REVISIÓN

Nanotecnología farmacéutica de los siARN

José Luis Vila Jato

Académico de Número de la RANF.
Recibido el 10 de marzo de 2011.
e-mail: vilajato@vilajato.e.telefonica.net

RESUMEN

El silenciamiento de genes por medio de siARN constituye actualmente una estrategia terapéutica que está siendo evaluada en diversos ensayos clínicos. La presente revisión se centra particularmente en las estrategias no víricas de liberación in vivo de los siARN ya que ello constituye uno de los más importantes problemas a resolver. Por otra parte es necesario comprender la genocompatibilidad/toxicogenética de los sistemas de liberación para poderlos seleccionar adecuadamentede acuerdo con la aplicación terapéutica deseada.

Palabras clave: Pequeños ARN de interferencia; terapia génica; vectores no víricos; polímeros catiónicos; sistemas lipídicos.

ABSTRACT

siRNA pharmaceutical nanotechnology

Gene silencing using small interfering RNA (siRNA) is a technology that is now being evaluated in clinical trials as a potentially novel therapeutic strategy. This article provides an overview of the major pharmaceutical challenges facing siRNA therapeutics, focusing on the non-viral delivery strategies in vivo for synthetic siRNA, as this remains one of the most important issues to be resolved. It is also important to understand the genocompatibility/toxicogenomics of siRNA delivery reagents in terms of their impact on gene-silencing activity and selectivity because this information is essential for the selection of optimally acting siRNA delivery systems for the many proposed applications of RNA interference.

Key words: Small interfering RNA; gene therapy; non-viral vectors; cationic polymers; lipid-based systems.

1. INTRODUCCIÓN

El nuevo milenio se ha iniciado con el genoma humano ya secuenciado, lo que ha propiciado la construcción de nuevas bases de datos sobre las que previsiblemente se apoyará la medicina del futuro. Paralelamente, se han venido descubriendo y analizando con detalle los mecanismos moleculares y celulares de actuación de multitud de productos génicos cuya alteración conduce a la aparición de diferentes enfermedades. Todos estos nuevos conocimientos están revolucionando el desarrollo de sistemas terapéuticos encaminados a desarrollar nuevos tratamientos y mejorar los métodos farmacológicos tradicionales. La Figura 1, en su parte superior, establece cronológicamente los aspectos más sobresalientes de los nanosistemas farmacéuticos para señalar, en la parte inferior, como esos aspectos han influido en la aparición de nanomedicinas en el mercado o en fase de ensayos clínicos.

Dentro de estas nuevas modalidades terapéuticas podemos englobar el empleo de los fármacos basados en material genético. Dicho empleo es la base de lo que tradicionalmente se conoce como terapia génica, que consiste en una técnica terapéutica mediante la cual se inserta un gen funcional en las células de un paciente humano para corregir un defecto genético o para dotar a las células de una nueva función. Dentro de esta denominación también se incluyen la utilización de los pequeños ARN de interferencia (siARN), oligodeoxinucleótidos (ODN) y ribozimas, que se utilizan para suprimir la traducción de un ARN mensajero determinado. De esta manera podemos utilizar la terapia génica como estrategia para inducir la expresión de una proteína con una determinada actividad terapéutica o, por el contrario, suprimir la expresión aberrante de una proteína cuando ésta es el origen de la patología. En mi opinión este último aspecto es el que está suscitando mayor interés, particularmente desde la introducción en terapéutica de los llamados pequeños ARN de interferencia ya que su potencia, comparada con oligonucleótidos, es del orden de 10 a 100 veces mayor.

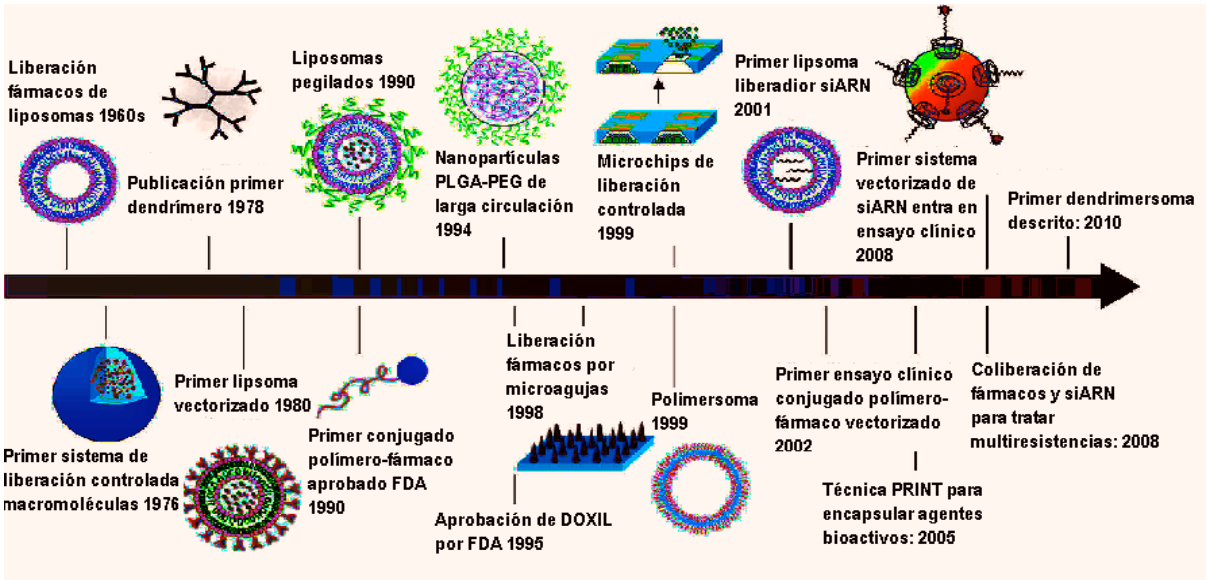

Figura 1. Aspectos más sobresalientes en el desarrollo de la nanotecnología farmacéutica y sus aplicaciones terapéuticas.

Desde su descubrimiento en plantas como un mecanismo de defensa frente a infecciones víricas y, posteriormente en células de mamíferos (1), el uso de los siARN se ha convertido en una poderosa herramienta ya que una degradación específica de m-ARN provoca el silenciamiento de la expresión de genes y sus aplicaciones terapéuticas en diversas patologías como se pone de manifiesto en los diversos ensayos clínicos que se recogen en la Tabla 1.

Otras áreas terapéuticas en fase preclínica son: Hepatitis C (24, 25), terapias antivirales como el silenciamiento de los receptores y correceptores del HIV en el huésped (26-28), tratamientos para enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Huntington (29), Alzheimer (30), etc.

Tabla 1. Ensayos clínicos que se están realizando con diversos siARN (Febrero 2011).

Patología	Referencia
Degeneración macular por edad y diabética	**2-6**
Virus sincitial respiratorio	**7, 8**
Cáncer	**9-16**
Hipercolesterolemia	**17**
Cirugía mayor cardiovascular	**18**
Trasplante renal	**19**
Paquioniquia congénita	**20**
Hepatitis B crónica	**21, 22**
Glaucoma	**23**

Desde el punto de vista regulatorio los fármacos basados en siARN se engloban dentro de la categoría de fármaco (drug) porque presentan una estructura química definida y fácilmente analizables tras su síntesis. Por el contrario, la gran mayoría de productos utilizados en terapia génica, incluyendo plásmidos, se encuadran en la categoría de productos biológicos por lo que su proceso de producción debe garantizar un estricto control de la pureza, potencia y seguridad. Todo ello, unido a la eficacia y especificidad de los siARN, es lo que determina que, a una velocidad sin precedentes, se estén desarrollando nuevas terapéuticas a base de siARN como se demuestra que desde 2001 hasta la actualidad aparezcan en PubMed 7.137 referencias para siRNA therapeutics (dato Febrero 2011).

Tal como se recoge en la Figura 2 la introducción de ARN de doble hebra (dsRNA, del inglés *doublestranded RNA*) en una célula u organismo inicia una compleja cascada de eventos, los cuales culminan con la degradación del ARN mensajero (ARNm) de secuencia homóloga al dsARN originalmente introducido. La primera fase del complejo de señalización es llevada a cabo por una endonucleasa tipo 3 denominada Dicer la cual fragmenta el dsARN en porciones de 21-23 nucleótidos de longitud, los denominados pequeños ARN de interferencia o siRNA

(del inglés *small interfering RNA*). Estos siARN son posteriormente incorporados a un complejo de proteínas denominado RISC (del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*). Este complejo enzimático RISC contiene una helicasa, la cual se encarga de separar las dos hebras del siARN. Posteriormente, la hebra sentido (del inglés *sense strand*) del siRNA es degradada, quedándose unida la hebra antisentido que será la que actúe como guía para seleccionar su diana, es decir, la molécula de ARNm complementario que va a ser degradada. Finalmente la acción endonucleasa de RISC cortará el mARN complementario inhibiendo de este modo su traducción. Otra posibilidad de inhibir la síntesis de un ARNm específico mediante el mecanismo de RNA interferente es utilizar vectores basados en ADN que son capaces de expresar pequeños ARN en forma de horquilla (shRNA, del inglés *small hairpin RNA*) que en el interior celular son procesados a siARN por la enzima Dicer. Sin embargo actualmente se usan los siARN en lugar de las las largas cadenas shARN porque en ciertas patologías (ciertos tipos de tumores), los niveles de Dicer son bajos y ello provoca escasa interferencia, así como un posible aumento de la toxicidad, especialmente a nivel hepático.

