liberarse de los sistemas que los transportan en el interior del núcleo o el citoplasma de las células diana.

Los sistemas que transportan estos ácidos nucleicos se denominan vectores, que son claves para la transfección génica, teniendo que superar algunas barreras antes de la entrega para que esta sea efectiva. El portador genético ideal debería ser capaz de entregar diferentes tipos de cargas de ácido nucleico, proteger la carga frente al ataque de nucleasas, tener muy baja o nula toxicidad, evitar la detección inmune, que no haya interacciones con proteínas y células no objetivo, llegar a las células de interés, escapar del endosoma, liberar la carga, que presente una preparación y utilización sencillas¹. También existen métodos físicos para la transfección como electroporación o inyección a alta presión², aunque la mayor parte de estrategias utilizadas es a través de diferentes tipos de vectores.

El uso de vectores víricos para la transferencia de genes comprende la mayoría de la literatura actual sobre este tema ya que tienen altas tasas de transfección. En su ciclo replicativo, los virus hacen uso de mecanismos muy eficientes para internalizar su propio genoma en las células objetivo, que han evolucionado durante millones de años. De forma simplificada, una partícula viral es un objeto de tamaño nanométrico compuesto por un ácido nucleico y algunas proteínas que impiden su degradación en el entorno extracelular y median su internalización en las células objetivo². Un vector viral ideal será aquel que explota las propiedades biológicas (como unirse a la membrana celular, ser internalizados por la célula y poder escapar del endosoma para alcanzar el citosol) de dicha partícula sustituyendo la mayor parte del genoma viral con los ácidos nucleicos terapéuticos de interés. Se han utilizado en más del 70% de los ensayos clínicos de terapia génica con adenovirus, retrovirus, virus vaccinia y herpes simple como los tipos más comúnmente explotados³. De hecho, ya se han aprobado algunos vectores virales modificados para el tratamiento de enfermedades humanas, como Glybera para la deficiencia de lipoproteína lipasa⁴ o Gendicina para el cáncer⁵. Sin embargo, los vectores víricos tienen limitaciones importantes como la poca capacidad de empaquetamiento del DNA, y su inmunogenicidad, que puede anular su actividad, requerir terapia inmunosupresora adicional o incluso reacciones adversas fatales¹. Además, las limitaciones en la producción a gran escala de virus y su potencial para inducir mutagénesis insercional no deseada reducen en gran medida su idoneidad para la terapia génica.

Debido a estas limitaciones de los vectores víricos se están investigando con énfasis estos últimos años otros tipos de vectores sintéticos no virales. Presentan ciertas ventajas respecto a los vectores víricos como que no provocan una reacción inmune, pueden encapsular DNA de gran tamaño, son relativamente fáciles de producir a gran escala y tienen amplia posibilidad de modificaciones para funciones como la detección de células objetivo y escapar del endosoma

entre otras. Algunos vectores no víricos utilizados son lípidos catiónicos (**1** y **2** de la figura 1),⁶ sistemas poliméricos (**3** y **4** figura 1)^{7,8}, nanopartículas inorgánicas⁹ y péptidos⁶.

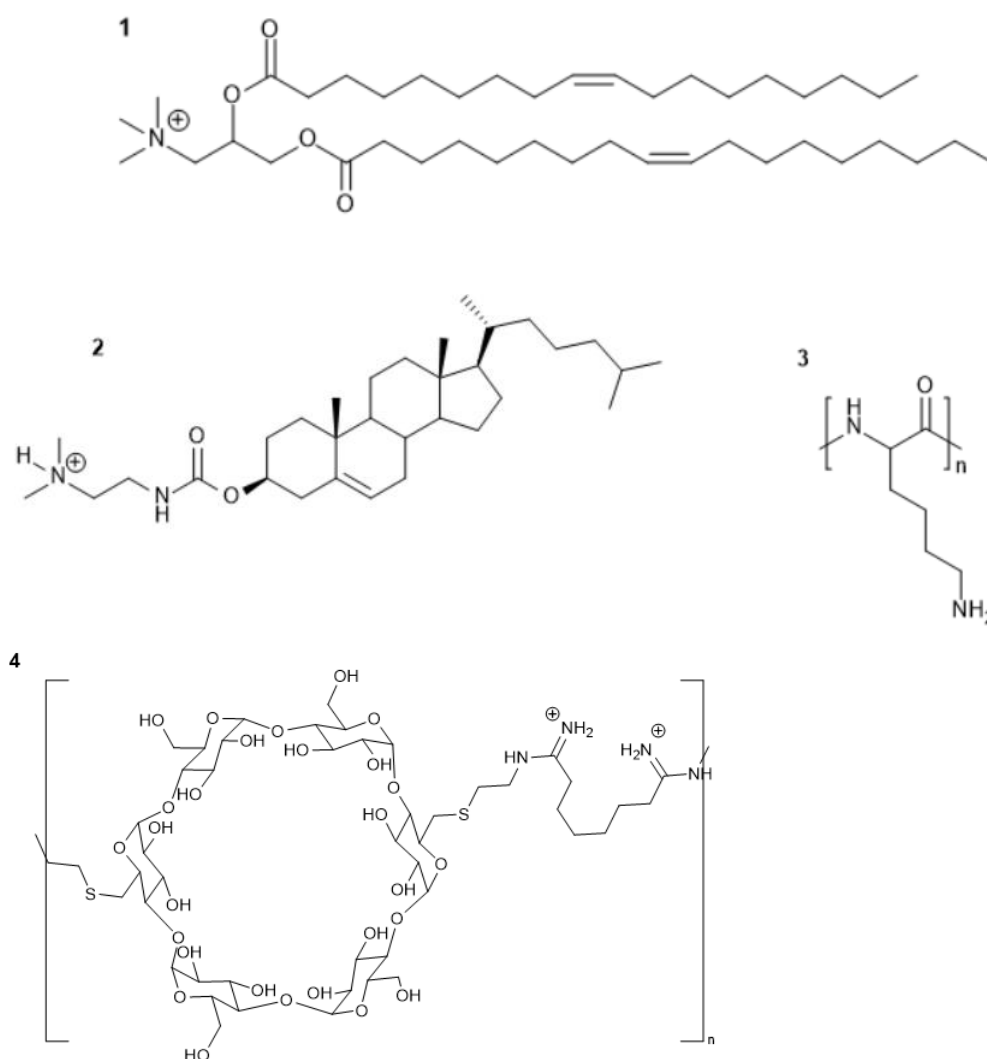


Figura 1. Ejemplos de estructuras químicas empleadas como vectores sintéticos para transfección génica.

De estos distintos tipos de vectores sintéticos el trabajo se centrará en los poliméricos. Los polímeros catiónicos constituyen una alternativa de vectores sintéticos y son atractivos en parte debido a su inmensa diversidad química y su potencial de funcionalización. Las cargas positivas les permiten interactuar con las cargas negativas de grupos fosfato de los ácidos nucleicos mediante interacción electrostática y así formar unos complejos denominados poliplejos que protegen a estos ácidos nucleicos de la degradación de nucleasas y ayudan a su captación celular. El tamaño de estos poliplejos oscila entre 50-150 nm y sus propiedades químicas y físicas facilitan el transporte de ácidos nucleicos terapéuticos para penetrar en la membrana celular, romper el endosoma e ingresar en el núcleo para la expresión del DNA.¹⁰ Además, la carga de ácido nucleico debe liberarse de los vectores para que pueda interactuar con su objetivo o para ser reconocida por los elementos celulares necesarios para silenciar, transcribir o traducir genes. Esta liberación de ácidos nucleicos una vez llegan al objetivo se produce lentamente debido a las fuertes interacciones electrostáticas, disminuyendo drásticamente la eficiencia de

la transfección. Así, estas interacciones electrostáticas son útiles para la formación de estos poliplexos pero no para la liberación de los ácidos nucleicos cuando llegan al objetivo.

Un ejemplo investigado desde la década de 1980 por su potencial como vector de este tipo es la poli(L-lisina) (PLL) (3 figura 1).¹¹ Se trata de un polipéptido compuesto por unidades repetitivas del aminoácido lisina, donde su grupo amino está cargado positivamente en medios biológicos. Su grupo funcional amida es parcialmente biodegradable lo que podría ayudar a liberar la carga de los ácidos nucleicos. Sin embargo, la PLL por si sola tiene inconvenientes como vector sintético tales como que la lenta liberación de la carga (a pesar de la biodegradabilidad del enlace amida), la inestabilidad extracelular coloidal, la insuficiente captación celular por endocitosis y la pobre liberación del endosoma. Además, el PLL de alto peso molecular presenta alta citotoxicidad. Por ello, se han estudiado distintos tipos de vectores de PLL modificados para mejorar la transfección.¹² Un ejemplo son los polímeros de PLL con cadenas hidrofílicas de polietilenglicol (PEG) diseñadas para minimizar las interacciones no específicas y aumentar el tiempo en la circulación. También se han diseñado copolímeros a partir de aminoácidos de histidina y lisina (figura 2) capaces de condensar el DNA y alterar membranas endosómicas celulares (esta ruptura del endosoma se atribuye al grupo imidazol de la histidina) junto con la liberación de DNA cuando se produce la ruptura del enlace disulfuro. Este tipo de sistema ha sido investigado por el grupo del Prof. Cameron Alexander.

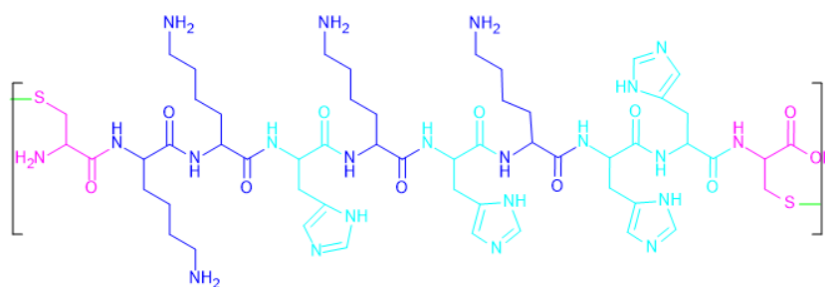


Figura 2. Ejemplo de copolímero a base de histidina y lisina usado por Soliman y colaboradores¹³.

Otro ejemplo muy representativo es la polietilenimina (PEI), que puede estar en forma lineal o ramificada. El polímero PEI y sus derivados son probablemente los sistemas más estudiados en transfección génica. Su buena eficiencia en transfección se debe en gran medida a su capacidad amortiguadora del pH. Se ha demostrado que la eficiencia de transfección y la citotoxicidad de PEI dependen en gran medida de sus propiedades estructurales, respecto al peso molecular¹³ y que sean lineales o ramificadas¹⁴. Las modificaciones respecto a polímeros basados en PEI son muy amplias, una de ellas ha sido introducir ácido hialurónico, un polisacárido natural con muy buenas propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, usado como corona hidrófila de poliplexos para proteger la carga positiva, reducir la toxicidad y prevenir la agregación de sal y albúmina¹⁰.

