



**“SÍNTESIS Y ESTUDIO DE LA
AUTOORGANIZACIÓN EN AGUA DE
NUEVOS ANFÍFILOS BIOCOMPATIBLES
PARA EL TRANSPORTE SELECTIVO DE
FÁRMACOS”**

Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia
Trabajo de fin de grado. Grado en Farmacia.

Violeta Alejandre Gemas

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica.
Área de Química Orgánica.
Tutora: Prof. Victoria Valdivia Giménez
Trabajo experimental.

Sevilla, julio 2018.



Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia

Trabajo de Fin de Grado
Grado en Farmacia

**“SÍNTESIS Y ESTUDIO DE LA AUTOORGANIZACIÓN EN AGUA DE
NUEVOS ANFÍFILOS BIOCOMPATIBLES PARA EL TRANSPORTE
SELECTIVO DE FÁRMACOS”**

Presentado por: Dña. Violeta Alejandre Gemas

Sevilla, Junio 2018

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Área de Química Orgánica
Tutora: Prof. Victoria Valdivia Giménez
Trabajo experimental

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción y antecedentes.....	2
2. Objetivos.....	5
3. Metodología y parte experimental.....	7
3.1 Disolventes y reactivos.....	7
3.2 Técnicas y aparatos.....	8
3.3 Síntesis y caracterización de los productos.....	8
4. Resultados y discusión.....	13
4.1 Síntesis del neoaminolípido.....	13
4.1.1 Síntesis del espaciador polioxigenado.....	13
4.1.2 Unión del aminoácido con el espaciador polioxigenado.....	14
4.1.3 Síntesis del derivado alquínic del ácido oleico.....	14
4.1.4 Incorporación del derivado del ácido oleico y desprotección del grupo amino.....	15
4.2 Formación de los agregados supramoleculares (micelas) en agua y determinación de su tamaño medio por DLS y TEM.....	17
5. Conclusiones.....	23
6. Bibliografía.....	24

Resumen

La autoasociación o autoorganización supramolecular de monómeros mediante enlaces de tipo electrostático, Van der Waals o enlace de hidrógeno, es actualmente una de las aproximaciones más potentes y prometedoras de la nanotecnología para la construcción de nanomateriales funcionales complejos, siendo de sumo interés, por ejemplo, en el diseño de sistemas de transporte selectivo de fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades graves.

El objetivo de este TFG consiste en la obtención de agregados supramoleculares multivalentes del tipo de las micelas que presentan una triple acción sinérgica, (i) por un lado, pueden actuar como vectores de genes en terapia génica al ser capaces de conjugarse con ellos a través de interacciones electrostáticas entre los grupos amino protonados de residuos de glicina de la superficie del nanovector y la superficie de los genes cargados negativamente, (ii) adicionalmente, el aminoácido glicina que presentan en su superficie los agregados supramoleculares es el ligando específico del receptor de glicina (GlyR) que se localiza en determinadas zonas del SNC, siendo este hecho de gran importancia para el transporte selectivo de fármacos en el tratamiento específico de enfermedades del SNC, (iii) por último, estos agregados supramoleculares nanométricos presentan una cavidad hidrófoba en su interior que permite acoger fármacos poco solubles en agua para, de esta forma, no sólo mejorar su biodisponibilidad sino acceder de forma selectiva a la zona del organismo donde han de realizar su acción farmacológica.

Siguiendo un método que permite la síntesis eficiente de un neoaminolípido oleico anfifílico como monómero, con un balance hidrófilo-hidrófobo adecuado hemos podido obtener micelas mediante autoorganización supramolecular *in situ*.

Tanto el anfífilo como sus precursores han sido caracterizados mediante RMN y EMAR y las micelas mediante la técnica conocida como DLS, dispersión de luz dinámica y TEM, microscopía electrónica de transmisión.

El grupo en el que se ha realizado este trabajo de fin de grado, ha diseñado y sintetizado recientemente diversos materiales nanoestructurados con diferentes topologías, para su aplicación como nuevos nanovectores para el transporte selectivo de fármacos como el sulforafano, un potente agente anticanceroso.

Palabras clave: Aminolípido, nanovector, autoasociación supramolecular

1. Introducción y antecedentes

La autoasociación o autoorganización de monómeros mediante enlaces de tipo electrostático, Van der Waals o enlace de hidrógeno, es actualmente una de las aproximaciones más potentes y prometedoras para la construcción de nanomateriales funcionales complejos (Blau y cols., 2004, Gerhardt y cols., 2004, Palermo y cols., 2007). En este sentido, la búsqueda y el diseño de moléculas o bloques químicos sencillos capaces de realizar una autoorganización compleja y, en el mejor de los casos, modelable, es de sumo interés. Un ejemplo ilustrativo de este tipo de moléculas lo constituyen los lípidos en particular, o las moléculas anfifílicas en general, (Elemans y cols., 2003) capaces de generar un gran número de estructuras autoorganizadas de diferentes tamaños y topologías. A modo de ejemplo, la membrana celular de las células vivas, formada por una autoorganización en bicapa es sin lugar a dudas el paradigma de un sistema complejo nanométrico formado a partir de unidades de fosfolípidos. A lo largo de los últimos años, se ha demostrado que moléculas anfifílicas de origen sintético y de bajo peso molecular son capaces de generar un gran número de estructuras autoorganizadas de diferentes tamaños y topologías tales como micelas monocapa, vesículas (también conocidas como liposomas), barras, hojas y tubos (figura 1). (Boullanger, 1997).

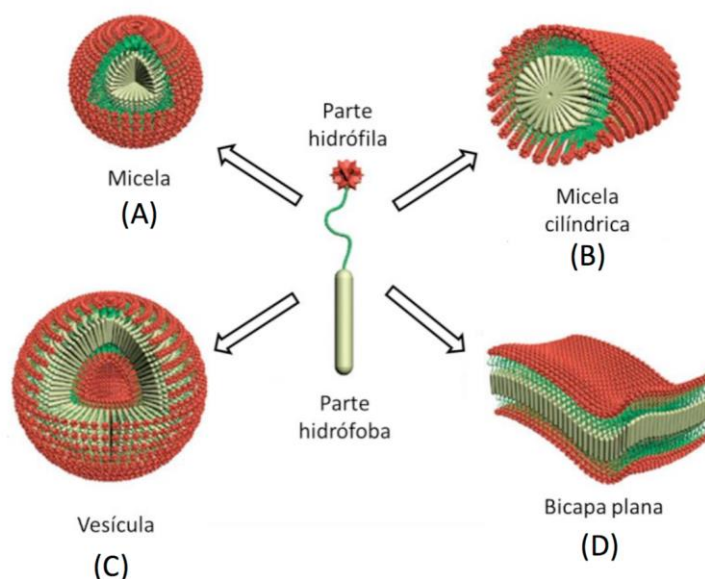


Figura 1

A causa de su importancia industrial, se ha invertido un gran esfuerzo en entender la relación existente entre la estructura molecular del anfífilo y las estructuras macromoleculares que de él resultan. Sin embargo, debido a su complejidad, predecir qué tipo de estructura macromolecular resulta de la autoorganización de moléculas anfifílicas es tarea ardua, aunque existen actualmente estudios dirigidos hacia su racionalización. La gran mayoría de estas estructuras nanométricas han encontrado un gran número de aplicaciones en diferentes campos, siendo las aplicaciones biológicas las más destacadas como veremos más adelante. Al autoorganizarse en agua, las moléculas anfifílicas, en la gran mayoría de los casos, exponen al medio acuoso su cabeza polar, lo que convierte el diseño de los monómeros en la etapa clave para obtener nanomateriales funcionales. Sin embargo, el cuello de botella en este tipo de investigaciones consiste en desarrollar rutas sintéticas sencillas que permitan modular la estructura del anfífilo para una autoorganización adecuada.

Con respecto a las aplicaciones biológicas de las moléculas anfifílicas, en primer lugar, es importante destacar que la terapia génica ha ganado una atención significativa en las dos últimas décadas como un método potencial para tratar enfermedades crónicas y trastornos genéticos, así como un método alternativo a la tradicional quimioterapia para el tratamiento del cáncer (Zhang y cols., 2012, Cavazzana-Calvo y cols., 2000, Yang y cols., 2007). La mayoría del trabajo de investigación se centra actualmente en el diseño de vectores genéticos efectivos que puedan condensar y proteger oligonucleótidos para la transfección génica, ya que los oligonucleótidos libres y el ADN se degradan rápidamente por las nucleasas séricas de la sangre cuando se inyectan por vía intravenosa y, por lo tanto, no pueden pasar fácilmente a través de la barrera de la superficie celular que tiene carga negativa (Niven y cols., 1998). Hasta hace un tiempo, las estrategias se centraban en el uso de virus como vectores de genes, incluyendo retro y adenovirus, ya que estos vectores exhiben una alta eficiencia en la transfección génica mediante la administración tanto de ADN como de ARN a numerosas líneas celulares (Anderson, 1998). Sin embargo, problemas como la toxicidad, inflamación, respuestas inmunes y mutaciones subrayan la necesidad de alternativas no virales (Verma y cols., 1997).