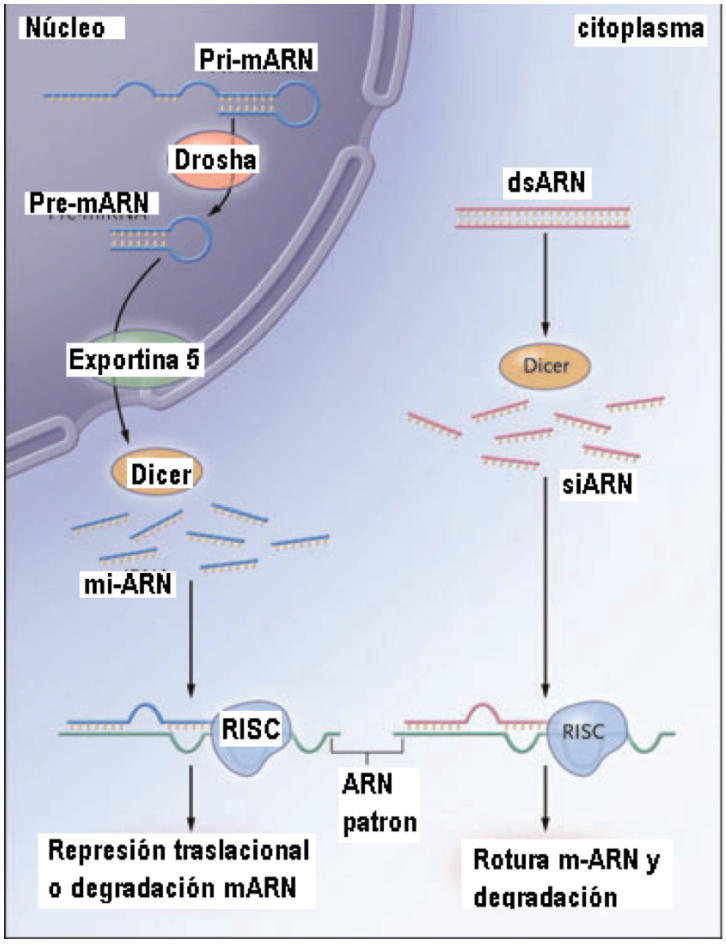

Figura 2. Procesos de interferencia de ARN en células de mamíferos.

Un área clave de investigación en el uso de RNAi en aplicaciones clínicas es el desarrollo de un método de administración seguro (31), que hasta el momento implica sobre todo el uso de sistemas de vectores virales similares a los que se utilizan en terapia génica, aunque también se utilizan otros mecanismos como

aerosoles, si bien éstos han demostrado no tener tanta eficacia. A pesar de la proliferación de estudios en cultivos celulares para medicamentos basados en ARNi, existen algunas preocupaciones en relación a su seguridad, especialmente debido a los posibles efectos off-target (efectos inespecíficos), en los que un gen con una secuencia similar al gen diana es también silenciado. Una fuente primaria de efectos off-target se deriva de la región "semilla" (nucleótidos 2-8) del siARN antisentido, una región crítica para la identificación del gen diana (32-34).

La utilización clínica de los siARN requiere un complejo proceso en el que se pueden diferenciar una serie de etapas clave, tal como se recoge en la Figura 3. El siARN debe ser diseñado de tal forma que sea accesible para el m-ARN diana ya que no todas las secuencias complementarias son efectivas para un determinado m-ARN. Por ello se necesita recurrir a algoritmos computacionales y test empíricos para desarrollar potentes siARN. Los efectos off-targed pueden producirse si existen secuencias homólogas, especialmente en 3´UTR, con otros m-ARN diferentes del diana o bien a través de la estimulación de la respuesta inmune ya que ciertos siARN conteniendo secuencias ricas en GU (por ejemplo UGUGU) estimulan, vía receptores tipo toll (TLRs), la liberación de interferon α, IL-6 y TNF α pero, puesto que no se conocen todos los factores estimulantes de la inmunidad, se necesita realizar test empíricos en el sistema diana para identificar siARN potentes y específicos.

La segunda etapa crítica en la utilización de un siARN es la mejora de su estabilidad química. Los siARN son rápidamente degradados por la acción de nucleasas por lo que su semivida es muy corta (pocos minutos). Es por ello por lo que se necesita realizar modificaciones químicas que pueden afectar a la base nitrogenada o azúcar del siARN y que no solo aumentan su estabilidad química sino también mejoren su captura celular (35-37). Ello se traduce en una estabilidad durante horas y un silenciamiento del gen durante días en conjunción con un sistema de liberación apropiado. Por otra parte, las modificaciones químicas también pueden reducir los efectos off-targed y modificar la estabilidad térmica en varias zonas de secuencias críticas.

Debido a la hidrólisis de la unión fosfodiéster, la protección de grupos 2´hidroxilo es ampliamente utilizada para mejorar la estabilidad de los siARN; estas modificaciones incluyen: 2´O-metil, 2´fluor y 2´ O (metoxietil) (38), tal como se recoge en la Figura 4.

Estas modificaciones pueden ser llevadas a cabo de forma uniforme o bien en combinación de varias de ellas; pueden afectar a varias o a todas las unidades mientras que otras no pueden realizarse en algunas posiciones.

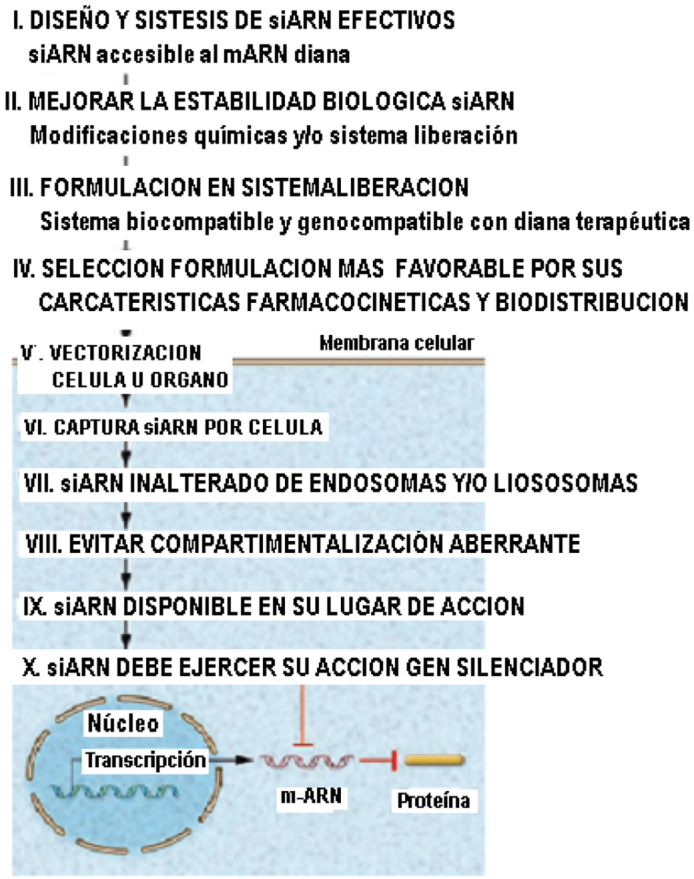

Figura 3. Etapas clave para la utilización clínica de los siARN.

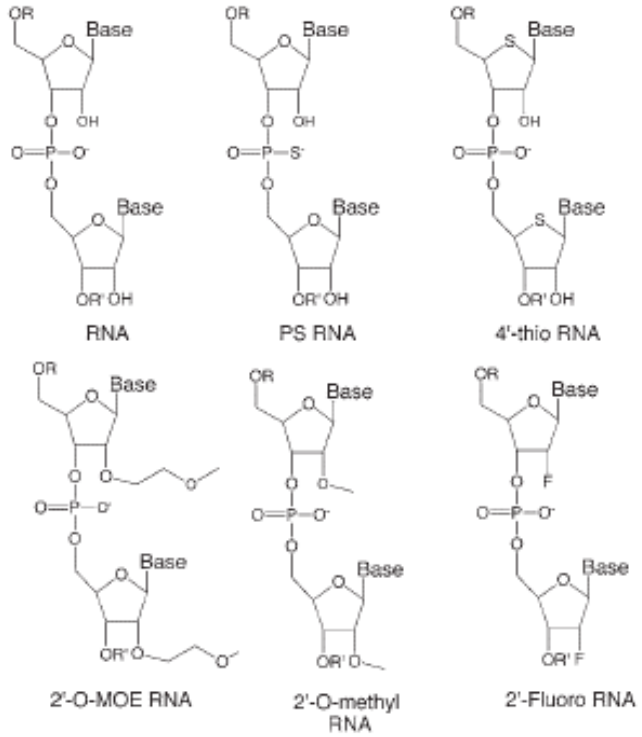

Figura 4. Algunas de las modificaciones químicas realizadas en los siARN.

Uniones fosforotionato: La substitución de un átomo de oxígeno del enlace fosfato por un átomo de azufre da lugar a un enlace fosforotionato (PS). Esta idea ha surgido como consecuencia de haberla utilizado previamente en oligonucleótidos antisentido, entre ellos el Fomivirsen (Vitravene®). Diversos estudios han demostrado que siARN con enlaces fosforotionato siguen manteniendo la capacidad de silenciar secuencias diana (39) pero aquellos con enlaces alternantes en ambas cadenas muestran citotoxicidad lo que parece indicar que existe un límite de enlaces fosforotionato (40).

ARN modificados en 2´: Se han desarrollado muchos ARN análogos en los que el grupo OH en la posición 2´ de la ribosa es substituido por 2-O-metil, 2´-O-metoxietil y 2´fluor. En todos ellos aumenta la estabilidad frente a las nucleasas y se incrementa la afinidad por las secuencias complementarias del ARN. Los grados de substitución varían desde un nucleótido hasta la modificación total de los nucleótidos que constituyen las dos cadenas; igualmente la alternancia de substituyentes 2´-O-metil y 2´F aumentan hasta 500 veces el silenciamiento con respecto al siARN sin modificar (41). Por otra parte la introducción de 2´-O-metilnucleótidos cerca del final de la cadena de ARN que es complementaria del m-ARN diana reduce los efectos off-target lo cual abre un importante camino para reducir los efectos secundarios de los siARN (42).

4´tio: La substitución del O de la ribosa por S da lugar a un aumento en la resistencia frente a las nucleasas y combinando esta substitución con modificaciones en la posición 2´ se produce un incremento de la potencia del siARN (43). Al igual que sucede en los oligonucleótidos antisentido la combinación de derivados 4´tio con nucleotidos PS, en los que aumenta la afinidad por la seroalbúmina y un incremento de su semivida (44), es posible que esta estrategia también pueda aplicarse en los siARN aunque no existen trabajos que avalen experimentalmente este hecho.

Otro tipo de modificaciones químicas se refieren a aquellas realizadas en el nucleótido terminal y que se conocen como siARN conjugados. Tal como se expone en la Figura 5 estas modificaciones se pueden hacer con péptido TAT, o péptidos fusógenos más simples como octaarginina, o penetratina, colesterol, PEG o aptámeros.