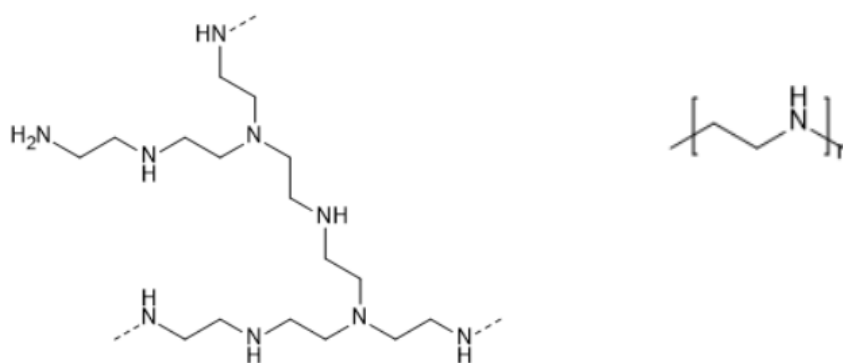


Figura 3. PEI ramificada y PEI lineal, respectivamente.

El rápido desarrollo de la química de polímeros supramoleculares y la química dinámica constitucional ha tenido un gran impacto en la aparición de polímeros covalentes dinámicos¹⁵. Estos polímeros tienen enlaces covalentes reversibles que les otorgan propiedades únicas, donde se han encontrado utilidad en diversas áreas siendo una de ellas la transfección génica. En esta memoria se discutirán varios polímeros de este tipo y las ventajas que aportan cada uno de ellos en este campo.

2. Objetivos

Las reacciones reversibles han sido muchas veces indeseadas en la química orgánica debido a que ocurrían con rendimientos de reacción bajos. Esta visión ha cambiado en las últimas décadas debido a la aparición de química covalente dinámica (QCD) la cuál otorga unas propiedades únicas a los sistemas químicos en los que se aplica, como formarse, adaptarse, romperse y responder a parámetros físicos o a diferentes condiciones en el medio¹⁶. Estas características son una ventaja y han sido utilizadas por diversas áreas como Catálisis, Ciencia de Materiales, y Biomedicina.

Este trabajo se centrará en sistemas poliméricos usando la QCD para llevar a cabo la transfección génica de ácidos nucleicos terapéuticos. El reconocimiento de estos ácidos nucleicos por vectores sintéticos requiere interacciones electrostáticas formando poliplejos para lograr una interacción estable en medios biológicos y poder así penetrar en las células por endocitosis. Esta unión se puede lograr usando macromoléculas como polímeros dinámicos covalentes catiónicos. Estos polímeros podrían ser considerados como polímeros terapéuticos inteligentes.¹⁷

Sin embargo, los polímeros catiónicos convencionales que no están basados en QCD usados para transfección liberan los ácidos nucleicos muy lentamente, no se degradan y se acumulan en las células, lo que genera efectos tóxicos no deseados. Es aquí donde usando la QCD, con enlaces robustos reversibles compatibles con medios acuosos en condiciones de reacción suaves, se permite el acceso a vectores artificiales auto ensamblados que pueden adaptarse y responder a los cambios en el medio. Esto se debe a que los microambientes biológicos relacionados con la entrega de genes son significativamente diferentes dependiendo de cada etapa de entrega. El pH en el torrente sanguíneo es aproximadamente 7,4, en los endosomas tempranos es 6,5, en los endosomas tardíos es 5,5 y 7,2 en el citoplasma¹⁸. Además, el pH en el entorno tumoral es

ligeramente ácido¹⁸. Los potenciales redox también difieren entre el exterior e interior celular, siendo los medios intracelulares mucho más reductores debido a las concentraciones considerablemente más altas de glutatión, un tripéptido que contiene un residuo de cisteína. Teniendo en cuenta los anteriores factores, se pueden utilizar determinados sistemas con enlaces covalentes reversibles robustos que sean sensibles al pH y/o a medios reductores como polímeros basados en enlaces disulfuro e hidrazona entre otros.

El **objetivo** de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica de polímeros como vectores sintéticos basados en enlaces disulfuro e hidrazona, que son propios de la QCD usados hasta el momento para transfección génica, así como dar una visión general de los avances hasta el momento en este campo y de las diferentes estrategias desarrolladas.

3. Química Covalente Dinámica

Una característica clave de la química supramolecular es su naturaleza dinámica. Las interacciones no covalentes utilizadas son lábiles y reversibles, y los sistemas supramoleculares se organizan para generar espontáneamente el sistema termodinámicamente más favorecido. Sin embargo, la misma inestabilidad inherente de los conjuntos supramoleculares impide su uso en muchas aplicaciones donde se requiere un mayor grado de robustez. Así, se ha identificado un conjunto de reacciones que combinaran las propiedades dinámicas de la química supramolecular con la estabilidad y la robustez de los enlaces covalentes.¹⁹ Dando lugar a lo que se conoce como Química Covalente Dinámica (QCD).

Ciertos rasgos característicos de la QCD, de los cuales alguno ya se ha mencionado anteriormente en este trabajo, son que es un proceso dinámico y permite el intercambio de componentes moleculares en el equilibrio para alcanzar los mínimos energéticos del sistema termodinámico, es decir, los más estables. La QCD se basa en la formación de enlaces reversibles covalentes fuertes, que pueden formarse y romperse de manera dinámica en función de las condiciones de reacción (o condiciones ambientales), como el medio de la reacción (disolvente y concentración de los reactivos de partida) o factores físicos (temperatura, luz, electricidad, estrés mecánico), haciendo que sea una química adaptable.

Se podría pensar que todos los enlaces reversibles podrían ser utilizados en este tipo de química, pero para que una reacción covalente reversible sea aceptable para la QCD hay que tener en cuenta varios factores, uno de ellos es el tiempo de vida (τ) de los enlaces covalentes, que debería estar en un rango de $1\text{ ms} < \tau < 1\text{ min}$ para garantizar que sean estables pero conserven un comportamiento dinámico. El tiempo de vida determina las propiedades del sistema dinámico. Así, en algunos sistemas poliméricos las propiedades mecánicas pueden variar desde fluidos viscosos hasta fuertes sólidos elásticos. Otro factor a tener en cuenta son las condiciones de reacción. Estas deben ser relativamente suaves para que sean compatibles con los grupos funcionales empleados e idealmente compatibles con medios acuosos para determinadas aplicaciones, como por ejemplo la transfección génica que se lleva a cabo en medios biológicos. También es importante el proceso de intercambio para desplazar el equilibrio hacia el lado de los productos o de los reactivos, que se pueda realizar fácilmente mediante el control del cambio de pH, temperatura, luz, eliminación de catalizador en caso de utilizarse o mediante el potencial eléctrico.

De tal manera que la QCD es el nexo entre la Química Supramolecular que trabaja con enlaces dinámicos de carácter no covalente y la Química Molecular donde se forman enlaces covalentes y robustos. En la Tabla 1 se muestran algunas de las reacciones reversibles más relevantes aplicadas a la QCD.

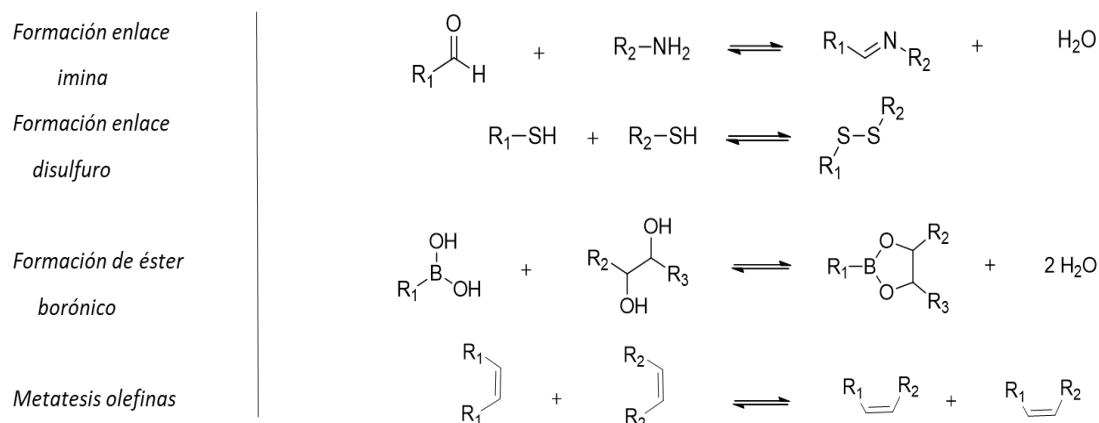


Tabla 1. Reacciones reversibles representativas usadas en la QCD.

Un tipo de reacción en QCD es la de metátesis, posible con sulfuros, iminas y con alquenos como se ha expuesto en la tabla 1. La metátesis de olefinas es importante para formar enlaces dinámicos reversibles formando nuevos enlaces carbono-carbono. Por ejemplo, se ha utilizado con mucho éxito para sintetizar compuestos macrocíclicos bioactivos²⁰ y polímeros orgánicos²¹.

Las reacciones de formación de esteres borónicos, especialmente entre ácidos borónicos y cis 1,2-dioles o 1,3-dioles (tabla 1) es muy usada en la QCD. Esta reacción es compatible con condiciones acuosas y la reversibilidad está controlada por el pH, donde los parámetros termodinámicos que favorecen la formación del éster borónico pueden optimizarse mediante el efecto de los sustituyentes. Teniendo en cuenta que estos grupos cis 1,2-diol o 1,3-diol están presentes en carbohidratos, esta reacción se ha aplicado para desarrollar por ejemplo sensores de monosacáridos o disacáridos con importancia biológica. También se han desarrollado sistemas con estos ácidos borónicos en las cadenas laterales de determinados polímeros que pueden emplearse para el diagnóstico basado en células o administración de fármacos donde son sensibles a dos estímulos, la concentración de glucosa y el pH del medio²².