El uso de vectores no virales para la administración de genes, incluidos lípidos catiónicos (Felgner y cols., 1987), polímeros (Fukushima y cols., 2005), dendrímeros (Harada y cols., 2007) y péptidos (Gupta y cols., 2005) son una alternativa potencialmente más segura a la administración de genes virales. Sin embargo, a

diferencia de los análogos virales de los que se ha demostrado que pueden superar las barreras celulares y los mecanismos de defensa inmune, los portadores de genes no virales a menudo muestran menor eficiencia de transfección ya que deben superar numerosos obstáculos extra e intracelulares. No obstante, su biocompatibilidad y la relativa facilidad con que se pueden obtener y producir a gran escala, hace que estos compuestos sean cada vez más atractivos para la terapia génica (Behr, 1993). Como consecuencia de ello, en la última década se han llevado a cabo una gran cantidad de aproximaciones centradas en el diseño de compuestos catiónicos que puedan formar complejos con ADN y superar in vitro e in vivo las barreras para la administración de genes. Entre ellos, los dendrones han sido de interés particular debido su efecto multivalente (Figura 2) (Malhotra y cols., 2012) y en este trabajo de fin de grado, se proponen las micelas como vectores multivalentes para la terapia génica.

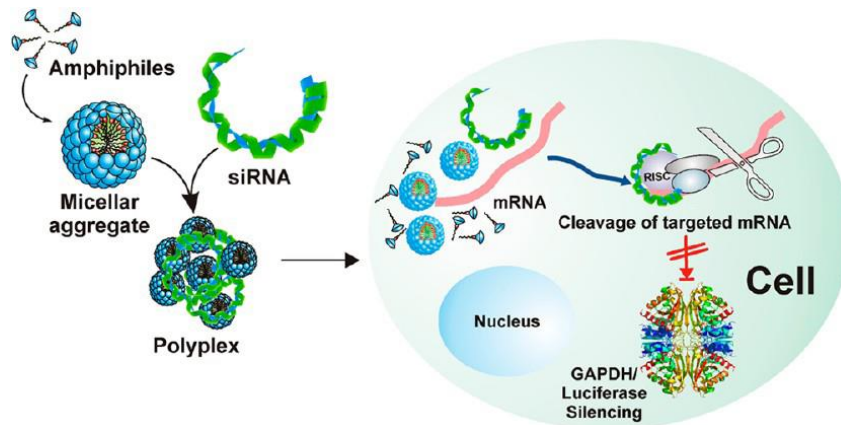


Figura 2: Terapia génica promovida por micelas. (Malhotra y cols., 2012)

Pero además, la glicina tiene un papel doble en el sistema nervioso central (SNC), como inhibidor en vías glicinérgicas y como activador del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) en vías glutamatérgicas excitadoras. La señal inhibitoria es transmitida a través del receptor ionotrópico de glicina (GlyR) (Figura 3) (Aragón y cols., 2003), que actúa como un canal de Cl^- hiperpolarizando la membrana postsináptica. La terminación de la neurotransmisión es llevada a cabo por la captura de la glicina a través de transportadores específicos dependientes de Na^+ y Cl^- , GLYT1 y GLYT2, localizados en la membrana plasmática de las terminales nerviosas y astrocitos próximos a la sinapsis. Parece probable y resulta esperanzador, que los recientes avances permitan desarrollar compuestos que actúen selectivamente como ligandos sobre los receptores de glicina (GlyR) (Bartholomaeus y cols., 2008) y tengan

aplicaciones terapéuticas como antipsicóticos, antiepilépticos o analgésicos (Núñez y cols., 2008).

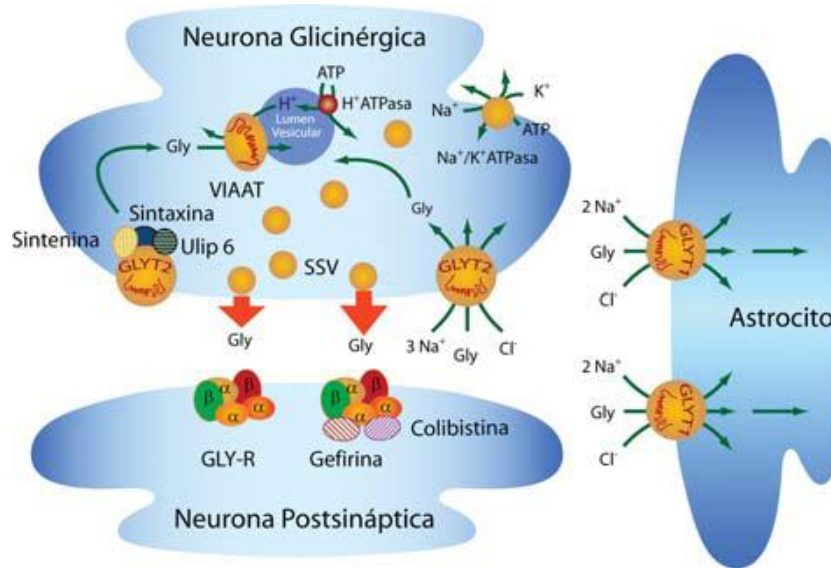


Figura 3: Esquema de la sinapsis glicinérgica inhibitoria. En el elemento postsináptico se indican los receptores pentaméricos de glicina GlyR y las proteínas asociadas gefirina y colibistina.

Por otro lado, pero en íntima relación con todo lo anteriormente comentado, las investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha, han puesto de manifiesto que los ligandos multivalentes presentan a menudo una afinidad aparente respecto al receptor muy superior a la del correspondiente ligando monovalente. Este aumento de afinidad se debe a que mientras los ligandos monovalentes tienen acceso a un limitado número de mecanismos enlazantes, los ligandos multivalentes pueden interactuar con receptores mediante varios mecanismos. (Mammen y cols., 1998, Kiessling y cols., 2000, Horan y cols., 1999, Roy y cols., 1998, Bruehl y cols., 2001, Kudryashov y cols., 2001).

Entre estos sistemas se encuentran las nanopartículas, los copolímeros, los liposomas, las micelas o las monocapas autoensambladas.

2. Objetivos

El tema del que trata esta investigación consiste en la síntesis de un aminolípido biocompatible con el organismo que se autoorganice en agua dando lugar a sistemas multivalentes que presenten una triple acción sinérgica, (i) por un lado, como vectores de genes en terapia génica al ser capaces de conjugarse con ellos a través de

interacciones electrostáticas entre los grupos amino protonados de residuos de glicina de la superficie del nanovector y la superficie de los genes cargados negativamente, (ii) adicionalmente, el aminoácido glicina que presentan en su superficie los agregados supramoleculares es el ligando específico del receptor de glicina (GlyR) que se localiza en determinadas zonas del SNC, siendo este hecho de gran importancia para el tratamiento específico de enfermedades del SNC, (iii) por último, estos agregados supramoleculares nanométricos presentan una cavidad hidrófoba en su interior que permite acoger fármacos poco solubles en agua para, de esta forma, no sólo mejorar su biodisponibilidad sino acceder de forma selectiva a la zona del organismo donde han de realizar su acción farmacológica.

Estos aminoconjugados están formados por una cabeza polar y una cola apolar, lo que les confiere un carácter anfifílico, de tal manera que una vez que se encuentran disueltos en medio acuoso se autoorganizan de forma compleja dando lugar a la formación de micelas, vesículas o liposomas, cilindros, láminas, etc. En nuestro caso se trata de micelas que son los más sencillos, en las que las cabezas polares, formadas por el aminoácido glicina protonado, están orientadas hacia el exterior, es decir, hacia el medio acuoso y la parte hidrófoba (cola apolar) está constituida por una cadena alquílica, formada por un derivado del ácido oleico, orientada hacia el interior.

Debido a que el 90% de los fármacos son insolubles en disolventes polares como el agua que es el medio biológico en el organismo, se necesita crear un medio hidrófobo en el cuál se pueda introducir un fármaco para que éste llegue de manera correcta a la célula, por ello las micelas formadas en medio acuoso presentan en el interior un medio hidrófobo y una vez que se adiciona el fármaco, éste se situará en su interior.