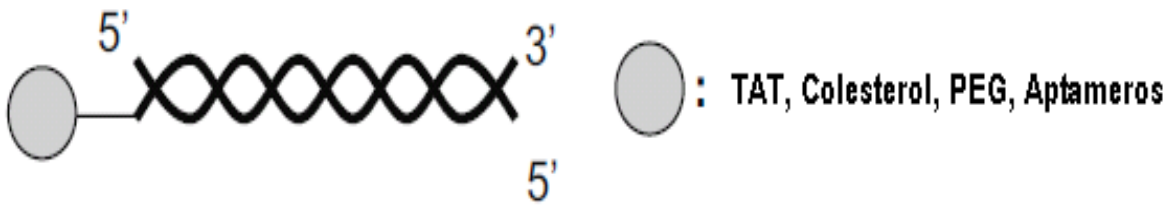

Figura 5. Conjugados de siARN.

La conjugación con el péptido TAT y péptidos fusógenos en siARN modificados permiten una rápida captura por parte de las células (45). Igualmente la conjugación con colesterol en siARN con enlaces fosforotionato y 2´-0-metil dan

lugar a conjugados con estabilidad frente a nucleasas mientras que el colesterol aumenta la unión a la seroalbúmina incrementando la biodistribución a varios órganos como hígado, corazón, riñón, pulmón y tejido adiposo al mismo tiempo que se mejora el paso a través de las membranas biológicas (46). La pegilación de macromoléculas biológicas y de ácidos nucleicos es una tecnología ampliamente utilizada para mejorar la solubilidad o reducir la citotoxicidad y es también utilizada en el caso de siARN. Por ejemplo Kim *y col.* (47) utilizan un siARN conjugado con PEG que interacciona electrostáticamente con PEI originándose expontáneamente micelas que contienen el complejo PEI-siARN en su interior y cadenas de PEG en el exterior. Estas micelas administradas en un modelo de tumor en ratón inhiben la expresión de VEGF sin que se observe, tras su administración i.v. o intratumoral, reacciones inflamatorias.

La conjugación de si ARN con anticuerpos modificados es una técnica utilizada para conseguir una adecuada vectorización pero actualmente se prefiere utilizar aptámeros, no solo porque también se consigue una elevada selectividad y especificidad sino también porque pueden ser sintetizados químicamente. Chu *y col*. dan cuenta de la conjugación de un siARN, con un aptámero específico del antígeno de membrana de células tumorales de próstata, a través de una unión estreptavidina (48); más recientemente, y en esta misma línea, Dassie *y col*. utilizan un complejo del mismo aptámero específico unido a PEG y siARN observando un marcado descenso de los niveles del antígeno (49).

2. NANOSISTEMAS PARA LA LIBERACIÓN DE SIARN

Para un futuro cada vez más próximo los vehículos estarán constituidos por nanopartículas, liposomas o micelas y contendrán, tal como se recoge en la Figura 6, elementos como cadenas de PEG o análogos que permitan una larga semividad del sistema en fluidos biológicos, moléculas capaces de reconocer receptores de la superficie de las células y elementos que favorezcan la internalización del sistema.

La inclusión de siARN en nanovehículos es considerada como la etapa clave para su eficiente utilización. Aunque los vectores virales son altamente eficientes como sistemas de liberación y transfección su uso en la práctica clínica presenta serios problemas. Ello ha dado lugar a un creciente desarrollo de sistemas no virales que permitan solventar los problemas que plantean los siARN derivados de su peso molecular (del orden de 13 kDa) y su fuerte carga aniónica (aproximadamente 40 cargas negativas fosfato) que origina una repulsión electrostática con la carga negativa de la membrana celular por lo que se necesitan sistemas de liberación que faciliten el acceso intracelular y los protejan durante su tráfico intracelular hasta alcanzar su diana. Los nanovehículos utilizados pueden ser liposomas, nanopartículas micelas, dendrímeros, constituidos por lípidos catiónicos (lipoplexes), o péptidos catiónicos penetradores. Todos ellos presentan como característica común el poseer un carácter catiónico lo que permite una interacción iónica con el carácter polianiónico de los siARN. Por otra parte la carga positiva del sistema también facilita su interacción con la carga negativa de las membranas celulares y su transporte a través de ellas vía endocitosis y/o macropinocitosis.

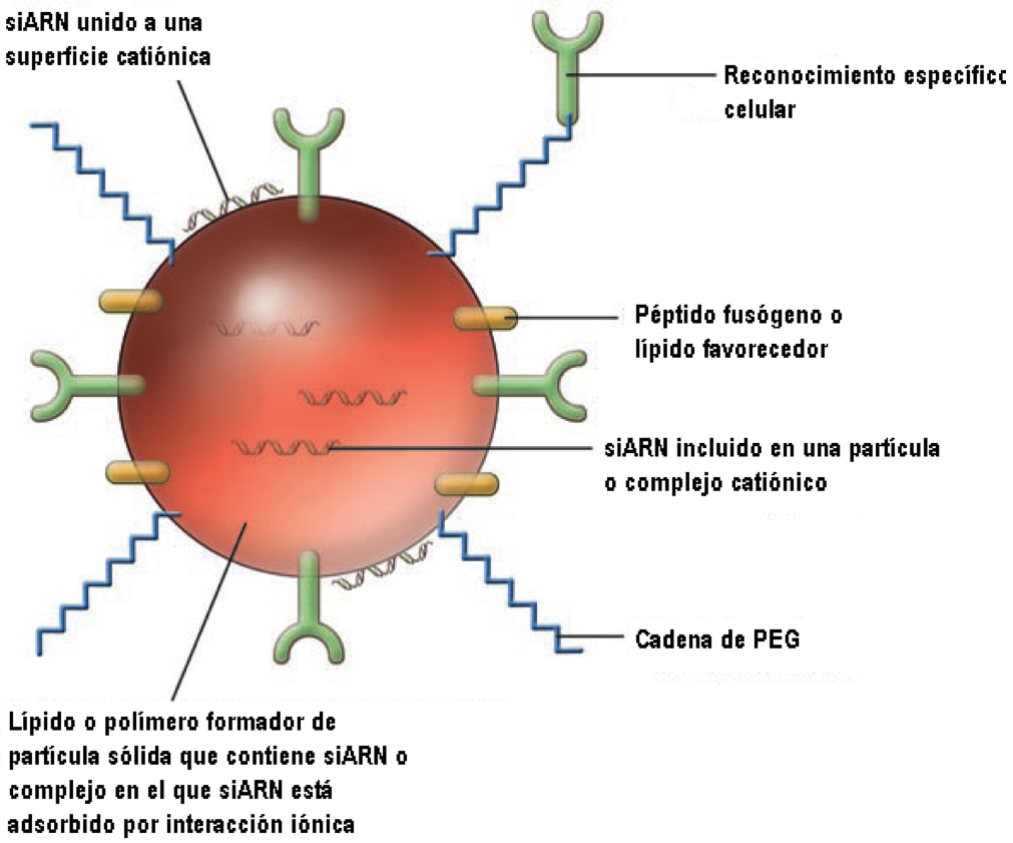

Figura 6. Componentes que forman parte de nanosistemas conteniendo siARN.

La elevada densidad de carga de estos polímeros permite que se unan y condensen con los siARN al mismo tiempo que se liberen de los endosomas por el efecto conocido como "esponja de protones". De todos estos polímeros los más ampliamente utilizados son las polietileniminas (PEI) de diferente peso molecular y ramificación (Figura 7).

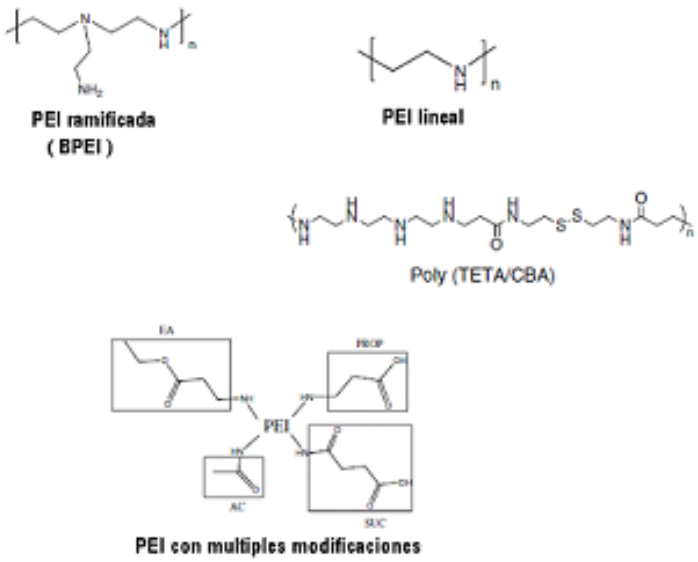

Figura 7. Estructura química de las diferentes PEI y sus modificaciones.

3. POLÍMEROS CATIÓNICOS

Una amplia variedad de polímeros catiónicos, tanto naturales como sintéticos, han sido utilizados (50, 51) si bien su eficacia de transfección sigue estando diversos órdenes de magnitud por debajo de la eficacia de los vectores virales por lo que se están desarrollando diferentes estrategias para conseguir polímeros catiónicos mas eficaces.

Un aspecto que ha sido objeto de numerosos trabajos es el relacionado con el peso molecular del polímero, grado de ramificación, carga de siARN y su efecto sobre la citotoxicidad y eficiencia de transfección. En este sentido Grayson *y col*. (52) han sido los primeros en poner de manifiesto que los mejores resultados se obtienen con PEI ramificada de 25 K, con una relación N/P (nitrógeno de PEI y P del grupo fosfato del siARN) entre 6 y 8 con 200 nM de siARN. Además debe tenerse en cuenta el tamaño de la nanopartícula formada (< 100 nm) así como su potencial z.

PEI ramificadas de elevado peso molecular (25 a 800 kD) muestran una elevada capacidad de transfección pero también una alta citotoxicidad; una aproximación para utilizar PEI ramificadas de bajo peso molecular (800 Da), con baja citotoxicidad, pero con elevada capacidad de transfección consiste en el empleo de PEI reticulados vía enlaces biodegradables. La reticulación puede hacerse con PEG de peso molecular del orden de 2.000 Da habiéndose encontrado buenas capacidades de transfección (53-55).

Otras reticulaciones interesantes son las que se producen entre PEI y ácido oleico o esteárico lo que incrementa la hidrofobicidad del nuevo polímero y una mayor capacidad de condensación del siARN (56) con aminoácidos como la tirosina (57) así como las producidas con ácido succínico o propiónico con los que, manteniendo una elevada capacidad de condensación y de transfección, presentan sin embargo una baja citotoxicidad (58).