La condensación reversible entre aminas primarias y aldehídos (tabla 1) para dar lugar a iminas es otra de las reacciones de la QCD. La formación del enlace imina es una reacción muy eficiente donde tiene lugar la pérdida de una molécula de agua cuando el grupo amino y el carbonilo reaccionan para formar el enlace $C=N$ intra- o intermolecular. Generalmente, la reacción se lleva a cabo a reflujo bajo condiciones azeotrópicas o con tamices moleculares, y a menudo con una pequeña cantidad de ácido como catalizador. Añadiendo agua a la imina se desplaza el equilibrio en el sentido de la hidrólisis recuperando las condiciones iniciales. Este equilibrio entre la imina y sus precursores también puede verse afectado por el disolvente, la temperatura, la concentración y el pH. Además, los factores estéricos y electrónicos también deben tenerse en cuenta ya que pueden influir en el equilibrio. Esta reacción reversible hace que la QCD sea una estrategia especialmente atractiva, ya que, con el tiempo suficiente, da como resultado la formación del producto o productos más estable/s termodinámicamente.

Otra reacción de especial interés es la formación de hidrazonas y acil hidrazonas, que permiten obtener una serie de compuestos similares estructuralmente a iminas pero más estables que estas, incluso en presencia de agua. Esto se debe al par de electrones desapareados del átomo de nitrógeno adyacente que disminuye la electrofilia del enlace $C=N$ (efecto alfa). Consecuentemente, las hidrazonas son cinéticamente inertes en condiciones neutras, pero pueden sufrir las reacciones de hidrólisis, intercambio (introduciendo otra acil hidrazona) y metátesis (figura 4) en presencia de un ácido como catalizador.

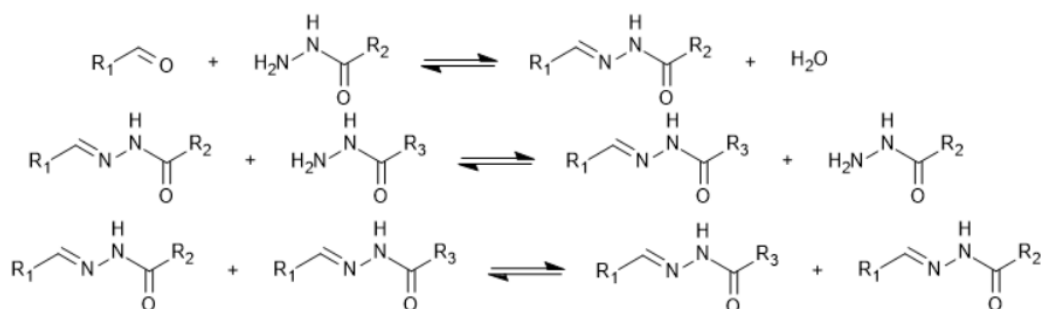


Figura 4. Tres tipos de reacciones de acil hidrazona: condensación, intercambio y metátesis (de arriba abajo).

Tanto el enlace imina como el enlace hidrazona son sensibles al pH. Hay algunas diferencias entre ellos, como el pKa. El pKa de las aminas es superior al pKa del grupo "pseudoamino" de las hidrazinas o acil hidrazinas, debido a que en estas ocurre el fenómeno ya comentado conocido como efecto alfa. A pesar de que las hidrazonas son más propensas para utilizarse en medios biológicos, también hay algunos ejemplos donde se han usado iminas.

El mecanismo de intercambio de enlaces disulfuro implica principalmente tres pasos.²³ Primero se produce la desprotonación del grupo tiol formando un anión tiolato, seguido de un ataque nucleófilo del tiolato a un átomo de azufre del grupo disulfuro, rompiéndose este y formándose otro enlace disulfuro nuevo. Por último, se produce la protonación del anión tiolato generado (figura 5).

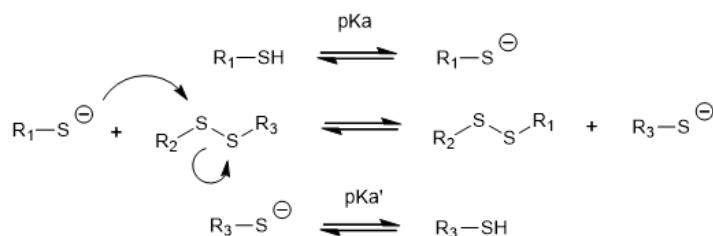


Figura 5. Mecanismo intercambio disulfuro.

Al generarse un anión tiolato la reacción es sensible al pH, donde unas condiciones levemente básicas favorecen la reacción de intercambio. La reacción se produce no solo mediante la formación de cantidades catalíticas de un tiolato, sino también mediante una mezcla de tioles por oxidación (por ejemplo, con oxígeno) en presencia de una base. Otra forma es a partir de una mezcla de disulfuros en presencia de un agente reductor, por ejemplo, el ditioneitol (DTT).

El enlace disulfuro tiene una función importante en procesos biológicos como el plegamiento, estructura y reactividad de proteínas o el control sobre el estado redox de las células²⁴. Estos polímeros con grupos disulfuro se han desarrollado por ejemplo para dirigirse a grupos cisteína en sistemas biológicos, que lleva a su degradación y liberación de especies “encapsuladas”.

4. Polímeros covalentes dinámicos

4.1 Estructuras de los polímeros covalente dinámicos

Además del tipo de enlace reversible empleado se debe tener en cuenta la estructura del polímero. Al igual que con los polímeros tradicionales, las partes covalentes dinámicas se pueden construir a través de diferentes disposiciones de estas conexiones, lo que lleva a varios tipos de arquitecturas de polímeros. Hay dos enfoques para insertar estos enlaces reversibles en las estructuras poliméricas, en la cadena principal o en la cadena lateral (figura 6).

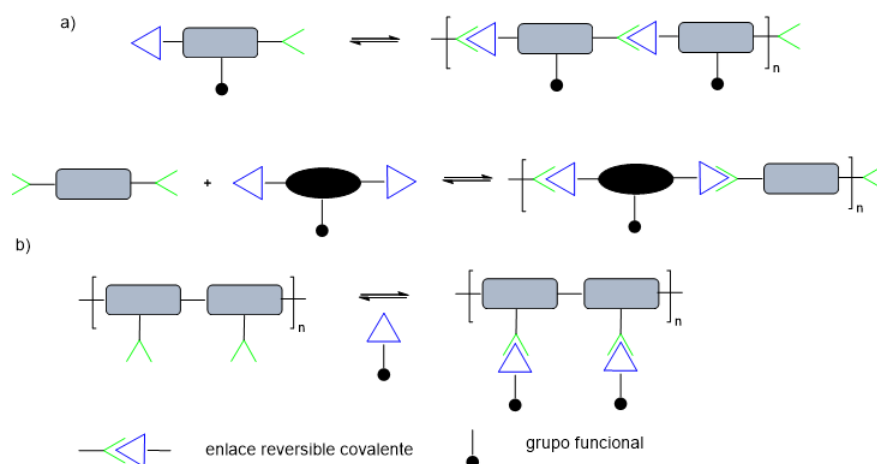


Figura 6. Distintos tipos de estructuras poliméricas con enlaces dinámicos: (a) lineal y (b) conexiones en la cadena lateral.

4.2 Polímeros basados en enlaces hidrazona

En comparación con otros tipos de materiales, los materiales basados en polímeros ofrecen varias ventajas, como su baja densidad, procesabilidad y la amplia gama de bloques de construcción de monómeros. La entrega de fármacos mediante estos sistemas poliméricos sensibles a estímulos es un tipo de sistema de administración de fármacos de liberación controlada que regula el perfil de liberación de fármacos según la necesidad fisiológica. Se pueden clasificar como sistemas controlados de forma externa o de forma interna. En los sistemas controlados de forma externa se utilizan estímulos como ultrasonidos, campos magnéticos o eléctricos para la entrega de fármacos. Mientras que, en los sistemas controlados internamente o autorregulados, que son los que interesan en este trabajo, no se requiere ningún estímulo externo para la liberación del fármaco. Estos sistemas controlan la velocidad de liberación del fármaco mediante un mecanismo que se produce dentro del cuerpo para regular los cambios en la estructura de los polímeros²⁵. Un ejemplo de sistemas regulados internamente es a través de cambios en el pH. Como se ha comentado a lo largo del trabajo, existen gradientes de pH ya sea en condiciones normales (endosomas) como en situaciones anómalas (células tumorales) que tienen valores de pH inferiores a los de la sangre o el citoplasma de las células. Para sintetizar este tipo de sistemas sensibles al pH que liberan moléculas en condiciones ligeramente ácidas y son accesibles fisiológicamente, es esencial tener varios enlaces disponibles que puedan utilizarse con una variedad de grupos funcionales.

Se han preparado varios vectores de suministro de fármacos a partir de diferentes funcionalidades químicas que responden al pH²⁶ de los cuáles, este trabajo se centrará en

describir aquellos que contienen los enlaces hidrazona, concretamente en la entrega de ácidos nucleicos terapéuticos. Esto se debe a terapias génicas como por ejemplo la técnica CRISPR-Cas9²⁷ o la que emplea RNA pequeño de interferencia, denominado siRNA^{28,29}. El siRNA son moléculas de doble hebra RNA de 20-21 nucleótidos complementarias, que suprimen la expresión de los genes diana mediante el corte del RNA mensajero (mRNA) complementario en dos mitades. Las dos mitades del mRNA son posteriormente degradadas por la maquinaria celular, lo que conlleva la supresión de la expresión del gen.

Primero se muestran varios casos de polihidrazonas de cadena lateral llevadas a cabo por Montenegro y colaboradores. En el primer ejemplo se produce la entrega de siRNA donde los polímeros tienen un gran potencial. Se buscan nuevos vectores que no tengan los problemas derivados de los vectores virales (respuesta inmune) y superen problemas como la degradación de siRNA debida a nucleasas, también se busca que su síntesis sea sencilla. En este contexto, estos autores sintetizan poli(acriloilhidracina) (P1), que funcionalizan con aldehídos en condiciones acuosas y sin ningún paso de purificación, dando lugar a polímeros anfifílicos para el transporte de siRNA. Debido a la facilidad de la síntesis y que no hay etapas de purificación, es posible optimizar este polímero o sintetizar otros derivados como vectores más eficientes de estructura similar en menor tiempo. Tras sintetizar esta poli(acriloilhidracina), los autores utilizan la técnica de post-polimerización³⁰ basada generalmente en reacciones con alta eficiencia.