El objetivo de este TFG es llevar a cabo la síntesis del neoaminolípido derivado del ácido oleico con un balance hidrófilo-hidrófobo adecuado que permita la formación de sistemas funcionales complejos por autoorganización en agua, para ello, el neoaminolípido consta de tres partes bien diferenciadas: i) Una cabeza polar compuesta por glicina para el reconocimiento biológico ii) Un espaciador derivado de tetraetilenglicol para aumentar el balance hidrófilo-hidrófobo y la compatibilidad con los sistemas biológicos iii) Como parte lipídica un derivado del ácido oleico que presenta 18 átomos de carbono y una insaturación en el carbono 9. (Figura 2).

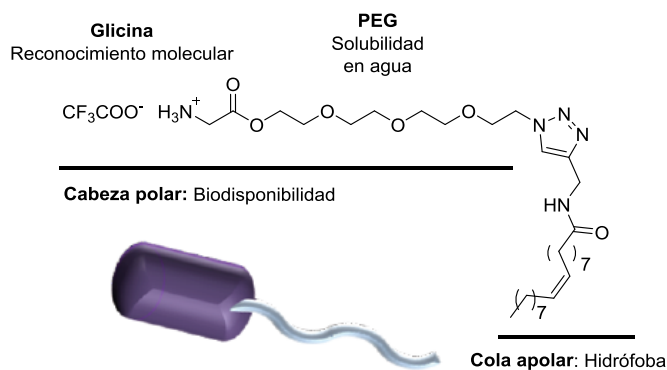


Figura 2: Representación esquemática del neoaminolípidio

La autoorganización en agua del neoaminolípidio para la formación de sistemas nanométricos como micelas (figura 3), su caracterización y el estudio de sus aplicaciones como nanovectores para el transporte selectivo de fármacos así como en terapia génica constituyen el fin último de esta investigación y actualmente se están llevando a cabo dichos estudios en el grupo de investigación en el que se ha realizado este TFG.

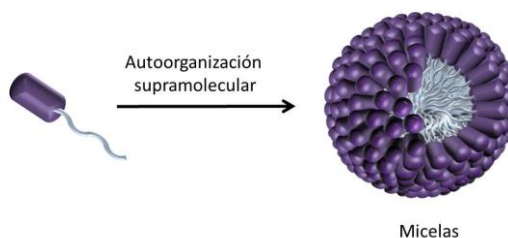


Figura 3

3. Metodología y parte experimental.

3.1 Disolventes y reactivos

Los disolventes anhidros empleados se secaron con un sistema de deshidratación por paso de disolvente a través de columnas de secado de la empresa *Innovative technology*, disponiendo de este modo de THF, Et_2O , DMF, CH_2Cl_2 y tolueno anhidros. En los casos de no necesitar disolventes anhidros, se emplearon en grado de pureza analítica.

Los reactivos se obtuvieron comercialmente y se utilizaron sin ninguna purificación adicional

3.1 Técnicas y aparatos

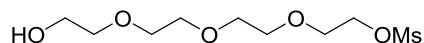
La **cromatografía en capa fina (c.c.f.)**, se ha realizado empleando cromatoplasmas de gel de sílice soportada sobre aluminio *Alufram®Sil.G/V245 Merck* de 0.25 nm, revelado las placas eluidas y secas con ácido fosfomolibdico o ácido sulfúrico. Para la purificación llevada a cabo, generalmente en columna cromatográfica bajo presión, se utilizó como fase estacionaria gel de sílice Merck 60 A (tamaño de poro 40-63 µm). La composición del eluyente empleado se detalla para cada compuesto.

Los **espectros de Resonancia Magnética Nuclear** (¹H-RMN, ¹³C-RMN) se han registrado espectrómetros *Bruker AMX-500* y *Bruker Advance DRX-500* (500 MHz) del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla CITIUS. Los espectros se han registrado a partir de muestras en disolución en el disolvente deuterado que se indica entre paréntesis. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), usando como referencia la señal residual del disolvente no deuterado.

Los **espectros de masas de alta resolución (EMAR)** fueron realizados por el Servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Sevilla en un espectrómetro *Kratos MS-80-RFA* y en un espectrómetro de masas *Micromass* modelo *AutoSpec*.

3.3 Síntesis y caracterización de los productos

Metanosulfonato de 11-hidroxi-3,6,9-trioxaundecilo (2)



Sobre una disolución de tetraetilenglicol **1** (22.7 mL, 140 mmol) en THF (100 mL) y Et₃N anhidros (15 mL), se adicionó gota a gota y a 0 °C cloruro de mesilo (10.8 mL, 140 mmol). Seguidamente, se dejó que la reacción alcanzara la temperatura ambiente, continuándose la agitación durante toda la noche. La mezcla de reacción se neutralizó con una disolución acuosa de NH₄Cl saturada (50 mL) y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 150 mL). Los extractos orgánicos se reunieron y lavaron con una disolución saturada de NaCl (20 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó el disolvente a presión reducida en el rotavapor.

Posteriormente, el crudo se purificó por columna cromatográfica con CH₂Cl₂/MeOH (20:1) como eluyentes. Así, se obtuvo el compuesto **2** puro como un sirupo incoloro con un rendimiento del 37% (12.9 g).

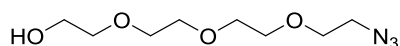
Rf: 0.5 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 4.41-4.35 (m, 2H, CH₂OMs), 3.81-3.60 (m, 14H), 3.09 (s, 3H, CH₂OSO₂CH₃), 2.97 (sa, 1H, OH).

¹³C RMN (100.6 MHz, CDCl₃): δ 72.5 (HOCH₂CH₂O), 70.4, 70.3, 70.1, 69.4, 69.3, 69.0 (CH₂CH₂OMs), 61.6 (COH), 37.6 (OSO₂CH₃).

EMAR: Calculado para C₉H₂₀O₇SNa 273.1008 [M+Na]⁺, encontrado 273.0997.

11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-ol (**3**)



A una disolución del compuesto **2** (8.19 g, 0.30 mol) en EtOH 95% (50 mL) se adicionó NaN₃ (2.4 g, 36.8 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante toda la noche. Posteriormente, se neutralizó la mezcla con una disolución saturada de NaCl (50 mL), extrayéndose la fase acuosa con éter (250 mL). Los extractos orgánicos se reunieron y secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Tras la filtración del mismo y evaporación del disolvente a presión reducida en el rotavapor, el crudo se purificó mediante columna cromatográfica, usando como eluyentes Hex/AcOEt (1:1). Siguiendo este procedimiento el compuesto **3** se aisló como un sirupo transparente con un rendimiento del 97% (6.4 g).

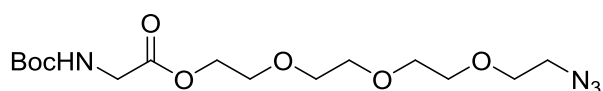
Rf: 0.18 (Hex/AcOEt 1:1).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 3.58 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz, HOCH₂CH₂), 3.55-3.51 (m, 10H, 5 CH₂O), 3.46 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz, OCH₂CH₂N₃), 3.26 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz, CH₂CH₂N₃), 3.10 (sa, 1H, OH).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 72.5 (HOCH₂CH₂O), 70.6, 70.5, 70.4, 70.2, 69.9 (CH₂O), 61.5 (COH), 50.5 (CN₃).

EMAR: Calculado para C₈H₁₇N₃O₄Na 220.1297 [M+Na]⁺, encontrado 220.1288.

Terc-butoxicarboniloglicinato de 2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etilo (**4**)



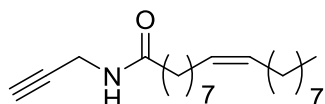
A una disolución del aminoácido glicina-Boc (159 mg, 0.91 mmol) y diisopropilcarbodiimida (DIPC) (0,12 mL, 1.37 mmol) en diclorometano (1 mL) y en atmósfera de Argón, se adicionó vía cánula bajo atmósfera de Argón, una disolución de **3** (300 mg, 1,37 mmol) y N,N-dimetilaminopiridina (49 mg, 0,4 mmol) en diclorometano (1 mL). La mezcla se dejó agitando toda la noche. Posteriormente se trató diluyendo con diclorometano (10 mL) y adicionando disolución de HCl 4N (2 veces x 7 mL). A continuación se trató con disolución saturada de NaHCO₃ (1 vez x 7 mL) y finalmente con disolución saturada de NaCl (1 vez x 7 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente en el rotavapor. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna con una mezcla de AcOEt: Hexano 1:1 como eluyente. De esta forma se obtuvo el compuesto **4** como un sirupo traslúcido y con un rendimiento del 70,5%

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.048 (sa, 1H, NHBoc), 4.330 (t, 2H, *J* = 5Hz, OCOCH₂CH₂O), 3.966 (d, 2H, *J* = 5 Hz, BocNHCH₂CO), 3.736 (t, 2H, *J* = 5 Hz, COOCH₂CH₂O), 3.685-3.681 (m, 10H, OCH₂CH₂O), 3.412 (t, 2H, CH₂CH₂N₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 170.37 (COO), 155,67 (CONH), 79.967 (*t*-BuC), 70,729, 70.683, 70.662, 70.049, 68.914, 64.361, 60.365, 53.401, 50.712, 42.429 (BocNHCH₂COO), 28.313.