Puesto que los siARN actuan a nivel citoplasmático los polímeros reductores con enlaces disulfuro se presentan como una alternativa favorable dada la rapidez con que se liberan los siARN a nivel del citoplasma. Un ejemplo de estos polímeros lo constituye un copolímero de trietilentetramina y cistamina bis acrilamida (TETA/CBA) (59) utilizado para vectorizar un siARN frente a VEGF; la inhibición de este factor ha sido más elevada que la que se obtiene con PEI lineal de 25 kD. Otra formulación en la que se emplean polímeros reductores está constituida por un siARN derivatizado con hexilamina y posteriormente se une covalentemente con succinimidil 3 (2 piridilditio) propionato (SPDP), como agente reticulante, y metoxipolietilenglicol (5.000 Da) con grupos sulfidrilo formándose el complejo siARN-s-s-PEG que por su carácter aniónico se fija a PEI ramificada (25 kD) y da lugar a la formación de un complejo micelar polielectrolítico (60).

Otro polímero catiónico conteniendo ciclodextrinas (Figura 8) es capaz de condensar siARN y dar lugar a nanopartículas de tamaño 50 nm; este polímero constituye la base de la formulación de siARN utilizada en el ensayo clínico para el tratamiento de tumores sólidos (11) la cual está constituida por la ciclodextrina polimérica en cuyas cavidades se aloja adamantano que sirve de enlace para la fijación de cadenas de PEG sobre las que se fija trasferrina realizándose posteriormente la condensación del siARN. El grado de protección que presta frente a la acción de las nucleasas hace innecesario realizar modificaciones

químicas en el siARN al mismo tiempo que se consigue una disminución de los efectos inmunoestimulantes (61). Este mismo tipo de polímero es utilizado para obtener nanopartículas conteniendo camptotecina en una formulación (IT101) que se encuentra en fase preclínica muy avanzada (62).

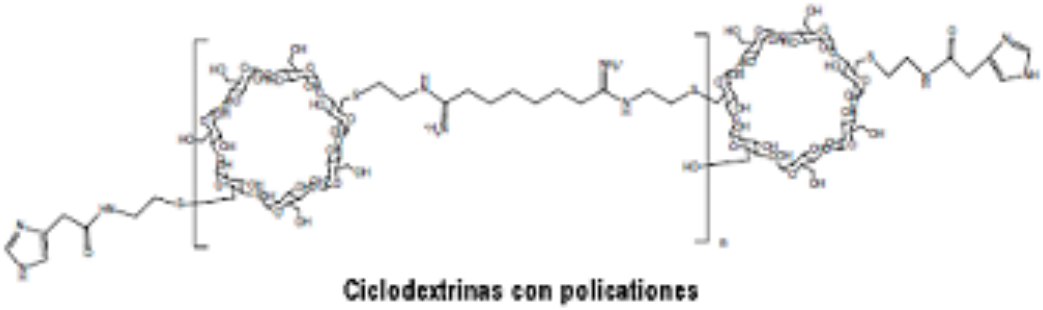

Figura 8. Ciclodextrinas policatiónicas.

Otro polímero catiónico que está siendo objeto de un creciente interés es el quitosano (Figura 9) y sus derivados (63-65) que presentan un carácter biodegradable, bien tolerado, poseer propiedades bioadhesivas asi como aumentar la permeabilidad a través de los epitelios si bien su capacidad de transfección es baja para aplicaciones clínicas. Diversos estudios han puesto de manifiesto que la capacidad de transfección depende de numerosos factores como peso molecular, grado de deacetilación, relación de carga siARN/quitosano, pH, técnica de preparación de las nanopartículas (66). El peso molecular del quitosano tiene una importancia grande tanto en la estabilidad del complejo con siARN como en el tamaño de la partícula formada; según Liu *y col*. (59) el peso molecular óptimo está comprendido entre 65-170 kDa lo que corresponde a 5-10 veces el peso molecular de siARN (13,4 kDa). Conjuntamente con el peso molecular se relaciona el grado de desacetilación del quitosano el cual, para moléculas de siARN debe ser elevado (del orden del 80%) para conseguir un complejo estable.

Figura 9. Obtención del quitosano a partir de la quitina.

El quitosano puede utilizarse en forma de diversas sales como clorhidrato, glutamato, lactato, acetato, etc. Katas y Alpar (67) encuentran una mayor eficiencia de carga y capacidad de transfección utilizando el glutamato.

Finalmente la relación N/P (N: grupos amino del quitosano y P: grupos fosfato de siARN) y el método de preparación tienen importancia en el tamaño de la nanopartícula, estabilidad del siARN así como en su internalización. Según

Howard *y col*. (68) los mejores resultados se obtienen con relaciones entre 50 y 150 mientras que Raviña (69) recomienda utilizar la técnica de gelificación iónica por ser una técnica que permite obtener nanopartículas estables en unas condiciones extremadamente suaves.

Se están realizando numerosas modificaciones en la molécula del quitosano para mejorar su capacidad de transfección; entre estas modificaciones caben destacar el quitosano pegilado (70) del cual puede obtenerse fácilmente nanopartículas por la técnica de gelificación iónica que se recoge en la Figura 10, trimetilquitosano pegilado (70), quitosano-PEI (71) etc. así como mezclas de quitosano pegilado y ácido hialurónico (72).

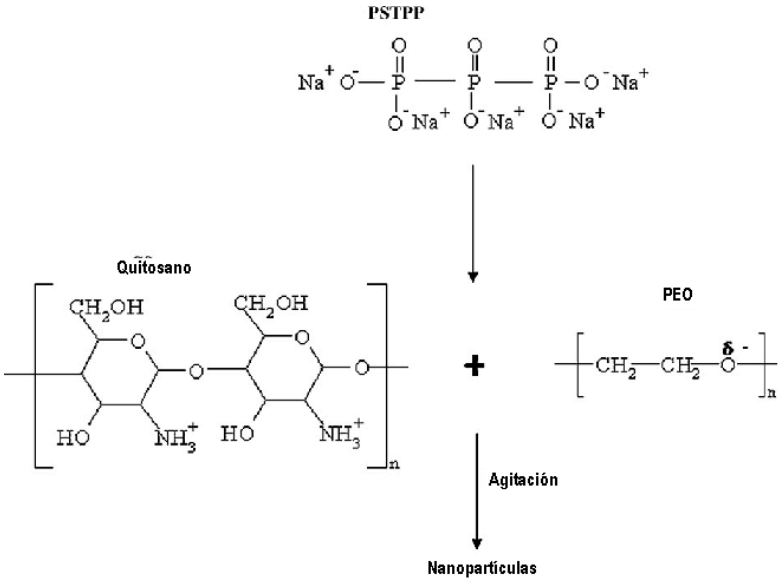

Figura 10. Obtención por gelificación iónica de nanopartículas de quitosano-PEO (PSTPP: Tripolifosfato pentasódico).

Unos pocos estudios han demostrado que el pirofosfato de tiamina (TPP) o la tiamina difosfato (Figura 11) constituyen buenos agentes reticulantes para obtener nanopartículas de quitosano ya que son hidrosolubles y menos tóxicos que el tripolifosfato. Rojanarata *y col*. (73) establecen que los grupos fosfato de TPP forman una sal hidrosoluble con los grupos amino de quitosano protonizados y que éstos complejan con siARN y aumentan su eficiencia de transfección. La eficiencia de los complejos quitosano-TPP/siARN aumenta hasta alcanzar un 70-73% al incrementarse la relación N/P hasta 80 cuando el peso molecular del quitosano está comprendido entre 20 y 45 kDa. Sin embargo, a pesar de los numerosos trabajos realizados, no se han podido establecer las condiciones óptimas de los parámetros: peso molcular, grado de desacetilación, relacion N/P, pH y modificaciones químicas para alcanzar un rango útil en la eficiencia de transfección.

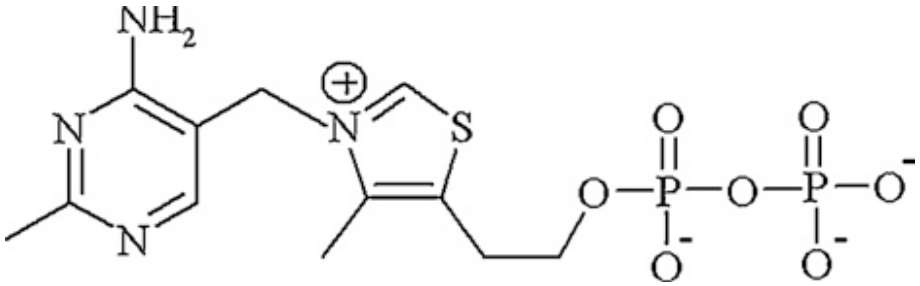

Figura 11. Pirofosfato de tiamina (TPP).

Otra modificación química del quitosano es la propuesta por Ghosn *y col.* (74) consistente en la introducción de grupos imidazol vía carbodiimida (Figura 12). Este sistema presenta un buen escape endosomial, disociación endoplasmática del siARN y buena capacidad de transfección in vitro.

Lee *y col.* (75) proponen la utilización del quitosano unido a restos de alginato o poliguluronato (Figura 13) el cual es biocompatible, no tóxico y puede emplearse como agente de reticulación formando nanopartículas estables obtenidas por coacervación.

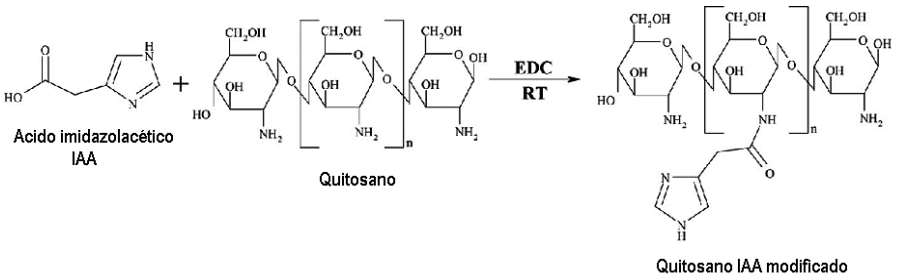

Figura 12. Estructura química del quitosano imidazol acético.