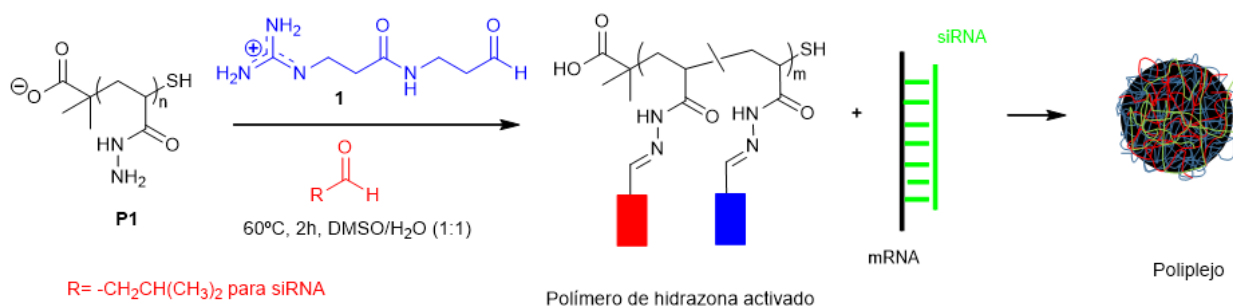


Figura 6. Representación esquemática de formación de poliplejos utilizada por Montenegro y colaboradores a través de la reacción entre polímeros con n acil hidracinas y el aldehído catiónico con el grupo guanidinio (azul) y aldehídos hidrofóbicos (rojo) para formar poli hidrazonas anfifílicas que se pueden combinar con siRNA³¹.

El polímero sintetizado (P1) es parcialmente soluble en agua, donde el aldehído catiónico (1) elegido tenía un grupo guanidinio. Por un lado, al tener un pKa próximo al pH fisiológico, este grupo se encuentra protonado y presenta, por tanto, carga positiva. Por otro lado, este grupo tiene potencial para formar puentes de hidrogeno con grupos fosfato de las membranas celulares aumentando así su afinidad con estas. Respecto al otro aldehído hidrofóbico utilizado (necesario para atravesar membranas lipídicas), se hicieron estudios con varios eligiendo el más adecuado que resultó ser isovaleraldehído. Una vez elegidos los dos aldehídos fue necesario optimizar la proporción de los mismos, ya que influye en la carga y en el tamaño de los poliplejos, siendo adecuado que tengan tamaños en torno a 100 nm y presenten un potencial ζ no muy elevado para evitar interacciones indeseadas. Se observó que al aumentar la proporción en aldehído hidrofóbico, aumentaba el tamaño y el carácter catiónico. Otro aspecto interesante fue que los resultados de viabilidad celular y transfección génica se relacionaban proporcionalmente con la fracción óptima de aldehído hidrofóbico para la formación de los poliplejos. Donde la fracción molar óptima se estimó en 0,15 para el aldehído hidrofóbico y 0,85

para el aldehído catiónico. Este polímero tuvo mejores resultados en transfección que el mejor reactivo comercial.

Siguiendo esta línea de investigación Montenegro y colaboradores utilizaron P1 (Figura 7) teniendo en cuenta que la entrega intracelular mediante vectores sintéticos no virales depende en gran parte del tamaño de la carga transportada. Así, para la entrega de plásmidos circulares largos de DNA (pDNA) se postuló adecuado modificar ciertos aspectos del vector ya que el número de nucleótidos de estos plásmidos de DNA respecto al siRNA es mucho mayor. Se sintetizaron tres poli(acrililhidracinas) con GP diferentes utilizando el mismo aldehído catiónico que el utilizado para la entrega de siRNA, y se probó con distintos aldehídos hidrofóbos donde se seleccionó un aldehído de cadena larga (oleico insaturado) mostrado en la figura 7. Las fracciones molares de cada uno de los aldehídos fueron muy similares a las empleadas con siRNA. Se observó que P1 con el mismo grado de polimerización (GP) que fue empleado para la entrega de siRNA (donde dio resultados de transfección muy buenos) mostró poca eficiencia de transfección para pDNA. Así, se decidió estudiar los poliplejos y se observó que con ese GP no era capaz de complejar el plásmido. Con los otros dos grados de polimerización empleados se observaron poliplejos de tamaños y potencial ζ adecuados con tasas de transfección altas pero ligeramente menores que el mejor reactivo comercial, si bien mostraron mejor viabilidad celular.

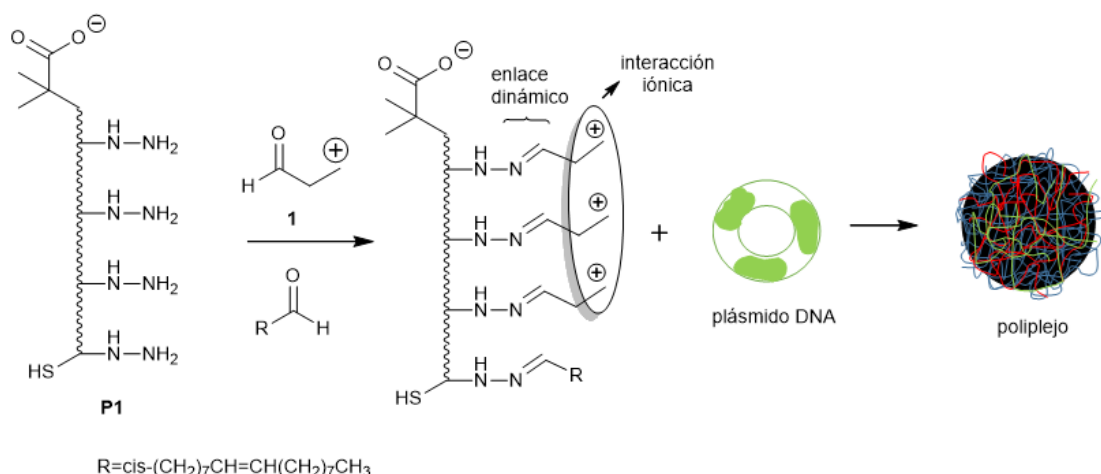


Figura 7. Representación de forma esquemática del polímero P1, el aldehído catiónico de guanidinio (1) y el nuevo aldehído oleico utilizado para la interacción con plásmidos de DNA llevada a cabo por Montenegro y colaboradores³². Donde se destaca la interacción multivalente mediante interacciones iónicas y el enlace dinámico.

Por lo tanto demostraron la importancia en el GP del polímero utilizado para la formación del complejo y la entrega de ácidos nucleicos con distintas longitudes, que se pudo realizar gracias a la fácil y versátil metodología empleada para la obtención de este tipo de polímeros anfífilos en condiciones fisiológicas compatibles³². También se realizaron estudios de posibles mecanismos de transfección utilizando inhibidores endocíticos, que sugieren que a pesar de que la macropinocitosis podría ser la principal vía de entrada de los poliplejos, también podría haber otros mecanismos endocíticos que se realizaran a la vez.

Hasta el momento se ha comentado dos casos en los que se produce la entrega de dos distintos tipos de ácidos nucleicos, el siRNA y los plásmidos de DNA. El mRNA es otro tipo de ácido nucleico que tiene gran potencial para tratar enfermedades³³, puesto que tiene ventajas frente a la entrega de DNA como que no tiene que atravesar la membrana nuclear para la entrega y no conlleva el riesgo de que se integre en el genoma asociado con la mutagénesis insercional del

DNA^{34,35}. Por otra parte, el mRNA difiere del siRNA en que se introduce material genético para expresar proteínas terapéuticas o esenciales.

Montenegro y colaboradores siguieron su metodología para buscar un vector derivado de (polihidrazona capaz de acomplejar) mRNA,³⁶ algo que todavía no había sido descrito con éxito en ningún artículo. En concreto, utilizaron una poli(acrililhidracina) (**P**) de alto peso molecular funcionalizada con el aldehído catiónico (**1**) y con varios aldehídos hidrofóbicos. A diferencia de los anteriores casos, en este experimento se observó que con una mayor fracción molar en el aldehído hidrofóbico se obtenía mayor tasa de transfección. De este modo se consiguió un vector no viral de polihidrazona anfifílico para la entrega de mRNA con baja toxicidad.

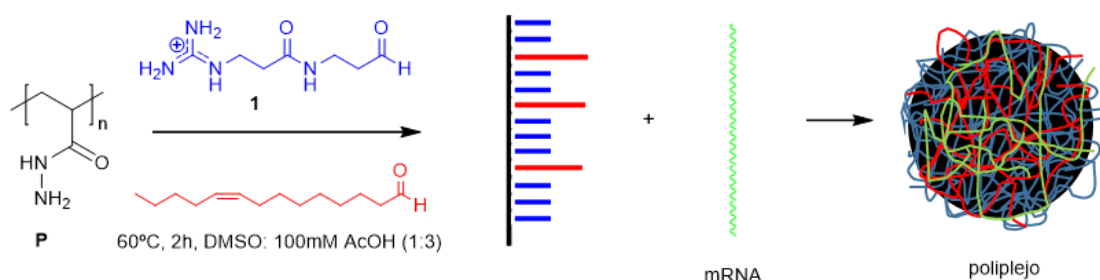


Figura 8. Esquema de la formación de una polihidrazona a partir de **P** con dos tipos del aldehído formando una polihidrazona donde se destaca en el esquema su estructura tipo "peine", mostrando también la posterior complejación con mRNA formando poliplejos.

Entre las muchas herramientas propuestas para la entrega, los péptidos penetrantes de células (PPC) han aparecido como una estrategia fácil de implementar. Estos oligómeros catiónicos han demostrado un gran potencial para la entrega de diferentes tipos de material genético en células y tejidos^{37,38}. Si el péptido (**A** figura 9) se une de forma no covalente al ácido nucleico se formarán poliplejos estables debido a la interacción entre la carga positiva del péptido y la carga negativa pero también se requiere una parte hidrofoba para poder atravesar la membrana lipídica. Es aquí donde Montenegro y colaboradores utilizan la QCD mediante la funcionalización a través del enlace hidrazona, para obtener una variedad amplia de vectores distintos gracias a la disponibilidad de un buen número de aldehídos hidrofobos, que se pueden combinar con estos oligómeros. En este estudio, se demostró que los aldehídos alifáticos de cadena corta y los aldehídos aromáticos no son buenos activantes de estos vectores para plásmidos de DNA y que los mejores son aldehídos saturados de cadena larga donde se obtienen altas tasas de transfección. Mediante esta simple síntesis, que se realizó en medios fisiológicamente compatibles, se logró identificar tres vectores peptídicos óptimos para la transfección de plásmidos con baja toxicidad. Además, se sugirió que la flexibilidad de las colas hidrofóbicas puede desempeñar un papel importante en el proceso de anclaje del péptido a la membrana lipídica.