EMAR: Calculado para C₁₅H₂₈N₄O₇ 399.4122 [M+Na]⁺, encontrado 399.4102

N-(2-propin-1-il)oleamida (**5**)



A una disolución del ácido oleico (500 mg, 1,8 mmol) y diisopropilcarbodiimida (DIPC) (0,4 mL, 2.7 mmol) en diclorometano (4 mL) y en atmósfera de Argón, se adicionó vía cánula bajo atmósfera de Argón, una disolución de propargilamina (0,15 mL, 2,34 mmol) y N,N-dimetilaminopiridina (66 mg, 0,54 mmol) en diclorometano (4 mL). La mezcla se dejó agitando toda la noche. Posteriormente se trató diluyendo con diclorometano (10 mL) y adicionando disolución de HCl 4N (2 veces x 7 mL). A continuación se trató con disolución saturada de NaHCO₃ (1 vez x 7 mL) y finalmente con disolución saturada de NaCl (1 vez x 7 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente en el rotavapor. El

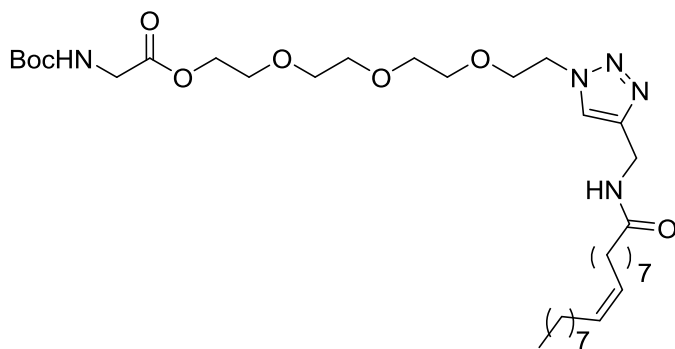
crudo se purificó mediante cromatografía en columna con una mezcla de AcOEt: Hexano 1:5 como eluyente. De esta forma se obtuvo el compuesto **5** como un sólido blanco y con un rendimiento del 90%

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.579 (sa, 1H, NHCO), 5.390-5.353 (m, 2H, CH=CH), 4.079 (m, 2H, HCCCH₂NHCO), 2.249 (m, 1H, HCCCH₂NHCO), 2.225-2.194 (m, 2H, HNCOCH₂), 2.051-2.011 (m, 4H, CH₂CH=CHCH₂), 1.673-1.644 (m, 2H, HNCOCH₂CH₂), 1.326-1.292 (m, 20H, CH₂), 0.905 (T, 3H, J = 7 Hz, CH₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 172.749 (C=O), 130.011, 129.735, 79.689, 71.493, 36.460, 31.906, 29.770, 29.698, 29.524, 29.323, 29.236, 29.134, 29.124, 27.224, 27.171, 25.553, 22.683, 14.113.

EMAR: Calculado para C₂₁H₃₇NO 342.2753 [M+Na]⁺, encontrado 342.2767

tert-butoxycarbonyl glicinato de 2-(2-(2-(2-(4-(oleamidometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo (6)



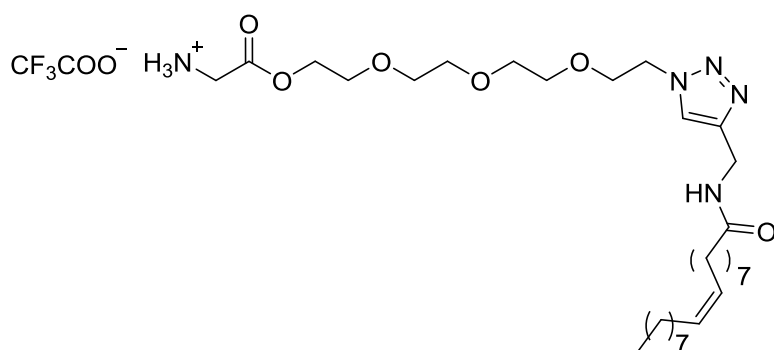
A una disolución de L-Ascorbato sódico y CuSO₄ en agua (2,8 mL), se adiciona una disolución de **4** (100 mg, 0,27 mmol) y **5** (86,27 mg, 0,27 mmol) en diclorometano (2,8 mL). La mezcla se dejó agitando vigorosamente durante toda la noche. Posteriormente, se separaron las dos fases y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó en el rotavapor. De esta forma se obtuvo el compuesto **6** como un sólido blanco con un rendimiento del 97 %.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.727 (s, 1H, H triazol), 6.236 (sa, 1H, triazol-CH₂NHCO), 5.361 (m, 2H, CH=CH), 5.171 (sa, 1H, BocNH), 4.554-4.525 (m, 4H, CH₂CH=CHCH₂), 4.320 (t, 2H, J = 5 Hz, COOCH₂CH₂O), 3.893 (t, 2H, J = 5.5 Hz, CH₂-triazol), 3.656-3.630 (m, 8H, OCH₂CH₂O), 2.206 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH₂CONHCH₂-triazol), 2.034-2.009 (m, 4H, CH₂), 1.646 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH₂CH₂CONHCH₂-triazol), 1.609 (s, 2H, CH₂-triazol), 1.472 (s, 9H, Boc), 1.303 (m, 20H, CH₂), 0.904 (t, 3H, J = 6.5 Hz, CH₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 173.233 (CH₂CONH), 170.470 (COO), 155.782 (OCONH), 129.978, 129.740, 79.926, 77.273, 70.611, 70.589, 70.534, 69.350, 68.913, 64.265, 53.437, 50.588, 42.385, 36.612, 34.859, 31.888, 29.755, 29.713, 29.508, 29.298, 29.268, 29.144, 28.317, 27.208, 27.177, 25.642, 22.666, 14.105.

EMAR: Calculado para C₃₆H₆₅O₈N₅ 718. 4713 [M+Na]⁺, encontrado 718.4715

2,2,2-trifluoroacetato de 14-(4-(oleamidometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-2-oxo-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-amonio (7)



A una disolución del compuesto **6** (183 mg, 0,26 mmol) en diclorometano (1 mL) se adicionó a 0° C ácido trifluoroacético (TFA) (1 mL). La mezcla se agitó durante 15 minutos y tras este tiempo se evaporó el disolvente en el rotavapor, posteriormente se adicionó tolueno (2,5 mL) y se volvió a evaporar en el rotavapor y se hizo lo mismo con éter (2,5 mL). De esta forma se obtuvo el compuesto **7** como un sólido beige con un rendimiento cuantitativo.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.710 (s, 1H, triazol), 6.306 (sa, 1H, CH₂NHCO), 5.351 (m, 2H, CH=CH), 4.540-4.521 (m, 4H, CH₂CH=CHCH₂), 4,311-4.521 (m, 2H, COOCH₂CH₂O), 3.881 (t, 2H, *J* = 4.5 Hz, CH₂-triazol), 3.718-3.622 (m, 9H, NH₃CH₂ y CH₂CH₂O), 2.194 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, CH₂CONHCH₂-triazol), 2.023-1.999 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 1.650-1.620 (m, 2H, CH₂CH₂CONHCH₂-triazol), 1.303-1.281 (m, 18H, CH₂), 0.894 (t, 3H, *J* = 6 Hz, CH₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 173.093 (CONH), 169.947 (CH₂COO), 129.996, 129.745, 123.298, 72.566, 70.616, 70.599, 70.570, 70.451, 70.3046, 69.4405, 69.066, 50.277, 36.583, 34.917, 31.894, 29.763, 29.713, 29.513, 29.310, 29.297, 29.256, 29.138, 27.221, 27.182, 22.668, 14.090.