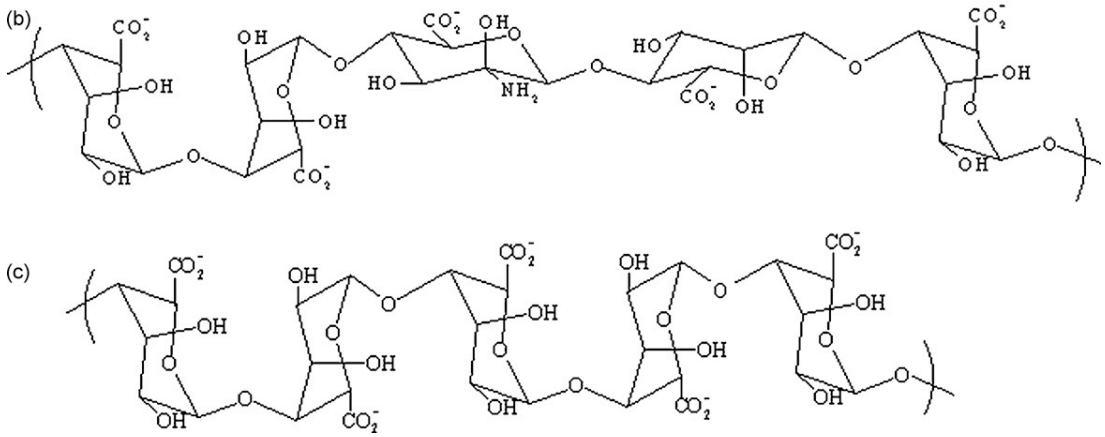

Figura 13. Estructura química del quitosano alginato (b) y quitosano poliguluronato (c).

En el mencionado trabajo se utiliza un quitosano de peso molecular 470 kDa, grado de desacetilación del 86% y alginato de peso molecular 200 kDa.

Jere *y col.* (76) han obtenido un copolímero quitosano-polietilenimina obtenido según se recoge en la Figura 14. El quitosano utilizado tiene un peso molecular de 100 kDa y un grado de desacetilación del 88% mientras que la polietileimina es de bajo peso molecular (1,8 kDa). Con este copolímero se pueden preparar nanopartículas estables de unos 150 nm. Los estudios realizados in vitro en células A549 muestran un silenciamento de la proteína oncogen Akt1.

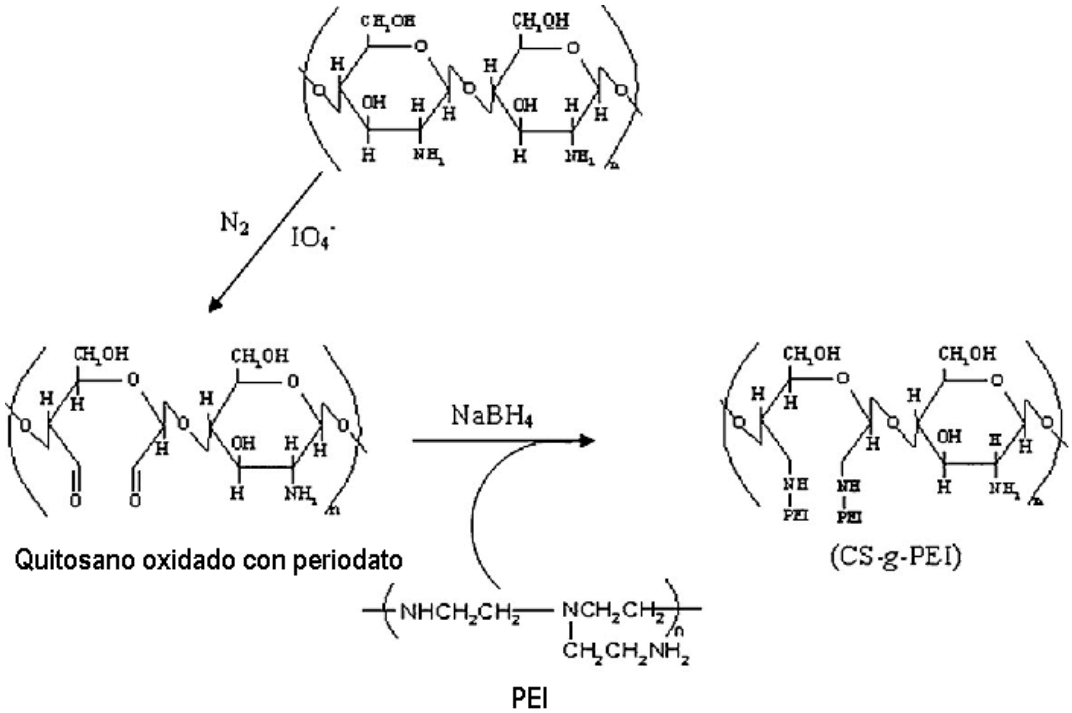

Figura 14. Síntesis del quitosano-Polietilenimina.

Basándose en estos resultados Jiang *y col.* (77) han preparado un copolímero de quitosano polietilenimina al que se le incorpora ácido fólico como vectorización de células cancerosas (Figura 15). Las nanoparículas tienen un tamaño de 80 nm y un potencial z de + 18 mV cuando la relación N/P es de 14. La administración vía pulmonar de estas nanopartículas suprimen la tumorogénesis en ratones con cáncer pulmonar inducido por uretano a través de la proteina Akt1.

De los trabajos publicados se puede concluir que el quitosano y sus derivados constituyen prometedores polímeros para la liberación de siARN por su carácter no tóxico, biodegradables, y poco inmunogénicos. Sin embargo su utilización depende de factores como peso molecular, grado desacetilación, relación quitosano/siARN (N/P), pH, tipo y natureza del derivados o agente utilizado en la reticulación. Un peso molecular bajo conduce a pequeñas nanopartículas (100 nm) y una moderada carga superficial positiva así como una relación N/P alta favorece un eficiente grado de transfección (78).

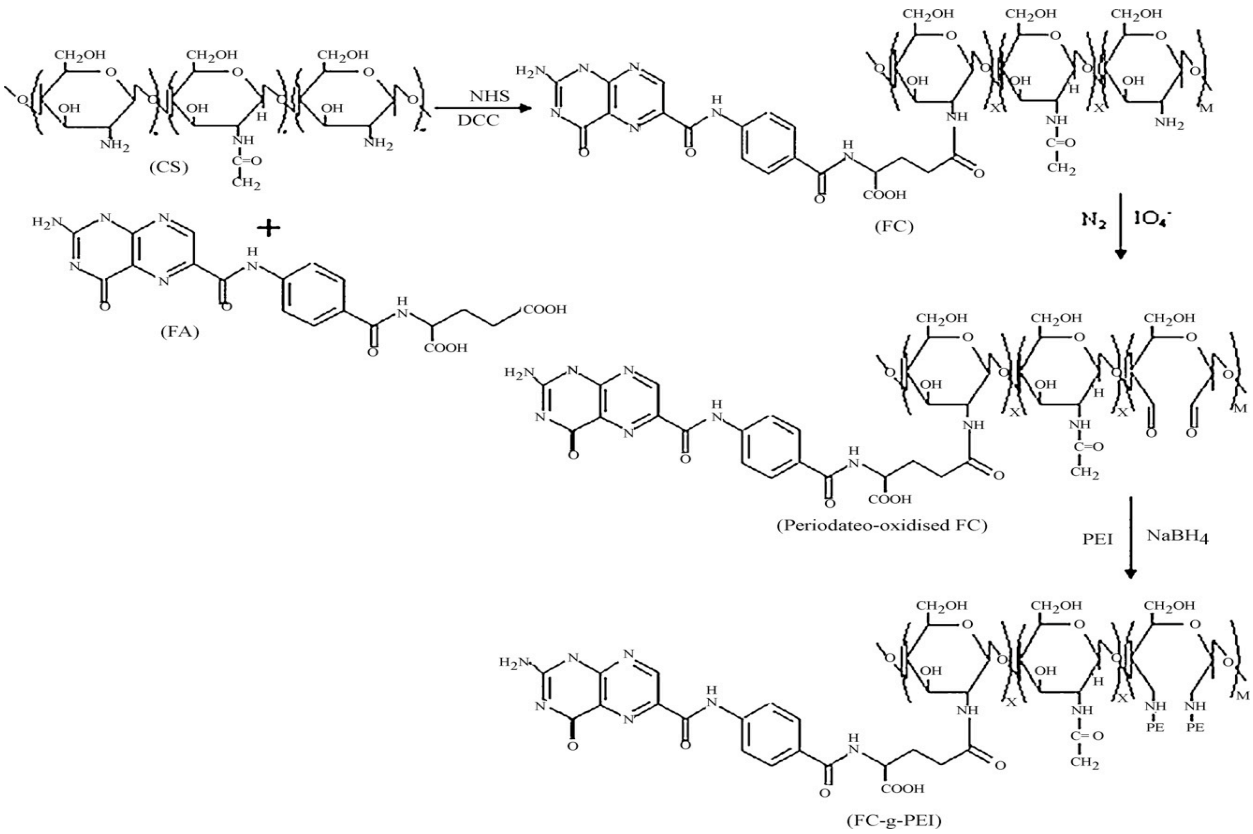

Figura 15. Obtención del quitosano-PEI con ácido fólico.

El atelocolágeno, con un peso molecular de 300 kDa y de carácter catiónico, es un derivado del colágeno tipo I procedente de la dermis de ternero altamente purificado por tratamiento con pepsina. El colágeno posee una secuencia de aminoácidos denominada telopéptido en el N y C terminal que confiere antigenicidad. El tratamiento con pepsina elimina los telopéptidos por lo que el atelocolágeno posee baja inmunogenicidad y clínicamente se emplea como hemostático, prótesis venosas, substitutivo de cartílago óseo, etc. Minakuchi *y col.* (79) dan cuenta de un procedimiento para formar complejos con siARN consistente en disolver el atelocolágeno en PBS pH = 7,4 y mezclar con la solución de siARN, agitando durante 20 minutos a 4 ºC, manteniéndose el complejo a 4 ºC durante 16 horas antes de su utilización. El complejo con siARN es soluble a temperatura ambiente pero por encima de los 30 ºC adquiere la estructura fibrosa, se solidifica y libera lentamente el siARN a medida que se biodegrada el polímero. Estos complejos pueden usarse en forma de solución o bien como nanopartículas con un tamaño entre 100-300 nm siendo preferentemente aplicados en forma local sobre metástasis de próstata (80-82).