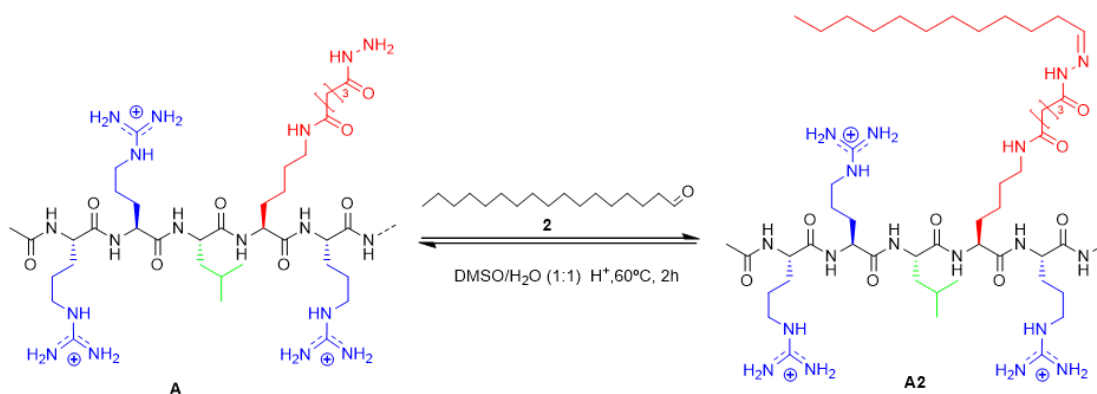


Figura 9. Parte del péptido sintetizado por Montenegro y colaboradores donde aparecen las distintas partes que se repiten a lo largo de la estructura. La reacción consiste en la formación del enlace hidrazona mediante una acil hidracina en la cadena lateral del péptido (**A**) y un aldehído (uno de los usados es a modo de ejemplo el dodecanal mostrado (**2**)). Se forma así el péptido anfifílico **A2** capaz de formar poliplejos mediante la interacción con plásmidos de DNA³⁹.

En los distintos casos expuestos hasta ahora, el enlace dinámico se encontraba en la cadena lateral. A continuación, se van a describir varios ejemplos donde el enlace dinámico se encuentra en la cadena principal.

Bouillon y colaboradores sintetizaron dos sistemas auto-ensamblados lineales de poliacilhidrazonas.⁴⁰ En uno de ellos combinaban residuos catiónicos del mismo tipo que los anteriores ejemplos (derivados de guanidinio) junto con poli (óxido de etileno)(PEG), el cuál es neutro. A esto se le denomina "pegilación" y su finalidad es aumentar la estabilidad, biodisponibilidad y el tiempo de circulación en la sangre del sistema polimérico. En el otro polímero se utilizó como carga catiónica una poliimina. El objetivo era que se pudieran formar complejos eficazmente con plásmidos de DNA, a través de sistemas sensibles al pH. Se introdujeron residuos diamina para favorecer así el escape del endosoma basándose en estudios de polímeros como PEI⁴¹. Se sintetizaron dos polímeros híbridos (figura 10), demostrando su sensibilidad al pH, y que a pH 5 la hidrólisis era mucho más rápida que a pH 7. También demostraron la fuerte complejación con pDNA compatible en medio biológico debido a interacciones multivalentes.

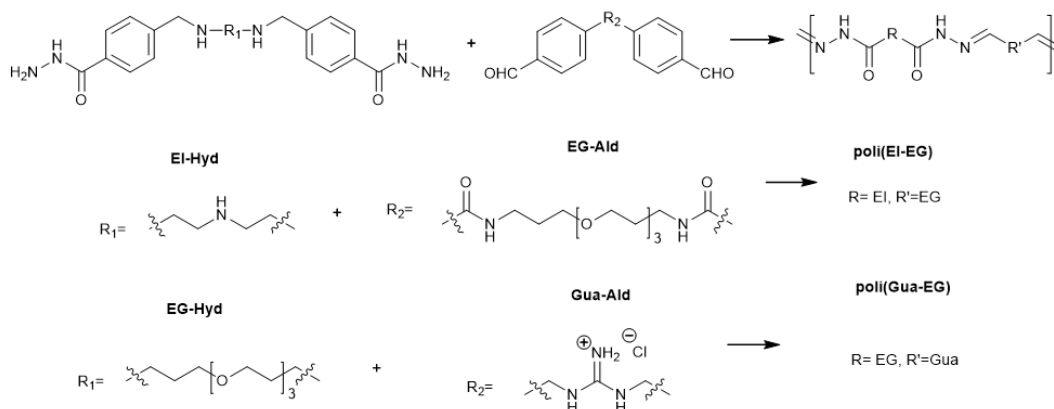


Figura 10. Formación de los dos tipos de polímeros híbridos poli(EI-EG) y poli(Gua-EG) desarrollados por Bouillon y colaboradores⁴⁰. Que se basan en polímeros lineales sintetizados mediante enlaces hidrazona que responden al pH. Tienen distinto tipo de carga positiva, siendo más efectivo para complejar pDNA poli(Gua-EG) que poli(EI-EG).

En otro ejemplo, Bouillon y colaboradores ampliaron estos polímeros utilizando aminoácidos modificados junto con aldehídos bifuncionales para obtener polímeros covalentes dinámicos biomoleculares.⁴² Estos aminoácidos modificados presentan grupos hidrazida y aminooxi (figura 11) en los extremos, que reaccionan con dos tipos de aldehídos (EG-Ald y S2-Ald figura 11). S2-Ald es un tipo de aldehído con enlaces disulfuro en la cadena (de los que se hablará en detalle más adelante). Estos enlaces son dinámicos otorgando así ciertas ventajas que el grupo de Bouillon quería combinar con los enlaces hidrazona, teniendo sistemas que fueran sensibles al pH (debido al enlace hidrazona) y a entornos reductores (debido al enlace disulfuro). Los aminoácidos modificados empleados fueron derivados de arginina, histidina y glicina. La formación de complejos con el pDNA fue demostrada para los polímeros catiónicos (derivados de histidina y arginina) siendo más efectiva para el de arginina. Estos polímeros catiónicos fueron capaces de formar complejos exitosamente con siRNA y su entrega en células también se demostró con poli (EG-Arg). Con los polímeros sintetizados con enlaces disulfuro no se logró formar poliplejos adecuados para siRNA. Estos resultados abren nuevas rutas para combinar biomoléculas y polímeros sintéticos para la encapsulación y entrega de siRNA.

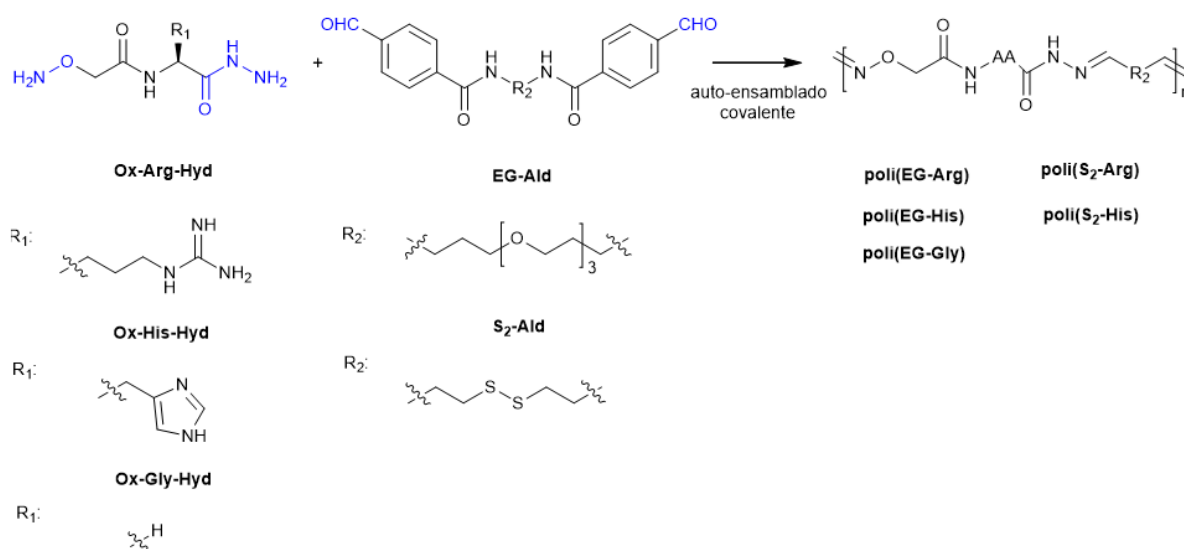


Figura 11. Auto ensamblaje covalente formando varios polímeros covalentes dinámicos (PCD) que contienen en una parte de su estructura aminoácidos modificados y en la otra parte derivados de PEG o derivados de disulfuro. Bouillon y colaboradores sintetizaron los polímeros que se nombran en la parte derecha de la figura. Donde solo los polímeros formados derivados de los aminoácidos histidina y arginina contienen grupos catiónicos capaces de interaccionar con los ácidos nucleicos. En la obtención de estos PCD se produce una policondensación formando enlaces hidrazonas y oximas.

4.3 Polímeros basados en enlaces disulfuro

De los posibles materiales que responden a estímulos, los que tienen respuesta redox son importantes para aplicaciones biológicas debido a que en el entorno celular el glutatión (GSH) puede actuar como un agente reductor. GSH se sintetiza en el citoplasma y desde allí se transporta a los diversos compartimentos de la célula. El potencial de reducción dependerá de la relación GSH y disulfuro de glutatión (GSSG) junto con la concentración de GSH. La concentración intracelular de glutatión (GSH) es mucho más alta (2-10 mM) en comparación con la concentración extracelular (2-20 μ M). En células tumorales, la concentración de GSH en el citoplasma es sustancialmente más elevada que en células normales. Aprovechando estas situaciones se han empleado sistemas poliméricos basados en enlaces disulfuro para diferentes aplicaciones biomédicas⁴³, entre ellas la transfección génica. Los enlaces disulfuro se encuentran comúnmente en los sistemas naturales y son conocidos por su reversibilidad y comportamiento de intercambio, por ejemplo, la queratina que es una proteína que se encuentra en el pelo con alto contenido en disulfuro y dependiendo del porcentaje de estos disulfuros en el pelo puede ser áspero o suave⁴⁴. En este apartado se comentarán diferentes estrategias llevadas a cabo en sistemas poliméricos basados en estos enlaces disulfuro llevados a cabo recientemente para transfección génica.

Hashim y colaboradores, buscaron vectores que tuvieran tamaños muy pequeños del orden de 10 nm o menos, lo que resulta bastante difícil con las características (carga, tamaño y degradabilidad) adecuadas. Estos autores demostraron la síntesis con éxito de nano cápsulas de disulfuro⁴⁵ con un tamaño uniforme de 7 ± 2 nm mediante polimerización oxidativa de un monómero de ditiol soluble en agua funcionalizado con múltiples iones de guanidinio (Figura 12). Los iones guanidinio interaccionaron con la carga negativa de siRNA formando puentes salinos, donde estos monómeros actúan como adhesivos con el siRNA. Estas nano cápsulas se despolimerizan en el entorno citosólico reductor gracias a los enlaces disulfuro que se habían formado previamente liberando siRNA.