EMAR: Calculado para C₃₃H₅₈F₃N₅O₈ 710.4311 [M+H]⁺, encontrado 710.4310

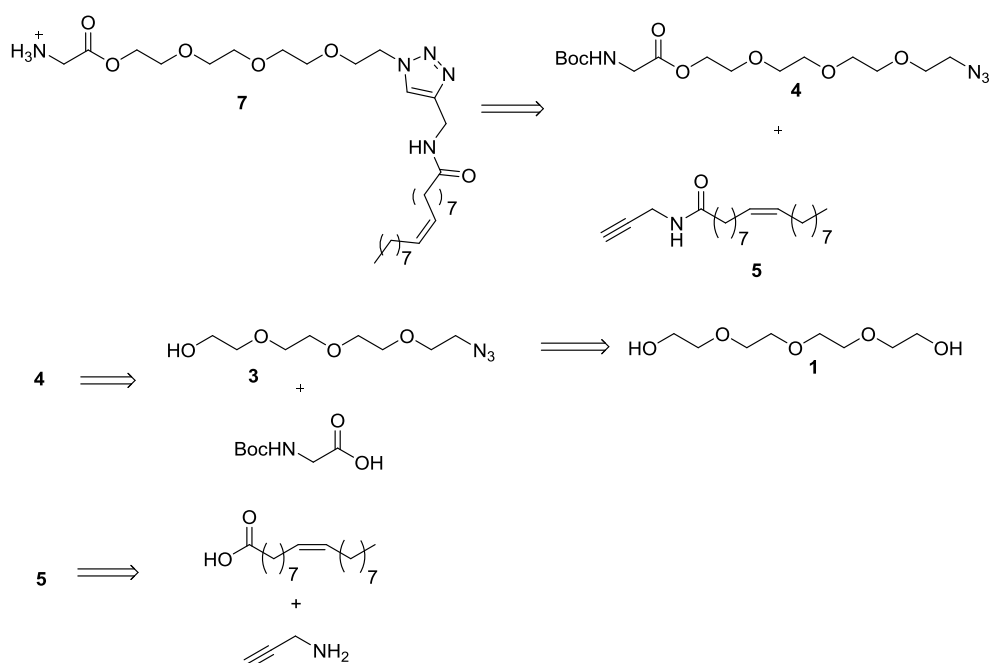
4. Resultados y discusión

4.1 Síntesis del neoaminolípido

El análisis retrosintético de la molécula objetivo (**7**) que se presenta en el esquema 1, muestra cómo hemos mencionado en el apartado de objetivos, que el compuesto anfifílico está constituido por tres partes:

- Cabeza polar formada por un residuo de glicina-Boc
- Espaciador polioxigenado
- Cola apolar constituida por un derivado alquínico del ácido oleico.

La síntesis de cada una de estas partes será desgranada en los siguientes subapartados de esta sección.

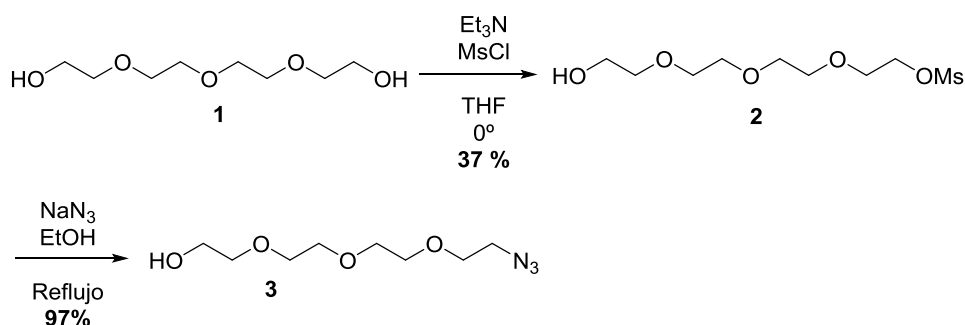


Esquema 1: Análisis retrosintético del neoaminolípido

4.1.1 Síntesis del espaciador polioxigenado

Con el fin de mantener la convergencia sintética, el espaciador polioxigenado debe incorporar dos grupos reactivos ortogonales, capaces de conectarse al grupo carboxilo de la glicina y al derivado alquínico del ácido oleico. La síntesis de un espaciador que cumpla estos requisitos se presenta en el esquema 2. Partiendo del tetraetilenglicol **1**, una mesilación estadística conduce al derivado monomesilado **2**. El grupo mesilo es

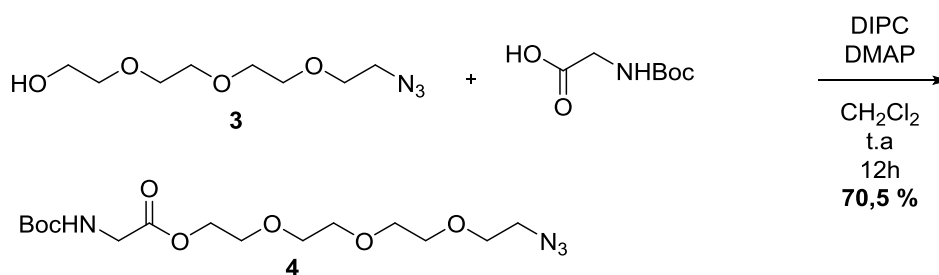
seguidamente sustituido por un grupo azida mediante reacción con azida sódica en etanol, obteniéndose la azida deseada **3** con un excelente rendimiento.



Esquema 2: Síntesis del espaciador polioxigenado **3**

4.1.2 Unión del aminoácido con el espaciador polioxigenado

Como el espaciador polioxigenado consta de un grupo hidroxilo terminal y un grupo azida terminal, a través del grupo hidroxilo se pudo unir de forma eficaz mediante una reacción de esterificación al grupo carboxilo de la glicina protegida con el grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc). La reacción tuvo lugar en diclorometano como disolvente y diisopropil carbodiimida y N,N-dimetilaminopiridina como agentes de acoplamiento. Tras 12 horas de agitación y una purificación por columna cromatográfica, el producto **4** se obtuvo con un rendimiento del 70,5 % (esquema 3).

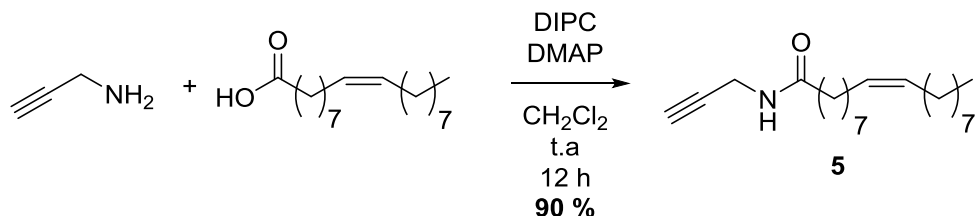


Esquema 3: Unión del aminoácido con el espaciador polioxigenado

4.1.3 Síntesis del derivado alquínico del ácido oleico

La incorporación del alquino terminal al ácido oleico (esquema 4), se llevó a cabo en una sola etapa mediante una reacción de amidación entre la propargilamina y el ácido oleico, ambos reactivos son comerciales y económicamente asequibles. De nuevo, la reacción tuvo lugar en diclorometano como disolvente y diisopropil carbodiimida y

N,N-dimetilaminopiridina como agentes de acoplamiento. Tras 12 horas de agitación y una purificación por columna cromatográfica, el producto **5** se obtuvo con un rendimiento del 90 %.



Esquema 4: Síntesis del derivado alquínico del ácido oleico

4.1.4 Incorporación del derivado del ácido oleico y desprotección del grupo amino

Para llevar a cabo la unión de las dos partes de la molécula objetivo, se optó por hacer uso de la ampliamente conocida “click-chemistry”, dada su gran eficacia y facilidad sintética, así, mediante la cicloadición 1,3-dipolar entre el alquino derivado del ácido oleico **5** y la azida **4** se pudo obtener con un excelente rendimiento sin necesidad de purificación por columna cromatográfica, el precursor de la molécula anfifílica final, es decir, el compuesto **6**. La reacción tuvo lugar en una mezcla de agua y diclorometano como disolventes y ascorbato sódico y sulfato de cobre como inductores de la cicloadición 1,3-dipolar (esquema 5).

En la figura 4 se muestra el espectro de RMN de protón del compuesto **6** en el que se pueden observar todas sus señales características como es el protón del anillo de triazol (*h*) a través del cual se unen los dos fragmentos principales de los que consta el anfífilo.