Los dendrosomas constituyen unos nuevos vehículos para la liberación de ácidos nucleicos constituidos por un dendrímero y una cubierta lipofílica lo que permite una notable reducción de la toxicidad que presentan los dendrímeros (83, 84).

4. NANOSISTEMAS LIPÍDICOS

Son moléculas anfifílicas constiuidas por una o dos cadenas de ácidos grasos (acil) o alquil, un grupo amino hidrofílico y un enlace entre la región polar y apolar. Algunos de los lípidos catiónicos mas utilizados en terapia génica son: DOSPA (2,3-dioleoiloxi-N-[2(spermincarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propaniminio trifluoroacetato); DOTAP ((N-[1-(2,3-dioleoiloxi)] N-N-N trimetilamonio propano), DDAB (Dimetildioctadecil amonio bromuro), DMRIE (N-(2 hidroxietil)-N,N-dimetil 2,3 bis (tetradeciloxi) 1 propamonio bromuro), TFx-50 [N,N,N´,N´-tetrametil-N,N´-bis(2-hidroxietil)-2,3-di(oleoiloxi)-1,4-butanodiamonio ioduro] y Lipofectamina® un liposoma de formulación 3:1 (w/w) del lípido policatiónico 2,3-dioleiloxi-N-[2(sperminecarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio trifluoroacetato y DOPE. Igualmente se han desarrollado derivados del colesterol como DC-COL (3b [N-(N'-dimetilaminoetil)-carbamoil] colesterol) (85) o bien derivados de cardiolipina, fosfotriésteres de fosfoglicéridos y esfingolípidos (86).

Con objeto de mejorar la capacidad de transfección es muy frecuente utilizar mezclas de lípidos catiónicos y asociarlos a colesterol, al lípido facilitador DOPE (1,2 dioleoilfosfatidiletanolamina) así como a derivados de la espermina: DOGS (dioctadecilamidoglicilespermina) para favorecer la condensación del siARN. Estos lípidos dan lugar a lipoplexes cargados negativamente con ADN y siARN los cuales presentan una elevada transfección in vitro pero in vivo poseen una baja capacidad de transfección de si ARN debido a su estabilidad intracelular. Por otra parte, el pequeño tamaño de estos ácidos nucleicos y las excesivas interacciones electrostáticas creadas con lípidos catiónicos determinan un elevado tamaño del complejo lipoplex y una baja estabilidad que favorece la degradación enzimática o física antes de que tenga lugar la liberación in vivo de si ARN en su célula diana.

La interacción que tiene lugar entre lípidos catiónicos y si ARN da lugar a la formación de lipoplexes de estructura multilamelar con un espesor de aproximadamente 3,7 nm cada bicapa (80) y unos 2 nm de siARN intercalado (87).

El paso de los siARN a través de las membranas celulares puede tener lugar por diversos mecanismos aun no bien identificados. Un estudio realizado con el lípido catiónico DharmaFECT (88) ha demostrado que el lipoplex con siARN penetra en el interior de la célula un 95% por un proceso de endocitosis del cual el 50% aproximadamente es mediada por la proteína clatrina y un 20% por endocitosis en fase fluida.

Xu y Szoka (89) han propuesto que la liberación de ácidos nucleicos con complejos lipídicos catiónicos se ve facilitada por su asociación con lípidos aniónicos de la membrana celular originándose una fusión que favorece la internalización de los ácidos nucleicos (Figura 16).

La liberación de siARN a nivel citosólico puede tener lugar por diversos procesos; uno de ellos es la desestabilización del nanosistema por el que conocemos como bomba de protones que hemos descrito anteriormente en el caso de algunos polímeros. Un fosfolípido pH dependiente es el citraconil-DOPE el cual en condiciones ácidas se degrada y desestabiliza el complejo lipídico-siARN (90). Otro proceso viene condicionado por la utilización de péptidos fusógenos como el

péptido dimérico diINF-7 que se ha revelado con capacidad de incrementar la liberación citosólica de macromoléculas incluidas en inmunoliposomas (91).

La eficacia de los liposomas catiónicos como sistemas de liberación de fármacos presenta diversos problemas debido a su toxicidad e inflamación pulmonar (92, 93) siendo estos efectos mas pronunciados con liposomas catiónicos multivalentes a base de Lipofectamina® que con liposomas catiónicos a base del lípido catiónico monovalente DOTAP.

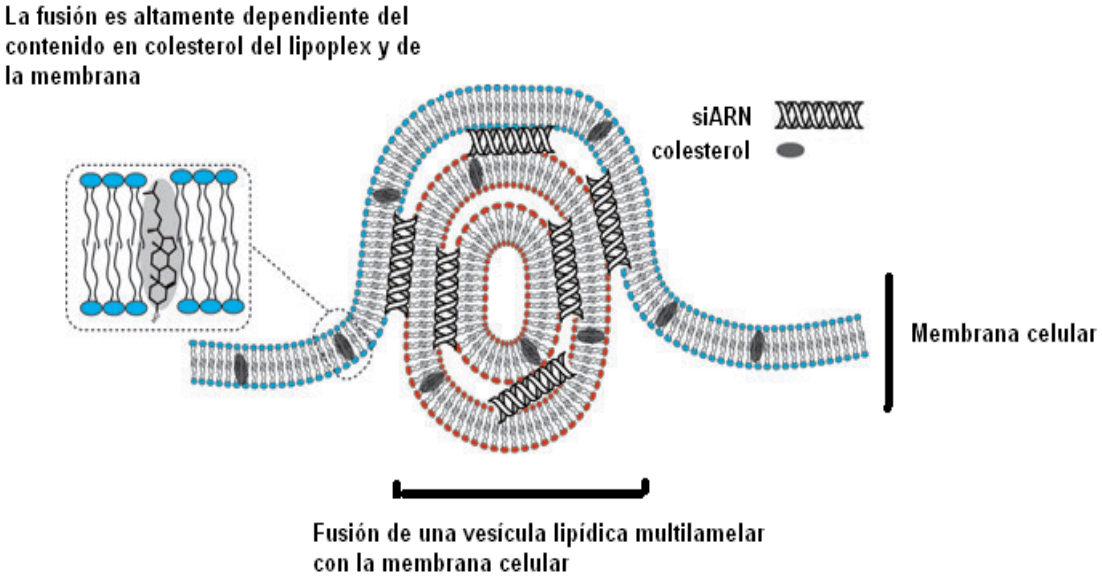

Figura 16. Representación esquemática de la fusión de lipoplexes multilamelares de siARN con la membrana celular.

Basándose en el elevado número de lípidos catiónicos sintetizados y su capacidad de liberación in vivo de ADN, Ren *y col.* (94) han establecido una serie de normas generales que incluyen: 1) 2 cadenas oleicas como restos hidrofóbicos, 2) la longitud de la cadena alquílica entre las dos cadenas oleicas no afecta a la capacidad de transfección y 3) la longitud de la cadena alquílica entre la cadena oleica y el grupo amino hace disminuir la capacidad de transfección.

Un aspecto importante en la composición de los sistemas lipídicos es la presencia de colesterol ya que juega un papel importante en la fusión a nivel de membrana, macropinocitosis y endocitosis por caveolina y fase fluida (88). En lugar de colesterol se han utilizado derivados como el colesteriloxipropano-1-amina (95) con el que se mejora la capacidad de transfección (96).

5. NANOLIPOSOMAS NEUTROS

Uno de los aspectos más relevantes de los nanosistemas para vehiculizar siARN es la utilización de liposomas neutros del tipo 1,2-dioleoleil n-glicero-fosfatidilcolina (DOPC) con un tamaño medio de 65 nm (97). Estos nanoliposomas pueden liberar in vivo a células tumorales de 10 a 30 veces mas siARN que liposomas catiónicos (DOTAP) (98). La administración de 150 μg /Kg.día de siARN 2 veces por semana permite reducir la expresión de genes EphA2, FAK, Neuropilin-2, IL-8 y Bcl-2 así como la reducción del tamaño de diferentes cánceres humanos

en ratones. Estos nanoliposomas no producen toxicidad sobre fibroblastos, médula ósea y células hematopoyéticas por lo que resultan muy atractivos para futuros desarrollos (99).

Además de las formulaciones de liposomas se han desarrollado sistemas lipídicos sólidos. Algunas de estas formulaciones estables, conteniendo ácidos nucleicos (SNALPs: solid nucleic acid lipid particles), están formadas por lípidos catiónicos y fusógenos y han permitido liberar siARN (2,5 mg/Kg) en monos produciéndose una marcada reducción de apoliproteina B durante 11 días. Otras formulaciones son las llamadas nanopartículas lipídicas solidas: SLN (solid lipidic nanoparticles) constituidas por colesterol éster, triglicérido, colesterol, DOPE y DC colesterol.

6. LIPIDOIDES

Recientemente (100) se ha desarrollado, por Anylan Pharm y el MIT, una librería combinatoria de moléculas semejantes a los lípidos, conocidas por el nombre de lipidoides que se utilizan para formar novedosas formulaciones de nanopartículas para la liberación sistemática de productos trerapéuticos de siARN y formados por mas de dos aminas, uniones amida entre las aminas y cadenas carbonadas, más de dos cadenas carbonadas, cadenas carbonadas entre 8 y 12 restos, al menos una amina secundaria. Los resultados de los estudios mostraron una liberación exitosa de formulaciones lipoide de pequeños ARNs de interferencia en varias especies de animales incluyendo ratones, ratas y que demuestran efectos potentes, específicos y duraderos en la expresión de genes en múltiples tejidos, como son el hígado, pulmón y macrófagos peritoneales. Las nanopartículas obtenidas, con un tamaño de 70-100 nm, están formadas por un lipidoide, colesterol y polietilenglicol-ceramida. Entre los diversos lipidoides desarrollados el compuesto más utilizado es el 98N12 (Figura 17).