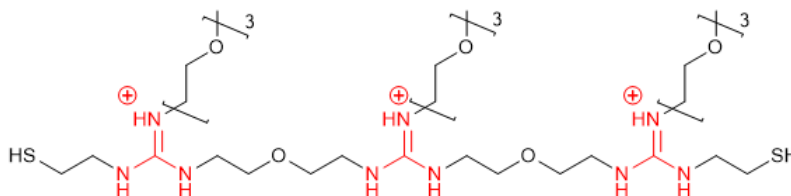


Figura 12. Monómero empleado por Hashim y colaboradores, donde se destaca en color rojo los iones guanidinio.

Otra estrategia llevada a cabo por Liu y colaboradores, es el uso de polímeros catiónicos de bajo peso molecular (LMW) que son tolerados relativamente bien pero su eficacia es muy inferior en comparación con sus análogos de alto peso molecular (HMW). Esto puede deberse a que no son capaces de empaquetar eficientemente el DNA. Por lo tanto, si se consigue mejorar este aspecto, la eficiencia de transfección para polímeros catiónicos de bajo peso molecular podría aumentar. Para esto Liu y colaboradores utilizaron la coordinación de metales, particularmente la de los análogos de zinc dipicolilamina (Zn-DPA) que podrían ser una opción eficaz para aumentar la unión con el pDNA debido a su alta afinidad por los grupos fosfato. Además, al existir grupos que tienen fosfato en las membranas celulares, la introducción del ión Zn(II) podría aumentar la absorción celular. Sin embargo, como se ha comentado a lo largo de este trabajo, una interacción muy fuerte entre el polímero y el DNA, implica que luego sean difíciles de

separar, algo que es esencial que ocurra para la transfección. Con el objetivo de facilitar dicha separación, estos autores introdujeron la QCD mediante enlaces disulfuro.

Teniendo en cuenta estos factores sintetizaron el polímero Zn-PD (figura 13), donde una parte de este polímero estaba compuesta por PEI de bajo peso molecular ramificado. Se investigó la formación de poliplejos de tamaño adecuado, con muy baja carga superficial positiva, obteniéndose buenos valores de transfección y exhibiendo alta eficiencia para dosis de DNA menores que las habituales para transfección.

Se consiguió por lo tanto PEI de bajo peso molecular como vector sintético mediante su funcionalización (con distintos reactivos) introduciendo así enlaces disulfuro en la cadena principal y el ion Zn(II) en un extremo de la cadena, con baja citotoxicidad. Demostraron que la presencia de Zn aumentaba la afinidad por el pDNA. Mediante la introducción de enlaces disulfuro se consiguió una liberación controlada de la carga y reducir así la citotoxicidad. Todas estas características hacen que el polímero Zn-PD sea un excelente vector, para lograr una transfección genética robusta incluso para células donde es difícil llevar a cabo la transfección como las células primarias y las células madre.

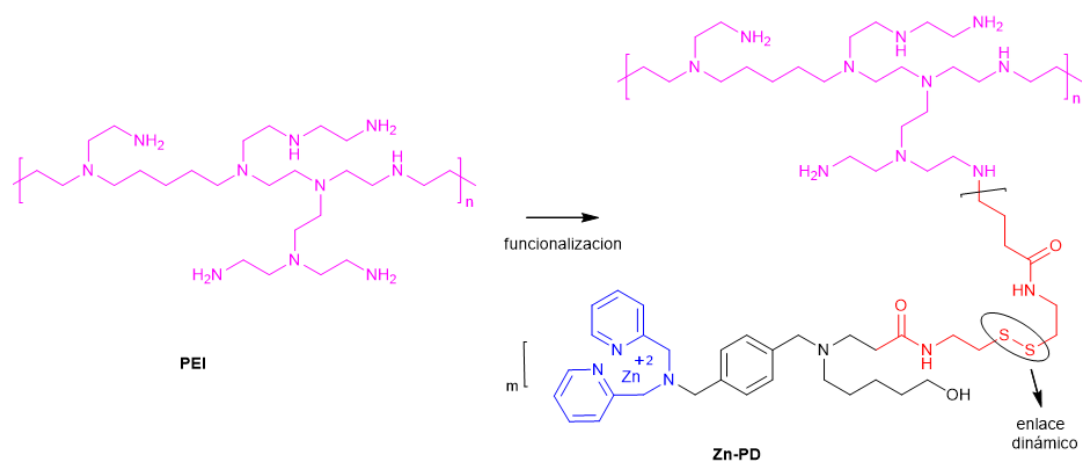


Figura 13. Funcionalización de PEI para obtener Zn-PD⁴⁶ usado como vector sintético, donde se destaca el enlace dinámico disulfuro. Los pasos de funcionalización no se han puesto para no sobrecargar la figura.

Lu y colaboradores diseñaron sistemas poliméricos como vectores no virales con doble funcionalidad: fármacos antitumorales y entrega de ácidos nucleicos. Para ello, siguieron la línea de investigación de Zhao y colaboradores⁴⁷, basándose en unos tipos de biguanidas antidiabéticas tradicionales, que incluyen metformina y buformina, y que han despertado gran interés debido a posibles efectos antiproliferativos y proapoptóticos sobre células cancerígenas. Zhao sintetizó un polímero parecido a metformina con PEI, combinando actividad antitumoral y realizando la entrega de siRNA. Sin embargo, este polímero no era biodegradable. Por ello Liu y colaboradores sintetizaron un polímero catiónico llamado *-N, N'-bis (cistamina) acrilamida-buformina* (CBA-Bu), que contiene enlaces disulfuro en la cadena principal que lo hacen biodegradable, junto con grupos colgantes en la cadena lateral de buformina (Bu) (figura 14).

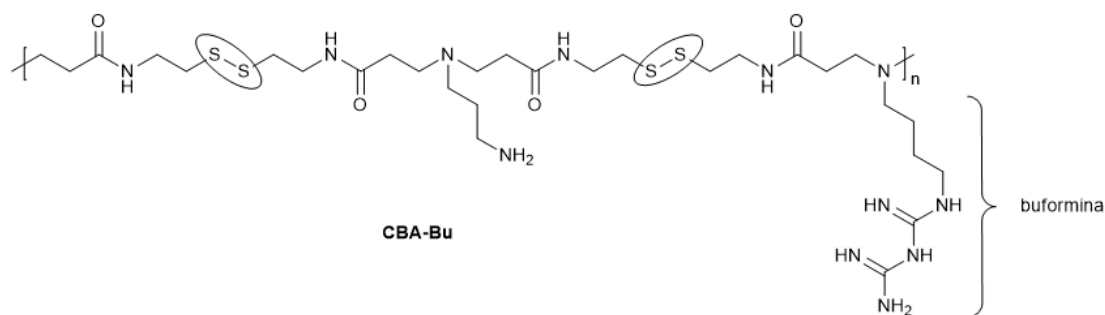


Figura 14. Polímero sintetizado por Lu y colaboradores⁴⁸ que tiene doble funcionalidad y es biodegradable. Aparecen rodeados los enlaces disulfuro, destacando su importancia en este polímero junto con buformina, que también tiene una función importante.

Los poliplexos presentaron un tamaño y carga superficial positiva adecuadas para transfección. Se probó con éxito su estabilidad frente a compuestos electronegativos y la degradación frente a nucleasas. Los enlaces disulfuro funcionaron con éxito realizando su función y disminuyendo drásticamente la citotoxicidad. Se demostró una gran captación celular, atribuida a los grupos colgantes del polímero. Por una parte, se observó que la buformina aumentaba la afinidad con la membrana celular debido a la formación de enlaces de hidrogeno con esta. Por otra parte, los grupos tetrametilenos colgantes mejoran la hidrofobicidad del polímero siendo en parte responsables de la alta captación celular observada. Respecto a la actividad antitumoral, atribuida al grupo buformina de CBA-Bu, los autores demostraron que se necesitaba una concentración mayor en el polímero sin buformina respecto al CBA-Bu para producir el 50% de inhibición en la proliferación de células tumorales. Por lo tanto, se consiguió un vector con doble funcionalidad, es decir, un vector no viral seguro y eficiente con actividad antitumoral.

Jiang y colaboradores, basándose en el hecho de que poliplexos con carga superficial positiva pueden resultar citotóxicos (dañan membranas celulares y de mitocondrias), se fijaron en vectores virales los cuáles no usan una gran densidad de carga positiva para encapsular ácidos nucleicos. Por ello, pensaron en diseñar un vector no catiónico capaz de atrapar los ácidos nucleicos. Su estrategia se basó en que el dsRNA interaccionara con la carga positiva del polímero, y posteriormente eliminar estos restos catiónicos dejando al dsRNA retenido en el polímero (figura 15).

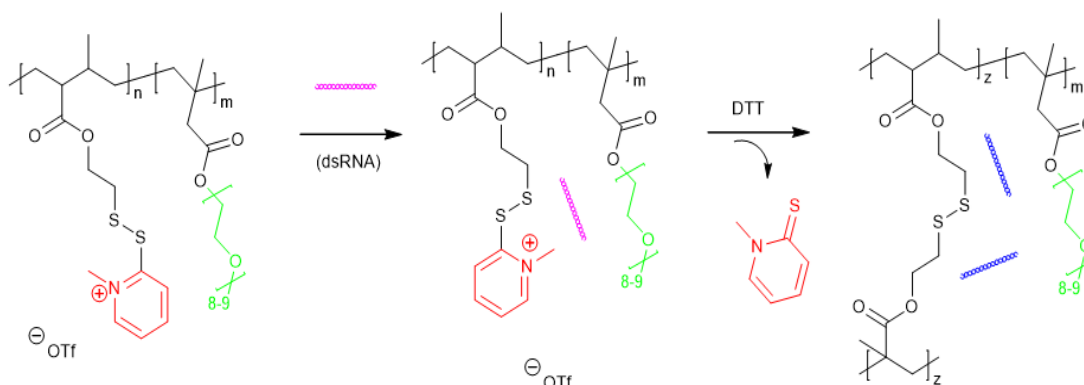


Figura 15. Estrategia empleada por Lu y colaboradores para atrapar dsRNA en un polímero no catiónico⁴⁹. dsRNA sin encapsular (color rosa) y encapsulado (color azul).