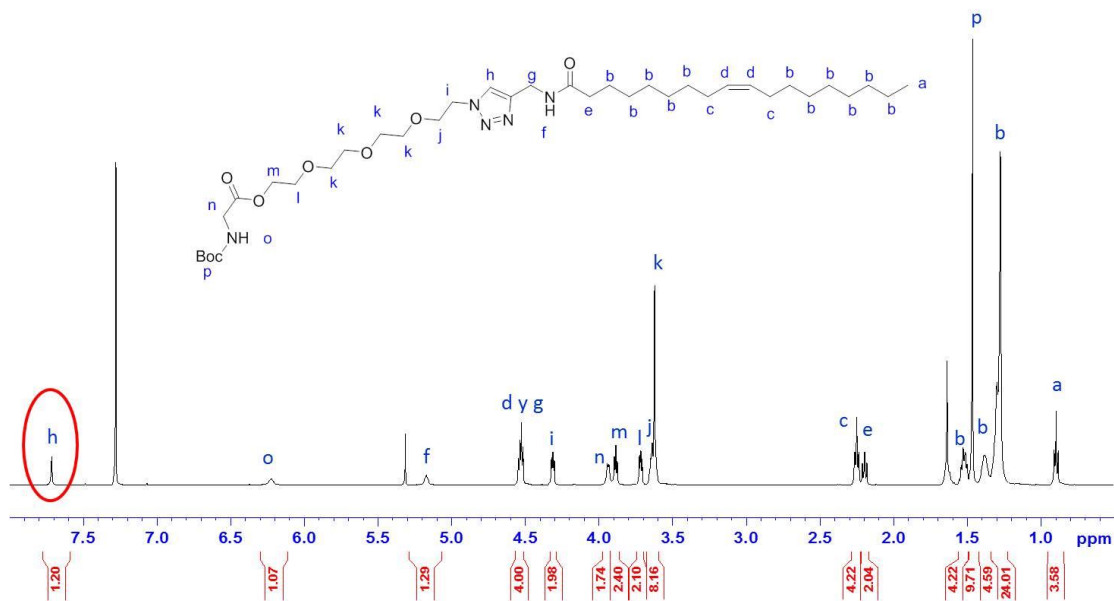
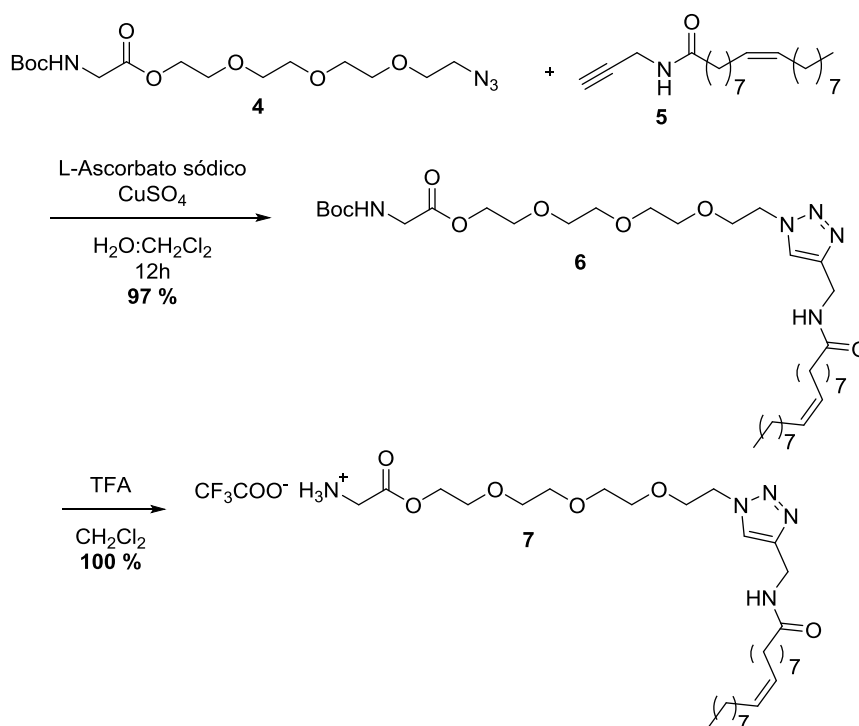


Figura 4: Espectro de RMN de protón del compuesto **6**

Finalmente, una simple desprotección del grupo amino de **6** con ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano a temperatura ambiente condujo con un rendimiento cuantitativo al compuesto anfifílico final **7** (esquema 5).



Esquema 5: Incorporación del derivado del ácido oleico y desprotección del grupo amino

Estos resultados indican que utilizando la metodología descrita en el apartado anterior, en la cual se han llevado a cabo reacciones eficientes, rápidas, seguras, ampliamente conocidas y que transcurren con elevados rendimientos, se ha podido sintetizar el neoaminolípido deseado de forma reproducible muy eficiente y en cantidades fácilmente escalables.

4.2 Formación de los agregados supramoleculares (micelas) en agua y determinación de su tamaño medio por DLS y TEM

Una vez sintetizado el anfífilo biocompatible **7**, se llevaron a cabo experimentos de autoorganización del mismo en agua, para ello, se siguieron procedimientos que previamente habían sido optimizados en el laboratorio donde se realizó este trabajo, entre ellos destaca la determinación de la concentración micelar crítica (CMC), es decir, aquella concentración de anfífilo en agua por debajo de la cual no se pueden formar micelas, que se realizó mediante la técnica conocida como el método del pireno, (Ivanova y cols., 2013) obteniéndose un valor de alrededor de 0,05 mM.

Para la formación de las micelas, se ha trabajado por encima de la CMC, asegurándose así la formación de las mismas y se siguió el siguiente procedimiento estandarizado: en primer lugar se disolvió el compuesto **7** en agua miliQ y la mezcla se sometió a una sonicación fuerte producida por una punta sónica (Sonicador digital por ultrasonidos de 500 Watt, Q500) durante 30 min a una amplitud del 30% (imagen 1), de esta forma, se obtuvieron las micelas.



Imagen 1: Sonicador digital por ultrasonidos de 500 Watt. “Q500”

Esta disolución se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente se sometió a un proceso de microfiltración con jeringa y filtro de membrana de 30 mm para eliminar partículas en suspensión (Interlab Ltd, 2016) (imagen 2).



Imagen 2: Microfiltros y proceso de microfiltración

Finalmente, el tamaño hidrodinámico de las micelas (diámetro medio) se pudo determinar mediante Dispersión de luz dinámica (DLS). La Dispersión de Luz Dinámica (también conocida como espectroscopía de correlación de fotones o dispersión de la luz cuasi-elástica) es una técnica física que se puede utilizar para determinar el perfil de distribución de tamaño de partículas pequeñas en suspensión o de polímeros en disolución. (Berne y cols., 2000). También se puede utilizar para investigar el comportamiento de los fluidos complejos tales como las disoluciones de polímeros concentradas. Cuando la luz llega a las partículas pequeñas, la luz se dispersa en todas las direcciones (dispersión de Rayleigh), siempre y cuando las partículas sean pequeñas comparadas con la longitud de onda (por debajo de 250 nm). Si la fuente de luz es un láser, y por lo tanto es monocromática, la intensidad de dispersión fluctúa con el tiempo. Esta fluctuación es debida al hecho de que las pequeñas moléculas en disolución están experimentando movimiento browniano, por lo que la distancia entre los haces dispersados en disolución está cambiando constantemente con el tiempo. Esta luz dispersada a continuación, se somete a la interferencia ya sea constructiva o destructiva de las partículas circundantes, y dentro de esta fluctuación de intensidad, la información viene definida por la escala de tiempo de movimiento de los haces

dispersados. La preparación de la muestra ya sea por filtración o centrifugación es crítica para eliminar el polvo y los artefactos de la disolución. En tiempos cortos, la correlación es alta debido a que las partículas no tienen la oportunidad de moverse en gran medida desde el estado inicial en el que estaban. Las dos señales son así esencialmente las mismas en comparación después de sólo un intervalo de tiempo muy corto. Cuando los tiempos se hacen más largos, la correlación decae exponencialmente, lo que significa que, después de que haya transcurrido un período de tiempo largo, no existe una correlación entre la intensidad dispersada de los estados inicial y final. Este decaimiento exponencial está relacionado con el movimiento de las partículas y a su vez específicamente con el *coeficiente de difusión*. El DLS se utiliza para caracterizar el tamaño de diversas partículas incluyendo proteínas, polímeros, micelas, hidratos de carbono y nanopartículas. Si el sistema es monodisperso, se puede determinar el diámetro medio de las partículas. Esta medición depende del tamaño del núcleo de la partícula, del tamaño de las estructuras de la superficie de las partículas, de la concentración de las partículas, y del tipo de iones en el medio.