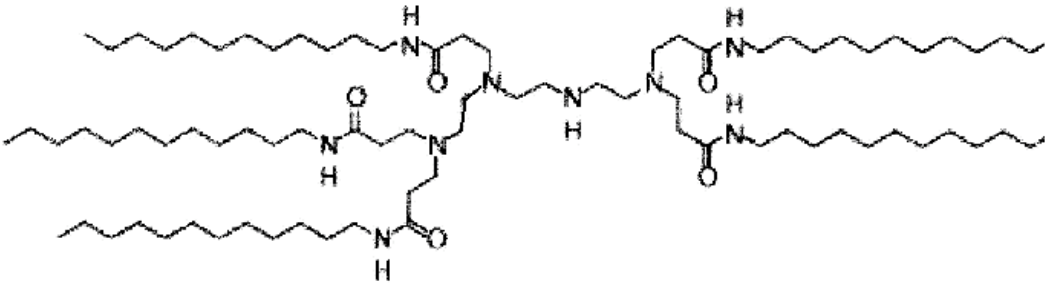

Figura 17. Estructura química del Lipidoide 98N12.

7. EPÍLOGO

Un número de importantes nanovehículos presentan actualmente una importante capacidad de liberación in vivo de siARN. Aunque durante algunos años han sido utilizados siARN en sistemas de uso local, como sistema pulmonar u ocular, sin embargo el empleo de nanoliposomas neutros y nanopartículas de quitosano o dendrosomas permiten utilizar siARN in vivo vía sistémica. Los

parámetros farmacocinéticos, farmacodinámicos y de seguridad están permitiendo desarrollar terapéuticas que pasen a fase clínica para cáncer y otras patologías.

8. REFERENCIAS

1. Fire, *et al.* (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391: 806-811.
2. A Dose Escalation Trial of an Intravitreal Injection of Sirna-027 in Patients With Subfoveal Choroidal Neovascularization (CNV) Secondary to Age-Related Macular Degeneration (AMD). ClinicalTrials.gov.
3. A Study Using Intravitreal Injections of a Small Interfering RNA in Patients With Age-Related Macular Degeneration. ClinicalTrials.gov.
4. Safety and Efficacy Study of Small Interfering RNA Molecule (Cand5) to Treat Diabetic Macular Edema. ClinicalTrials.gov.
5. Safety & Efficacy Study Evaluating the Combination of Bevasiranib & Lucentis Therapy in Wet AMD (CARBON) ClínicalTrials.gov.
6. Safety and efficacy study of small interfering ribonucleic acid (RNA) molecule (Cand5) to treat wet age-related macular degeneration.ClinicalTrials.gov.
7. Durcan, N., Murphy, C. & Cryan, A. (2008) Inhalable siRNA: potent as a therapeutic agent in the lugs. *Molecular Pharm.* 5(4): 559-566.
8. Phase II Clinical Trial of ALN-RSV01 demonstrates statistically significant anti-viral efficacy. Estudio GEMINI: www.alnylam.com.
9. Immunotherapy of melanoma with tumor antigen RNA and small inhibitory RNA transfected autologous dendritic cells. ClinicalTrial.gov.
10. Use of SV40 vectors to treat chronic myeloid leukemia (CML): ClinicalTrials.gov.
11. Safety Study of CALAA-01 to Treat Solid Tumor Cancers: ClinicalTrials.gov.
12. Davies, M. E. (2009) The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. *Mol. Pharm.* 6(3): 659-668.
13. Study with Atu027 in patients with advanced solid cancer. ClinicalTrials.gov.
14. The Role of Aromatic Hydrocarbon Receptor in the Tumorigenesis of Neuroblastoma and Its Relationship With MYCN Expression: ClinicalTrials.gov.
15. Single Dose Study of siG12D LODER (Local Drug EluteR) in Patients With Operable Adenocarcinoma of the Pancreas Phase I - Multiple Dose Study of siG12D LODER (Local Drug EluteR) in Patients With Adenocarcinoma of the Pancreas. ClinicalTrials. gov.
16. The Role of Glycosyltransferases in the Oncogenesis of Neuroblastoma. ClinicalTrials.gov.
17. Study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics (PK), and pharmacodynamics (PD) of liposomal siRNA in subjects with high cholesterol. ClinicalTrials.gov.
18. A dose escalation and safety study of I5NP to prevent AKI in patients undergoing major cardiovascular surgery (QRK.002): ClinicalTrials.gov.
19. I5NP for prophylaxis of delayed graft function in kidney transplantation: ClinicalTrials.gov.
20. Leachman, S. A., Hickerson, R. P., Schwartz, M. E., Bullough, E. E., Hutcherson, S. L., Boucher, K. M., Hansen, C. D., Eliason, M. J., Srivatsa, G. S., Kornbrust, D. J., Smith, F. J., McLean, W. I., Milstone, L. M. & Kaspar, R. L. (2010) First-in-human Mutation-targeted siRNA Phase Ib Trial of an Inherited Skin Disorder. *Mol. Ther*. 18(2): 442-446.
21. NUC B1000: http://www.nucleonicsinc.com/clinical/index.html
22. Chen, Y., Chen, G. & Mahato, R. (2008) RNAi for treating hepatitis B viral infection. *Pharm Res.* 25 (1): 72-86.
23. SYL040012. Tolerance and Effect on Intraocular Pressure in Subjects With Intraocular Pressure (IOP) >= 21 mm Hg. ClincalTrials gov.
24. Ray, R. B. & Kanda, T. (2009) Inhibition of HCV replication by small interfering RNA. *Methods Mol. Bio*. 510: 251-62.
25. Kim, S. I., Shin, D., Lee, H., Ahn, B. Y., Yoon, Y. & Kim, M. (2009) Targeted delivery of siRNA against hepatitis C virus by apolipoprotein A-I-bound cationic liposomes. *J. Hepatol.* 50(3): 479-88.
26. Caldwell, D. J. & Evans J. D. (2008) Developing clinical role of a CCR5 coreceptor antagonist in HIV-1 infection. *Expert Opin. Pharmacother*. 9 (18): 3231-3242.
27. Subramanya, S., Kim, S. S., Manjunath, N. & Shankar, P. (2010) RNA-interference based therapeutics for human inmunodeficiency HIV-1 treatment; synthetic siRNA or vector - based shRNA. *Expert Opin. Biol. Ther*. 10(2): 201-213.

28. Zhou, J., Swiderski, P., Li, H., Zhang, J., Neff, C. P., Akkina, R. & Rossi, J. J. (2009) Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells. *Nucleic Acids Res*. 37(9): 3094-3109.
29. Ross, C. A. & Shoulson, I. (2009) Huntington disease: Pathogeneis, biomarkers and approaches to experimental therapeutics. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15 Suppl 3: S135-138.
30. Tanahashi, H. & Yoshioka, K. (2008) RNA interference silencing of DRAL affects processing of amyloid precursor protein. *Neurosci. Lett*. 439(3): 293-297.
31. Gilmore, I. R., Fox, S. P., Hollins, A. J., Sohail, M. & Akhtar, S. (2004) The design exogenous delivery of siRNA for post-transcriptional gene silencing. *J. Drug Target*. 3: 147-155.
32. Judge, A. D. *et al*. (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate inmune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol*. 23(4): 457-462.
33. Kim, D. H. *et al*. (2004) Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by fago polymerase. *Nat. Biotechnol*. 22(3): 321-325.
34. Hornung, V. *et al*. (2005) Sequence-specific potent induction of IFN alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med*. 11(3): 263-270.
35. Bumcrot, D., Manoharan, M., Koteliansky, V. & Sah, D. W. (2006) RNAi therapeutics: a potential new class of pharnmaceutical drugs. *Nat. Chem. Biol*. 2: 711-719.
36. Jackson, A. L. *et al.* (2006) Position-specific chemical modification of siRNAs reduce off-target transcript silencing. *RNA*. 12: 1197-1205.
37. Reynlds, A. *et al*. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22: 326-330.
38. Akhtar, S. & Benter, I. F. (2007) Nonviral delivery of synthetic siRNA in vivo. *J. Clin. Invst.* 117(12): 3623-3631.
39. Lin, X. *et al*. (2005) siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res.* 33: 4527-4535.
40. Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E. & Prydz, H. (2003) Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res*. 31: 589-595.
41. Morrissey, D. V. *et al*. (2005) Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication. *Hepatology*. 41: 1349-1356.
42. Li, W. & Szoka, F. C. Jr. (2007) Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm. Res*. 24: 438-449.
43. Soutschek, J. *et al*. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 432: 173-178.
44. Birmingham, A. *et al.* (2005) 3´UTR seeds matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat. Methods*. 3: 199-204.
45. Ishihara, T., Goto, M., Kodera, K., Kanazawa, H., Murakami, Y., Mizushima, Y. & Higaki, M. (2009) Intracellular delivery of siRNA by cell-penetrating peptides modified with cationic oligopeptides. *Drug Deliv.* 16(3): 153-159.
46. Soutschek, K. *et al.* (2004) Therapeutics silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNA. *Nature*. 432: 173-178.
47. Kim, S. H., Jeong, H. J., Lee, S. H., Kin, S. W. & Park, T. G. (2008) Local and sytemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolite complex micelles for effective treatment of cancer. *J. Control. Rel.* 129: 107-116.
48. Chu, T. C., Twu, K. Y., Ellington, A. D. & Levy, M. (2006) Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res*. 34: e73.
49. Dassie, J. P., Liu, X. Y., Thomas, G. S., Whitaker, R. M., Thiel, K. W., Stockdale, K. R., Meyerholz, D. K., McCaffrey, A. P., McNamara, J. O. 2nd & Giangrande, P. H. (2009) Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat. Biotechnol*. 27(9): 839-849.
50. Schaffert, D. *et al.* (2008) Gene therapy progress and prospects: Synthetic polymer-based systems. *Gene Ther*. 15: 1131-1138.
51. Fougerolles, A. R. (2008) Delivery vehicles for small interfering RNA in vivo. *Human Gene Ther*. 19: 125-132.
52. Grayson, A. C., Doody, A. M. & Putnam, D. (2006) Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro. *Pharm. Res*. 23: 1868-2876.
53. Merkel, O. M., Librizzi, D., Pfestroff, A., Schurrat, T., Buyens, K., Sanders, N. N., De Smedt, S. C., Béhé, M. & Kissel, T. (2009) Stability of siRNA polyplexes from poly(ethylenimine) and poly(ethylenimine)-g-poly(ethylene glycol) under in vivo conditions: effects on pharmacokinetics and biodistribution measured by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy and

Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) imaging. *J. Control Release*. 138(2): 148-159.