El polímero utilizado para llevar a cabo esta función fue un copolímero de metacrilato, donde los comonómeros son disulfuro de piridilo metilado catiónico (MPDS) y un oligómero de PEG se usan como grupos colgantes en las cadenas laterales. Este residuo catiónico (MPDS) es el que interacciona de forma no covalente con el dsRNA. Posteriormente sugirieron que el grupo disulfuro de MPDS podría reaccionar eliminando N-metil-2-piridiotona que es un subproducto estable y no reactivo, mediante la adición de DTT (agente reductor) dando de forma simultánea la reacción de reticulación. Se demostró que los efectos estéricos que se producen en la reacción de reticulación retuvieron el dsRNA dentro del polímero, y que estos complejos no tenían carácter catiónico, lo que redujo su citotoxicidad. La generación de nuevos enlaces disulfuro por reticulación hace que el polímero responda al glutatión como en anteriores ejemplos comentados, de forma que el dsRNA atrapado se libera eficientemente.

Conclusiones

Se han destacado distintas estrategias exploradas para la entrega de material genético y que están basadas en la QCD y en polímeros sintéticos. Debido a la reversibilidad de estos enlaces, estos sistemas responden a estímulos externos y son capaces de liberar la carga de los ácidos nucleicos mucho más eficientemente que los polímeros catiónicos tradicionales, permitiendo también que el polímero se divida en fragmentos más pequeños, lo que disminuye su citotoxicidad.

Entre todos los enlaces propios de la química covalente dinámica hay dos especialmente destacables en el área de la transfección génica: los enlaces hidrazona y disulfuro. Hay algunos ejemplos en los que se han usado enlaces imina con éxito⁵⁰ pero no son los más usados para esta área ya que los enlaces hidrazona aportan ciertas ventajas, siendo la más importante el hecho de que mantienen su forma neutra a pH fisiológico.

Enlace hidrazona		Enlace disulfuro	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
Sensibles al pH	Necesario presencia de aldehídos	Biodegradables	Todavía no hay casos reportados con otros enlaces dinámicos con éxito
Valor de pKa bajo	Solubilidad insuficiente con medios acuosos	Sensibles a entornos reductores	
Baja citotoxicidad	Necesario parte hidrófoba	Muy baja citotoxicidad	
Síntesis sencilla		Alta compatibilidad con medios biológicos	
Se combina bien con otro tipo de interacciones		Se combina bien con otro tipo de interacciones	

Tabla 2. Características de los enlaces covalentes dinámicos utilizados en polímeros para transfección génica.

Es necesario elegir el material más apropiado en función de la naturaleza del material terapéutico (siRNA, mRNA o pDNA) para llevar a cabo la transfección génica, haciendo que no haya un vector universal para los tres debido a peculiaridades que tienen cada uno. Esto queda patente en los estudios del grupo de Montenegro, donde debido a los diferentes tamaños entre pDNA y siRNA es necesario variar el grado de polimerización del vector utilizado. El mismo grupo ha desarrollado una nueva metodología versátil y sencilla basada en enlaces hidrazona, gracias a la cual se pueden identificar de forma rápida vectores útiles (ver figuras 6,7 y 8). Está técnica

es muy prometedora ya que permite obtener una polihidrazona anfifíla capaz de realizar la transfección del mRNA con resultados esperanzadores. Haciendo que en el futuro los investigadores diseñen vectores para mRNA en lugar de para pDNA por las ventajas que este conlleva, como no traspasar la membrana nuclear aumentando la tasa de transfección.

El problema de los vectores desarrollados por Montenegro para siRNA, mRNA o pDNA es su solubilidad en agua, que es solo parcial, por lo que las investigaciones futuras para mejorar estos vectores deberán desarrollar sistemas biocompatibles que presenten una mayor solubilidad en medio acuoso.

La metodología para obtener estas polihidrazonas anfifilas también fue empleada para péptidos penetrantes en células, que han sido investigados como opción útil para transfección génica pero es necesario que tengan una parte hidrófoba que se puede introducir mediante el enlace hidrazona, obteniendo así varios vectores útiles para la entrega de pDNA.

Bouillon y colaboradores también utilizaron este enlace situado en la cadena principal, demostrando la hidrólisis rápida del enlace hidrazona a pH=5 y el hecho de que se acompleje fuertemente con pDNA. Posteriormente, mejoraron estos polímeros introduciendo aminoácidos modificados en la cadena principal que fueron eficaces de acomplejar también siRNA. Además, probaron a introducir enlaces disulfuro en la cadena principal junto con enlaces hidrazona y aminooxi. Si bien los resultados no mejoraron sustancialmente las propiedades de los anteriores, la idea de combinar dos tipos de enlaces covalentes dinámicos es interesante y puede que sirva para obtener mejores materiales en el futuro. Se podría investigar, por ejemplo, vectores que tuvieran enlaces dinámicos en la cadena principal y en la cadena lateral.

Respecto a los enlaces disulfuro se han visto varias estrategias llevadas a cabo por distintos investigadores cuyo objetivo ha sido dar una visión de las diferentes posibilidades que este enlace puede dar en el desarrollo de vectores no virales. En el caso de Haslim se demuestra la formación de nanocápsulas de un tamaño de 10 nm. Estas nano cápsulas de tamaño 10 veces menor que los poliplejos también pueden liberar el siRNA gracias a los enlaces disulfuro (biodegradables), su pequeño tamaño hace que en el futuro puedan ser investigadas para la posible entrega de siRNA en el tejido cerebral.

Una vez que el polímero que tiene enlaces disulfuro llega al citosol en forma de poliplejo se degrada debido al glutatión presente, haciendo que así disminuya de forma drástica su citotoxicidad, y a su vez libere el ácido nucleico. Liu combinó estos enlaces con metales de transición como el Zn, que aumentan la afinidad por el pDNA debido a los grupos fosfato, dando posibles estrategias para futuros vectores como combinar esta QCD para liberar ácido nucleico y a su vez introducir elementos (en este caso el ión Zn (II)) que aumentan la afinidad por el ácido nucleico. Además, también ofrece la posibilidad de utilizar polímeros catiónicos de bajo peso molecular con eficiencias de transfección altas, algo que no había sido descrito.

Estos enlaces disulfuro también se han empleado para sintetizar polímeros catiónicos con doble funcionalidad, siendo por una parte vectores de genes y por otra, agentes antitumorales debido a grupos que se anclan en la cadena lateral como la buformina.

Por último, este enlace disulfuro se utiliza para sintetizar polímeros que atrapen a dsRNA sin que haya carga positiva en la estructura polimérica quedando el ácido nucleico atrapado en su interior, para esto es fundamental la reactividad del enlace disulfuro mediante la reacción de reticulación descrita por Jing.⁴⁹ Donde el paso siguiente en el futuro sería intentar conseguir lo

mismo pero utilizando siRNA en lugar de dsRNA ya que este podría dar lugar a respuestas del sistema inmune.⁵¹

Se han comparado diversas estrategias basadas en dos enlaces propios de la QCD como son los enlaces disulfuro e hidrazona. Algunos de los sistemas son muy prometedores ya que permiten sobrepasar determinadas barreras de la transfección génica para sistemas no virales. La transfección génica sigue siendo un reto complejo ya que los nuevos sistemas deben presentar ciertas características como citocompatibilidad, degradabilidad y respuesta a estímulos externos, que no son fáciles de hallar en un mismo material. No obstante, la identificación y uso de enlaces de la QCD permite abrir líneas de investigación para el diseño de sistemas encapsulantes de material genético.

Referencias

- (1) Lostalé-Seijo, I.; Montenegro, J. Synthetic Materials at the Forefront of Gene Delivery. *Nat. Rev. Chem.* **2018**, 2 (10), 258–277. <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0039-1>.
- (2) Giacca, M.; Zacchigna, S. Virus-Mediated Gene Delivery for Human Gene Therapy. *J. Control. Release* **2012**, 161 (2), 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.008>.
- (3) Wang, T.; Upponi, J. R.; Torchilin, V. P. Design of Multifunctional Non-Viral Gene Vectors to Overcome Physiological Barriers : Dilemmas and Strategies. *Int. J. Pharm.* **2012**, 427 (1), 3–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.07.013>.
- (4) Melchiorri, D.; Pani, L.; Gasparini, P.; Cossu, G.; Ancans, J.; Borg, J. J.; Draï, C.; Fiedor, P.; Flory, E.; Hudson, I.; Leufkens, H. G.; Müller-berghaus, J.; Narayanan, G.; Neugebauer, B.; Pokrotnieks, J.; Robert, J.; Salmonson, T.; Schneider, C. K. Regulatory Evaluation of Glybera in Europe — Two Committees , One Mission. *Nat. Publ. Gr.* **2013**, No. August. <https://doi.org/10.1038/nrd3835-c1>.
- (5) Liebert, M. A.; Medicine, G. Current Status of Gendicine in China : Recombinant Human Ad-P53 Agent for Treatment of Cancers INTRODUCTION. **2005**, 1027 (September), 1016–1027.
- (6) Mintzer, M. A.; Simanek, E. E. Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (2), 259–302. <https://doi.org/10.1021/cr800409e>.
- (7) Hu-Lieskovan, S.; Heidel, J. D.; Bartlett, D. W.; Davis, M. E.; Triche, T. J. Sequence-Specific Knockdown of EWS-FLI1 by Targeted, Nonviral Delivery of Small Interfering RNA Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Metastatic Ewing’s Sarcoma. *Cancer Res.* **2005**, 65 (19), 8984–8992. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0565>.
- (8) Yin, H.; Kanasty, R. L.; Eltoukhy, A. A.; Vegas, A. J.; Dorkin, J. R.; Anderson, D. G. Non-Viral Vectors for Gene-Based Therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, 15 (8), 541–555. <https://doi.org/10.1038/nrg3763>.
- (9) Shan, Y.; Luo, T.; Peng, C.; Sheng, R.; Cao, A.; Cao, X.; Shen, M.; Guo, R.; Tomás, H.; Shi, X. Gene Delivery Using Dendrimer-Entrapped Gold Nanoparticles as Nonviral Vectors. *Biomaterials* **2012**, 33 (10), 3025–3035. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.045>.
- (10) Shi, B.; Zheng, M.; Tao, W.; Chung, R.; Jin, D.; Ghaffari, D.; Farokhzad, O. C. Challenges in DNA Delivery and Recent Advances in Multifunctional Polymeric DNA Delivery Systems. *Biomacromolecules* **2017**, 18 (8), 2231–2246. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00803>.
- (11) Wu, G. Y.; Wu, C. H. Receptor-Mediated in Vitro Gene Transformation by a Soluble DNA Carrier

System. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262 (10), 4429–4432.