Como con DLS esencialmente se miden las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada por las partículas que se difunden, se puede determinar el coeficiente de difusión de las partículas. El Software de los instrumentos comerciales de DLS, normalmente muestra la población de partículas con diferentes diámetros. Si el sistema es monodisperso, sólo debe haber una población, mientras que un sistema polidisperso mostraría múltiples poblaciones de partículas. También se pueden realizar estudios de estabilidad usando DLS convenientemente. Realizando medidas periódicas de DLS de una muestra se puede observar si las partículas se agregan con el tiempo viendo si el radio hidrodinámico de las partículas aumenta. Si las partículas se han agregado, habrá una mayor población de partículas con un radio mayor. Adicionalmente, en ciertos aparatos de DLS, se puede analizar la estabilidad dependiendo de la temperatura mediante el control de la temperatura *in situ*.

Como se puede observar en las figuras 5 y 6, el tamaño medio de las micelas en disolución es de aproximadamente 23 nm, se observa una segunda población de un tamaño de aproximadamente 322 nm que se debe a la agregación de las micelas en el medio.

Results

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 22,96	Peak 1: 5,055	100,0	1,019
Pdl: 0,841	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,628	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality

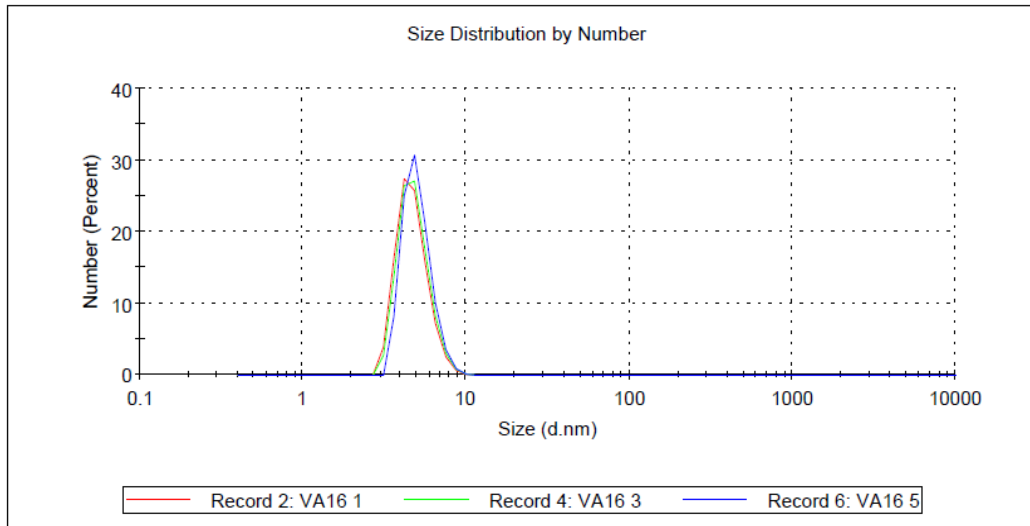


Figura 5: DLS de las micelas, se observa que el tamaño de las micelas es de unos 23 nm

Results

	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 322,0	Peak 1: 529,1	100,0	315,8
Pdl: 0,428	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,163	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality

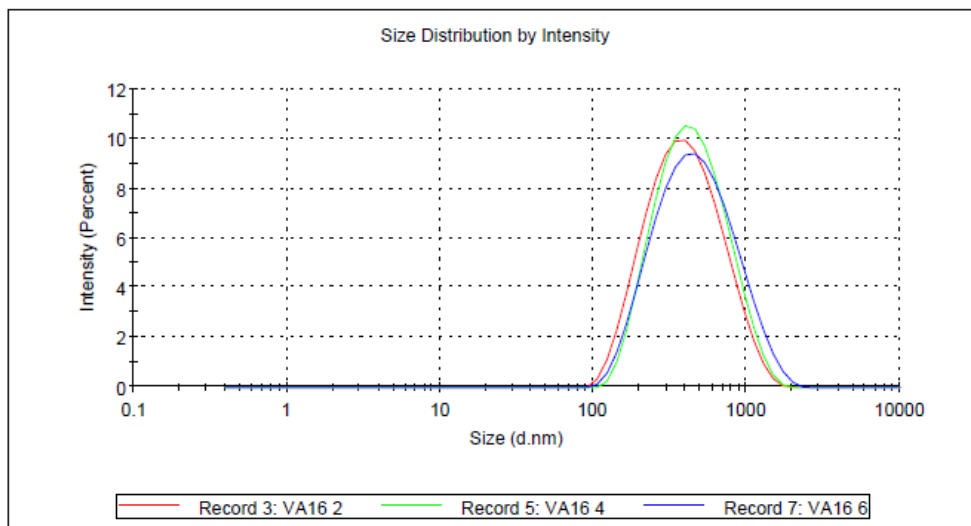


Figura 6: DLS de las micelas, se observa una segunda población de unos 322 nm que corresponde con agregados micelares.

Estos datos sobre el tamaño de las micelas obtenidos por DLS se han podido confirmar mediante la observación de las mismas al microscopio electrónico de transmisión (TEM). Un microscopio electrónico de transmisión es un microscopio que utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces. Debido a que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz visible, pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas.

Las partes principales de un microscopio electrónico de transmisión son:

i. Cañón de electrones, que emite los electrones que chocan o atraviesan la muestra, creando una imagen aumentada.

ii. Lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, ya que las lentes convencionales utilizadas en los microscopios ópticos no funcionan con los electrones.

iii. Sistema de vacío es una parte muy importante del microscopio electrónico.

Debido a que los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, se debe hacer un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características.

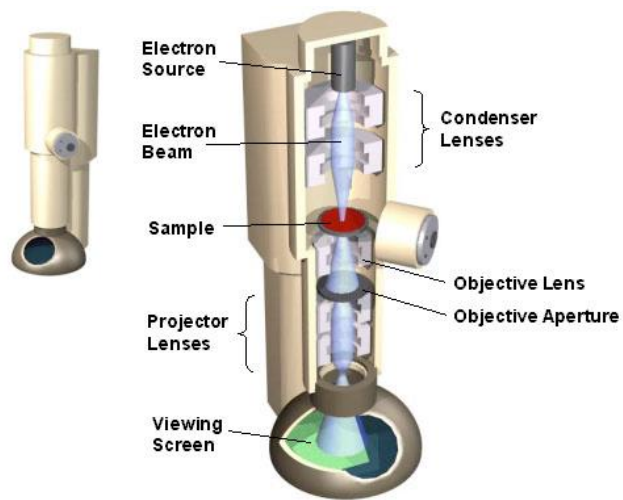
iv. Placa fotográfica o pantalla fluorescente que se coloca detrás del objeto a visualizar para registrar la imagen aumentada.

v. Sistema de registro que muestra la imagen que producen los electrones, que suele ser un ordenador (Imagen 3)

El microscopio electrónico de transmisión emite un haz de electrones dirigido hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra.



a)



b)

Imagen 11: a) Microscopio Electrónico de Transmisión PHILIPS CM-200 (CITIUS).

b) Esquema de un Microscopio Electrónico de Transmisión.

En las fotografías tomadas del TEM (imagen 4) se observan micelas de un tamaño de aproximadamente 10 nm y agregados de unos 100 nm ya que en este caso la medición que se realiza es de las muestras deshidratadas y por lo tanto su radio es menor.