54. Merkel, O. M., Beyerle, A., Librizzi, D., Pfestroff, A., Behr, T. M., Sproat, B., Barth, P. J. & Kissel, T. (2009) Nonviral siRNA delivery to the lung: investigation of PEG-PEI polyplexes and their in vivo performance. *Mol. Pharm*. 6(4): 1246-1260.
55. Alshamsan, A., Haddadi, A., Incani, V., Samuel, J., Lavasanifar, A. & Uludağ, H. (2009) Formulation and delivery of siRNA by oleic acid and stearic acid modified polyethylenimine. *Mol. Pharm*. 6(1): 121-133.
56. Creusat, G. & Zuber, G. (2008) Tyrosine-modified PEI: a novel and highly efficient vector for siRNA delivery in mammalian cells. *Nucleic Acids Symp. Ser (Oxf)*. 52: 91-92.
57. Zintchenko, A., Philipp, A., Dehshahri, A. & Wagner, E. (2008) Simple modifications of branched PEI lead to highly efficient siRNA carriers with low toxicity. *Bioconjug Chem*. (7): 1448-1455.
58. Hoon Jeong, J., Christensen, L. V., Yockman, J. W., Zhong, Z., Engbersen, J. F., Jong Kim, W., Feijen, J. & Wan Kim, S. (2007) Reducible poly(amido ethylenimine) directed to enhance RNA interference. *Biomaterials*. 28(10): 1912-1917.
59. Kim, S. H., Jeong, J. H., Lee, S. H., Kim, S. W. & Park, T. G. (2008) Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolite complex micelles for effective teatment of cancer. *J. Controlled Rel*. 129: 107-116.
60. Heidel, J. D., Yu, Z., Liu, J. Y., Rele, S. M., Liang, Y., Zeidan, R. K., Kornbrust, D. J. & Davis, M. E. (2007) Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104(14): 5715-5721.
61. Davis, M. E. (2009) Design and development of IT-101, a cyclodextrin-containing polymer conjugate of camptothecin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61(13): 1189-1192.
62. Ji, A. M., Su, D., Che, O., Li, W. S., Sun, L., Zhang, Z. Y., Yang, B. & Xu, F. (2009) Functional gene silencing mediated by chitosan/siRNA nanocomplexes. *Nanotechnology*. 20(40): 405103.
63. Andersen, M. Ø., Howard, K. A. & Kjems, J. (2009) RNAi using a chitosan/siRNA nanoparticle system: in vitro and in vivo applications. *Methods Mol. Biol*. 555: 77-86.
64. Gao, S., Dagnaes-Hansen, F., Nielsen, E. J., Wengel, J., Besenbacher, F., Howard, K. A. & Kjems, J. (2009) The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice. *Mol. Ther*. 17(7): 1225-1233.
65. Mao, S., Sun, W. & Kissel, T. (2010) Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv. Drug Del. Rev*. 62: 12-27.
66. Liu, X., Howard, K. A., Dong, M., Andersen, M. O., Rahbek, U. L., Johnsen, M. G., Hansen, O. C., Besenbacher, F. & Kjems, J. (2007) The inflence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*. 28: 1280-1288.
67. Katas, H. & Alpar, H. O. (2006) Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *J. Control. Release.* 115: 216-225.
68. Howard, K. A., Rahbek, U. L., Liu, X., Damgaard, C. K., Glud, S. Z., Andersen, M. Ø., Hovgaard, M. B., Schmitz, A., Nyengaard, J. R., Besenbacher, F. & Kjems, J. (2006) RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol. Ther*. 14: 476-484.
69. Raviña, M. (2009) Diseño de nanosistemas poliméricos para la vehiculización de material genético. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
70. Zhang, Y., Chen, J., Zhang, Y., Pan, Y., Zhao, J., Ren, L., Liao, M., Hu, Z., Kong, L. & Wang, J. (2007) A novel PEGylation of chitosan nanoparticles for gene delivery. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 46: 197-204.
71. Germershaus, O., Mao, S., Sitterberg, J., Bakowsky, U. & Kissel, T. (2008) Gene delivery using chitosan, trimethyl chitosan or polyethylenglycol-graft-trimethyl chitosan block copolymers: establishment of structure-activity relationships in vitro. *J. Control Release*. 125: 145-154.
72. Gao, J. Q., Zhao, Q. Q., Lv, T. F., Shuai, W. P., Zhou, J., Tang, G. P., Liang, W. Q., Tabata, Y. & Hu, Y. L. (2010) Gene-carried chitosan-linked-PEI induced high gene transfection efficiency with low toxicity and significant tumor-suppressive activity. *Int. J. Pharm*. 387(1-2): 286-294.
73. Rojanarata, T., Opanasopit, P., Techaarpornkul, S., Ngawhirunpat, T. & Ruktanonchai, U. (2008) Chitosan-thiamine pyrophosphate as a novel carrier for siRNA delivery. *Pharm. Res*. 25: 2807-2814.

74. Ghosn, B., Singh, A. & Roy, K. (2008) Efficient siRNA delivery by secondary and tertiary amine modified polysaccharides. *NSTI-Nanotech.* 2: 338-341.
75. Lee, D. W., Yun, K.-S., Ban, H.-S., Choe, W., Lee, S. K. & Lee, K. Y. (2009) Preparation and characterization of chitosan/polyguluronate nanoparticles for siRNA delivery. *J. Control Release.* 139: 146-152.
76. Jere, D., Jiang, H.-L., Kim, Y.-K., Arote, R., Choi, Y.-J., Yun, C.-H., Cho, M.-H. & Cho, C.-S.: (2009) Chitosan-graft-polyethylenimine for Akt1 siRNA delivery to lung cancer cells. *Int. J. Pharm*. 378: 194-200.
77. Jiang, H.-L., Xu, C.-X., Kim, Y.-K., Arote, R., Jere, D., Lim, H.-T., Cho, M.-H. & Cho, C.-S. (2009) The suppression of lung tumorigenesis by aerosol-delivered folate-chitosan-graft-polyethylenimine/Akt1 siRNA complexes through the Akt signaling pathway. *Biomaterials*. 30: 5844-5852.
78. Rudzinski, W. E. & Aminabhavi, T. M. (2010) Chitosan as a carrier for targeted delivery of small interfering RNA. *International J. Phar*. 399: 1-11.
79. Minakuchi, Y., Takeshita, F., Kosaka, N., Sasaki, H., Yamamoto, Y., Kouno, M., Honma, K., Nagahara, S., Hanai, K., Sano, A., Kato, T. I., Terada, T. M. & Ochiyal, O. (2004) Atelocollagen-mediated synthetic small interferingRNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Research*. 132: 13 e109.
80. Mu, P., Nagahara, S., Makita, M., Tarumi, Y., Kadomatsu, K. & Takei, Y. (2010) Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. *Int. J. Cancer*. 25(12): 2978-90.
81. Forootan, S. S., Bao, Z. Z., Forootan, F. S., Kamalian, L., Zhang, Y., Bee, A., Foster, C. S. & Ke, Y. (2010) Atelocollagen-delivered siRNA targeting the FABP5 gene as an experimental therapy for prostate cancer in mouse xenografts. *Int. J. Oncol.* 36(1): 69-76.
82. Dutta, T., Narendra, N. K., Nigel, A. J. McMillan, A. J. & Parekh, H. S. (2010) Nanomedicine. *Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 6: 460-470.
83. Dutta, T., Agashe, H. B., Vijayarajkumar, P., Joshi, M. & Jain, N. K. (2006) Dendrosome based gene delivery. *J. Exp. Nanoscience*. 1: 235-248.
84. Gao, H. & Hui, K. M. (2001) Novel series of cationic lipids that can act as efficient gene delivery vehicles through systematic heterocyclic substitution of cholesterol derivatives. *Gene Ther*. 8: 855-863.
85. de Fougerolles, A. R. (2008) Delivery vehicles for small interfering siRNA in vivo. *Human Gen. Ther*. 19: 125-132.
86. Weisman, S., Hirsch-Lerner, D., Barenholz Y. & Talmon, Y. (2004) Nanostruture of cationic lipid-oligonucleotide complexes. *Biophys. J*. 87: 609-614.
87. Radler, J. O., Koltover, I., Saldin, T. & Safinya, C. R. (1997) Structure of DNA-cationic liposomes complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*. 275: 810-814.
88. Lu, J. J., Langer, R. & Chen J. (2009) A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. *Mol. Pharm*. 6: 763-771.
89. Xu, Y. & Szoka, F. C. (1996) Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes issued in cell transfection. *Biochemistry*. 35: 5616-5623.
90. Reddy, J. A. & Low, P. S. (2000) Enhanced folate receptor mediated gene therapy using a novel pH-sensitive lipid formulation. *J. Control Release*. 64: 27-37.
91. Fretz, M. M., Mastrobattista, E, Koning, G. A., Jiskoot, W. & Storm, G. (2005) Strategies for cytosolic delivery of liposomal macromolecules. *Int. J. Pharm*. 298: 305-309.
92. Dokka, S., Toledo, D., Shi, X., Castranova, V. & Rojanasakul, Y. (2000) Oxygen radical-mediated pulmonary toxicity induced by some cationic liposomes. *Pharm. Res.* 17: 521.
93. Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S. & Yan, J. (2006) Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control Release*. 114: 100-109.
94. Ren, T., Song, Y. K., Zhang, G. & Liu, D. (2000) Structural basis of DOTMA for its high intravenous transfection activity in mouse. *Gene Ther*. 7: 764-768.
95. Han, S. E., Kang, H. & Shim, G. Y. (2008) Novel cationic colesterol derivative-based liposomes for serum-enhanced delivery of siRNA. *Int. J. Pharm.* 353: 260-269.
96. Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N. *et al*. (2007) Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol*. 25: 1149-1157.
97. Ozpolat, B., Sood, A.K. & Lopez-Berensteinm G. (2009) Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. *J. Int Med*. 267: 44-53.
98. Gewirtz, A. M. (2007) On future's doorstep: RNA interference and the pharmacopeia of tomorrow. *J. Clin. Invest*. 17: 3612-3614.

99. Pecot, C. V., Calin, G. A., Coleman, R. L., Lopez-Berestein, G. & Sood, A. K. (2011) RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nature Reviews Cancer.* 11: 59-67.
100. Nguyen, D. N., Chen, S. CH., Lu, J., Goldberg, M., Kim, P., Sprague, A., Novobrantseva, T., Sherman, J., Shulga-Morskaya, S., Antonin de Fougerolles, A., Chen, J., Langer, R. & Anderson, D. G. (2009) Drug Delivery–mediated Control of RNA Immunostimulation. *Molecular Therapy.* 17: 1555-1562.