- (12) Kim, S. W. Polylysine Copolymers for Gene Delivery. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2012**, 7 (4), 433–438. <https://doi.org/10.1101/pdb.ip068619>.
- (13) Soliman, M.; Nasanit, R.; Abulateefeh, S. R.; Allen, S.; Davies, M. C.; Briggs, S. S.; Seymour, L. W.; Preece, J. A.; Grabowska, A. M.; Watson, S. A.; Alexander, C. Multicomponent Synthetic Polymers with Viral-Mimetic Chemistry for Nucleic Acid Delivery. *Mol. Pharm.* **2012**, 9 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1021/mp200108q>.
- (14) Wightman, L.; Kircheis, R.; Rössler, V.; Garotta, S.; Ruzicka, R.; Kurs, M.; Wagner, E. Different Behavior of Branched and Linear Polyethylenimine for Gene Delivery in Vitro and in Vivo. *J. Gene Med.* **2001**, 3 (4), 362–372. <https://doi.org/10.1002/jgm.187>.
- (15) Zhang, Y.; Qi, Y.; Ulrich, S.; Barboiu, M.; Ramström, O. Dynamic Covalent Polymers for Biomedical Applications. *Mater. Chem. Front.* **2020**, 4 (2), 489–506. <https://doi.org/10.1039/c9qm00598f>.
- (16) Ulrich, S. Growing Prospects of Dynamic Covalent Chemistry in Delivery Applications. *Acc. Chem. Res.* **2019**. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00591>.
- (17) Haag, R.; Kratz, F. Polymer Therapeutics: Concepts and Applications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, 45 (8), 1198–1215. <https://doi.org/10.1002/anie.200502113>.
- (18) Hyeon, T.; Rotello, V. Nanomedicine Themed Issue and Therapy W. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2885–2911. <https://doi.org/10.1039/c2cs15260f>.
- (19) Zhang, W.; Jin, Y. *Dynamic Covalent Chemistry: Principles, Reactions, and Applications*, Wiley-VCH.; **2017**.
- (20) Jin, Y.; Zhang, A.; Huang, Y.; Zhang, W. Shape-Persistent Arylenevinylene Macrocycles (AVMs) Prepared via Acyclic Diene Metathesis Macrocyclization (ADMAC). *Chem. Commun.* **2010**, 46 (43), 8258–8260. <https://doi.org/10.1039/c0cc02941f>.
- (21) Lu, Y.; Guan, Z. Olefin Metathesis for Efficient Polymer Healing via Dynamic Exchange of Strong Carbon – Carbon Double Bonds. **2012**.
- (22) Liu, H.; Li, Y.; Sun, K.; Fan, J.; Zhang, P.; Meng, J.; Wang, S.; Jiang, L. Dual-Responsive Surfaces Modified with Phenylboronic Acid-Containing Polymer Brush to Reversibly Capture and Release Cancer Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (20), 7603–7609. <https://doi.org/10.1021/ja401000m>.
- (23) Black, S. P.; Sanders, J. K. M.; Stefankiewicz, A. R. Disulfide Exchange: Exposing Supramolecular Reactivity through Dynamic Covalent Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43 (6), 1861–1872. <https://doi.org/10.1039/c3cs60326a>.
- (24) Gilbert, H. F. Thiol/Disulfide Exchange Equilibria and Disulfidebond Stability. *Methods Enzymol.* **1995**, 251 (C), 8–28. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)51107-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)51107-5).
- (25) Kost, J.; Langer, R. Responsive Polymeric Delivery Systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64 (SUPPL.), 327–341. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.014>.
- (26) Sonawane, S. J.; Kalhapure, R. S.; Govender, T. Hydrazone Linkages in pH Responsive Drug Delivery Systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, 99, 45–65. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.12.011>.
- (27) Barrangou, R.; Doudna, J. A. Applications of CRISPR Technologies in Research and Beyond. *Nat. Biotechnol.* **2016**, 34 (9), 933–941. <https://doi.org/10.1038/nbt.3659>.
- (28) Behr, J. P. Synthetic Gene Transfer Vectors II: Back to the Future. *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45 (7), 980–984. <https://doi.org/10.1021/ar200213g>.

- (29) Gaynor, J. W.; Campbell, B. J.; Cosstick, R. RNA Interference: A Chemist's Perspective. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (11), 4169–4184. <https://doi.org/10.1039/b920362c>.
- (30) Domaille, D. W.; Love, D. M.; Rima, X. Y.; Harguindey, A.; Fairbanks, B. D.; Klug, D.; Cha, J. N.; Bowman, C. N. Post-Synthetic Functionalization of a Polysulfone Scaffold with Hydrazone-Linked Functionality. *Polym. Chem.* **2018**, 9 (27), 3791–3797. <https://doi.org/10.1039/c8py00631h>.
- (31) Priegue, J. M.; Crisan, D. N.; Martínez-Costas, J.; Granja, J. R.; Fernandez-Trillo, F.; Montenegro, J. In Situ Functionalized Polymers for SiRNA Delivery. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, 55 (26), 7492–7495. <https://doi.org/10.1002/anie.201601441>.
- (32) Priegue, J. M.; Lostalé-Seijo, I.; Crisan, D.; Granja, J. R.; Fernández-Trillo, F.; Montenegro, J. Different-Length Hydrazone Activated Polymers for Plasmid DNA Condensation and Cellular Transfection. *Biomacromolecules* **2018**, 19 (7), 2638–2649. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00252>.
- (33) Gilbert, W. V.; Bell, T. A.; Schaening, C. Messenger RNA Modifications: Form, Distribution, and Function. *Science* (80-.). **2016**, 352 (6292), 1408–1412. <https://doi.org/10.1126/science.aad8711>.
- (34) McIvor, R. S. Therapeutic Delivery of mRNA: The Medium Is the Message. *Mol. Ther.* **2011**, 19 (5), 822–823. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.67>.
- (35) Kauffman, K. J.; Webber, M. J.; Anderson, D. G. Materials for Non-Viral Intracellular Delivery of Messenger RNA Therapeutics. *J. Control. Release* **2016**, 240, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.032>.
- (36) Juanes, M.; Creese, O.; Fernández-Trillo, P.; Montenegro, J. Messenger RNA Delivery by Hydrazone-Activated Polymers. *Medchemcomm* **2019**, 10 (7), 1138–1144. <https://doi.org/10.1039/c9md00231f>.
- (37) Boissguérin, P.; Deshayes, S.; Gait, M. J.; O'Donovan, L.; Godfrey, C.; Betts, C. A.; Wood, M. J. A.; Lebleu, B. Delivery of Therapeutic Oligonucleotides with Cell Penetrating Peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, 87, 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.008>.
- (38) Lehto, T.; Ezzat, K.; Wood, M. J. A.; EL Andaloussi, S. Peptides for Nucleic Acid Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, 106 (2016), 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.008>.
- (39) Louzao, I.; García-Fandiño, R.; Montenegro, J. Hydrazone-Modulated Peptides for Efficient Gene Transfection. *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5 (23), 4426–4434. <https://doi.org/10.1039/c7tb00179g>.
- (40) Bouillon, C.; Paolantoni, D.; Rote, J. C.; Bessin, Y.; Peterson, L. W.; Dumy, P.; Ulrich, S. Degradable Hybrid Materials Based on Cationic Acylhydrazone Dynamic Covalent Polymers Promote Dna Complexation through Multivalent Interactions. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, 20 (45), 14705–14714. <https://doi.org/10.1002/chem.201403695>.
- (41) Uchida, H.; Miyata, K.; Oba, M.; Ishii, T.; Suma, T.; Itaka, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. Odd-Even Effect of Repeating Aminoethylene Units in the Side Chain of N-Substituted Polyaspartamides on Gene Transfection Profiles. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (39), 15524–15532. <https://doi.org/10.1021/ja204466y>.
- (42) Bouillon, C.; Bessin, Y.; Poncet, F.; Gary-Bobo, M.; Dumy, P.; Barboiu, M.; Bettache, N.; Ulrich, S. Biomolecular Dynamic Covalent Polymers for DNA Complexation and SiRNA Delivery. *J. Mater. Chem. B* **2018**, 6 (44), 7239–7246. <https://doi.org/10.1039/C8TB01278D>.
- (43) Mukherjee, S.; Cash, J. J.; Sumerlin, B. S. Responsive Dynamic Covalent Polymers. *Dyn. Covalent Chem.* **2017**, 321–358. <https://doi.org/10.1002/9781119075738.ch8>.

- (44) Bej, R.; Dey, P.; Ghosh, S. Disulfide Chemistry in Responsive Aggregation of Amphiphilic Systems. *Soft Matter* **2019**, *16* (1), 11–26. <https://doi.org/10.1039/c9sm01960j>.
- (45) Hashim, P. K.; Okuro, K.; Sasaki, S.; Hoashi, Y.; Aida, T. Reductively Cleavable Nanocaplets for SiRNA Delivery by Template-Assisted Oxidative Polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (50), 15608–15611. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b08948>.
- (46) Liu, S.; Zhou, D.; Yang, J.; Zhou, H.; Chen, J.; Guo, T. Bio reducible Zinc(II)-Coordinative Polyethylenimine with Low Molecular Weight for Robust Gene Delivery of Primary and Stem Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (14), 5102–5109. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b13337>.
- (47) Zhao, Y.; Wang, W.; Guo, S.; Wang, Y.; Miao, L.; Xiong, Y.; Huang, L. PolyMetformin Combines Carrier and Anticancer Activities for in Vivo SiRNA Delivery. *Nat. Commun.* **2016**, *7* (May). <https://doi.org/10.1038/ncomms11822>.
- (48) Lu, M.; Xing, H.; Cheng, L.; Liu, H.; Lang, L.; Yang, T.; Zhao, X.; Xu, H.; Ding, P. A Dual-Functional Buformin-Mimicking Poly(Amido Amine) for Efficient and Safe Gene Delivery. *J. Drug Target.* **2020**, *0* (0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1729770>.
- (49) Jiang, Z.; Cui, W.; Prasad, P.; Touve, M. A.; Gianneschi, N. C.; Mager, J.; Thayumanavan, S. Bait-and-Switch Supramolecular Strategy to Generate Noncationic RNA-Polymer Complexes for RNA Delivery. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (1), 435–442. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01321>.
- (50) Turin-Moleavin, I. A.; Doroftei, F.; Coroaba, A.; Peptanariu, D.; Pinteala, M.; Salic, A.; Barboiu, M. Dynamic Constitutional Frameworks (DCFs) as Nanovectors for Cellular Delivery of DNA. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (34), 9005–9011. <https://doi.org/10.1039/c5ob01315a>.
- (51) Alexopoulou, L.; Holt, A. C.; Medzhitov, R.; Flavell, R. A. Recognition of Double-Stranded RNA and Activation of NF- κ B by Toll-like Receptor 3. *Nature* **2001**, *413* (6857), 732–738. <https://doi.org/10.1038/35099560>.