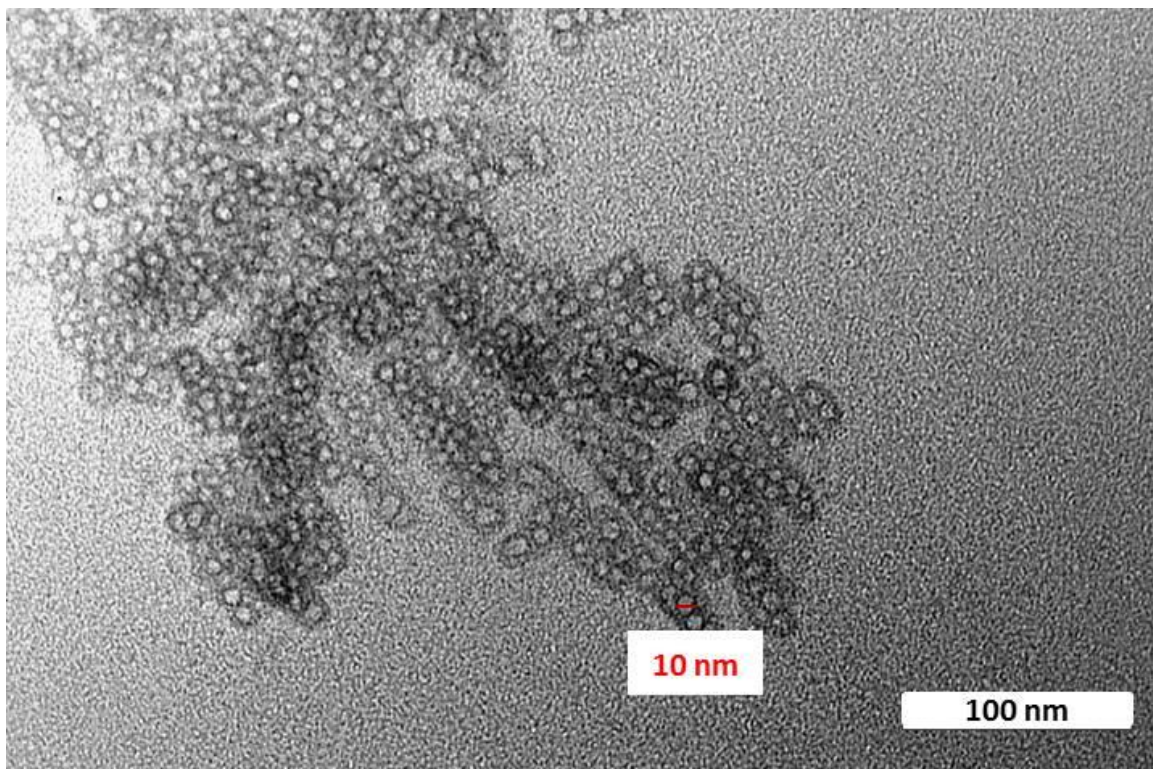


Imagen 4: Fotografía del TEM de una muestra de las micelas (Microscopio CM-200). CITIUS-US

5. Conclusiones

- En primer lugar, se ha llevado a cabo la síntesis del espaciador polioxigenado **3** del neoaminolípido oleico **7** con un balance hidrófilo-hidrófobo adecuado y dos grupos funcionales ortogonales que permiten su unión a diferentes estructuras.

- Mediante una reacción de amidación, se ha conseguido unir de forma eficiente el aminoácido glicina con el grupo amino protegido con Boc al espaciador polioxigenado **3**.

- En tercer lugar, se ha sintetizado mediante otra reacción de amidación el derivado alquínico del ácido oleico **4** responsable de constituir la cola apolar del anfífilo final.

- Mediante una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, se han conseguido unir de forma eficiente las dos partes principales del neoaminolípido oleico de modo que una simple desprotección del grupo amino con TFA ha permitido obtener el compuesto objetivo **7** con elevado rendimiento.

- Posteriormente, se ha llevado a cabo su autoorganización en agua para la formación de sistemas nanométricos como las micelas.

- Se han utilizado técnicas avanzadas como la RMN y la EMAR para caracterizar los precursores y el propio anfífilo biocompatible, así como el DLS (dispersión de luz dinámica) y el TEM (Microscopio Electrónico de Transmisión) para caracterizar los agregados supramoleculares.

- Y por último, en la actualidad, paralelamente a la escritura de esta memoria, se están llevando a cabo experimentos relacionados con la obtención y caracterización de nuevos nanovectores con diferente estructura y características físicas como son los liposomas así como la eficacia de las micelas en el aumento de la biodisponibilidad del Sulforafano, un potente agente anticanceroso cuya síntesis enantioselectiva se ha desarrollado en nuestro grupo de investigación.

6. Bibliografía.

- Anderson, W. F. Human gene therapy. *Nature* **1998**, 392, 25–30.
- Aragón, C., López-Corcuera, B., Structure, function and regulation of glycine transporters. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, 479, 249-262.
- Bartholomaeus, I.; Milan-Lobo, L.; Nicke, A.; Dutertre, S.; Hastrup, H.; Jha, A.; Gether, U.; Sitte, H.H.; Betz, H. Y Eulenburg, V. Glycine transporter dimers: evidence for occurrence in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 10978-10991
- Behr, J. P. Synthetic gene-transfer vectors. *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 274–278.
- Berne, B.J.; Pecora, R. Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics. 3^a Ed. New York: Courier Dover Publications; 2013.
- Blau, W. J.; Fleming, A. J. Designer Nanotubes by Molecular Self-Assembly. *Science* **2004**, 304, 1457.
- Boullanger, P. Topics in Current Chemistry, Vol. 187 1997, Ed. Springer Verlag.
- Bruehl, R. E.; Dasgupta, F.; Katsumoto, T. R.; Tan, J. H.; Bertozzi, C. R.; Spevak, W.; Ahn, D. J.; Rosen, S. D.; Nagy, J. O. Polymerized Liposome Assemblies: Bifunctional Macromolecular Selectin Inhibitors Mimicking Physiological Selectin Ligands. *Biochemistry* **2001**, 40, 5964.
- Cavazzana-Calvo, M.; Hacein-Bey, S.; De.Saint Basile, G.; Gross, F.; Yvon, E.; Nusbaum, P.; Selz, F.; Hue, C.; Certain, S.; Casanova, J. L.; Bousso, P.; Le Deist, F.; Fischer, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **2000**, 288, 669–672.
- Elemans, J. A. A. W.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. Mastering molecular matter. Supramolecular architectures by hierarchical self-assembly. *J. Mater. Chem.* **2003**, 13, 2661.
- Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, 84, 7413–7417.
- Fukushima, S.; Miyata, K.; Nishiyama, N.; Kanayama, N.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. PEGylated Polyplex Micelles from Triblock Cationomers with Spatially Ordered Layering of Condensed pDNA and Buffering Units for Enhanced Intracellular Gene Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2810–2811.

- Gerhardt, W.; Črne, M.; Weck, M. Multifunctionalization of Synthetic Polymer Systems via Self-Assembly. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 6212.
- Gupta, B.; Levchenko, T. S.; Torchilin, V. P. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 637–651.
- Harada, A.; Kawamura, M.; Matsuo, T.; Takahashi, T.; Kono, K. Alkyl Chain Moieties of Polyamidoamine Dendron-Bearing Lipids Influence Their Function as a Nonviral Gene Vector *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1349–1354.
- Horan, N.; Yan, L.; Isobe, H.; Whitesides, G. M.; Kahne, D. Nonstatistical binding of a protein to clustered carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 11782.
- Ivanova, E. A., Maslov, M. A., Kabilova, T. O., Puchkov, P. A., Alekseeva, A. S., Boldyrev, I. A., Vlassov, V. V., Serebrennikova, G. A., Morozova, N. G. & Zenkova, M. A. Structure–transfection activity relationships in a series of novel cationic lipids with heterocyclic head-groups. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7164-7178.
-
- Kiessling, L. L.; Strong, L. E.; Gestwicki, J. E. Principles for Multivalent Ligand Design. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2000**, *35*, 321.
- Kudryashov, V.; Glunz, P. W.; Williams, L. J.; Hintermann, S.; Danishefsky, S. J.; Lloyd, K. O. Toward optimized carbohydrate-based anticancer vaccines: Epitope clustering, carrier structure, and adjuvant all influence antibody responses to Lewis conjugates in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 3264.
- Malhotra, S., Bauer, H., Tschiche, A., Staedtler, A.M., Mohr, A., Calderón, M., Parmar, V.S., Hoeke, L., Sharbati, S., Einspanier, R., Haag, R. Glycine-Terminated Dendritic Amphiphiles for Nonviral Gene Delivery. *Biomacromolecules*, **2012**, *13*, 3087–3098
- Mammen, M.; Choi, S. -K.; Whitesides, G. M. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755.
- Niven, R.; Pearlman, R.; Wedeking, T.; Mackeigan, J.; Noker, P.; Simpson-Herren, L.; Smith, J. G. Biodistribution of radiolabeled lipid-DNA complexes and DNA in mice. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 1292–1299.
- Núñez, E.; Alonso-Torres, P.; Fornés, A.; Aragón, C. Y López-Corcuera, B. The neuronal glycine transporter GLYT2 associates with membrane rafts: functional modulation by lipid environment. *J. Neurochem.* **2008**, *105*, 2080-2090.
- Palermo, V.; Samorì, P.; Molecular Self-Assembly across Multiple Length Scales. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4428.

- Roy, R.; Pagé, D.; Perez, S. F.; Bencomo, V. V. Effect of shape, size and valency of multivalent mannose on their binding properties to phytohemagglutinins. *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 251.
- Verma, I. M.; Somia, N. Gene therapy: promises, problems and prospects. *Nature* **1997**, *389*, 239–242.
- Yang, Z. R.; Wang, H. F.; Zhao, J.; Peng, Y. Y.; Wang, J.; Guinn, B.-A.; Huang, L. Q. Recent developments in the use of adenoviruses and immunotoxins in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **2007**, *14*, 599–615.
- Zhang, X.; McIntosh, T. J.; Grinstaff, M. W. Lipid-mediated DNA and siRNA Transfection Efficiency Depends on Peptide Headgroup. *Biochimie* **2012**, *94*, 42–58.