

Funcionalización de poloxámeros con aminos para la
compartimentalización de plásmidos en vehículos para la posible
transferencia de genes *in vitro*

MIGUEL PALOMINO ANGELES

Candidato a nivel de doctorado

Directores

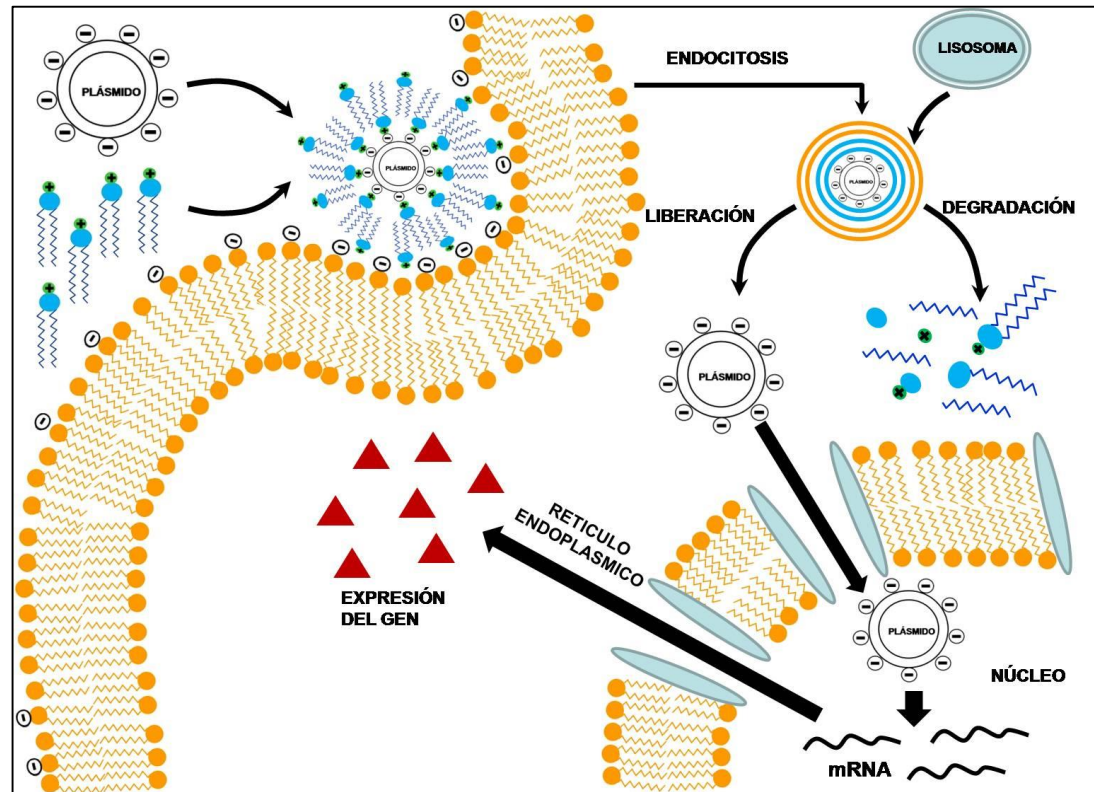
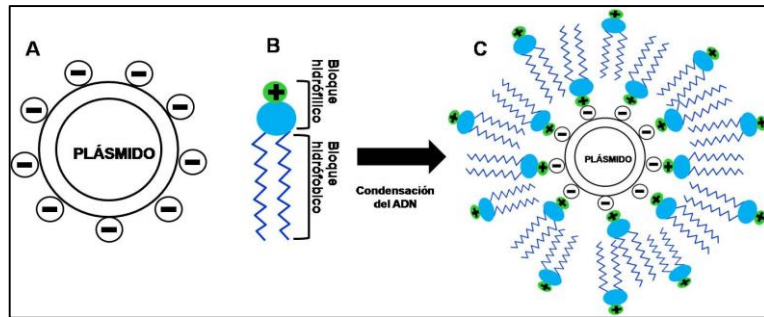
DR. HIRAM ISAAC BELTRÁN CONDE

DRA. LETICIA ARREGUI MENA

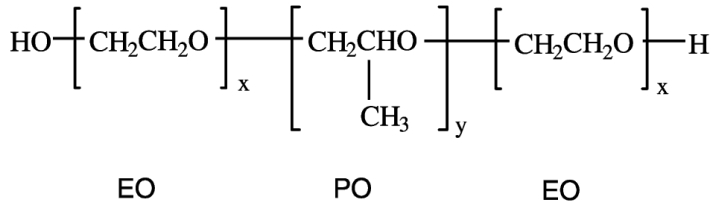
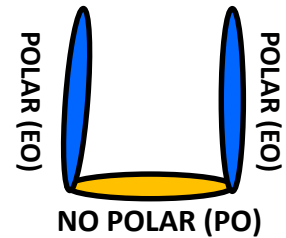
TERAPIA GÉNICA

Puede ser definida de manera amplia como la transferencia de material genético (ADN o ARN) con la finalidad de curar una enfermedad o por lo menos mejorar el estatus clínico de un paciente (Akhtar *et al.*, 2011).

VEHÍCULOS LIPOSOMALES



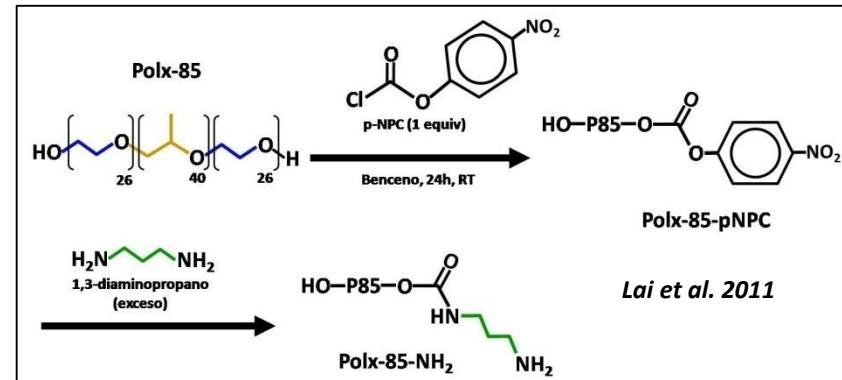
POLOXÁMEROS



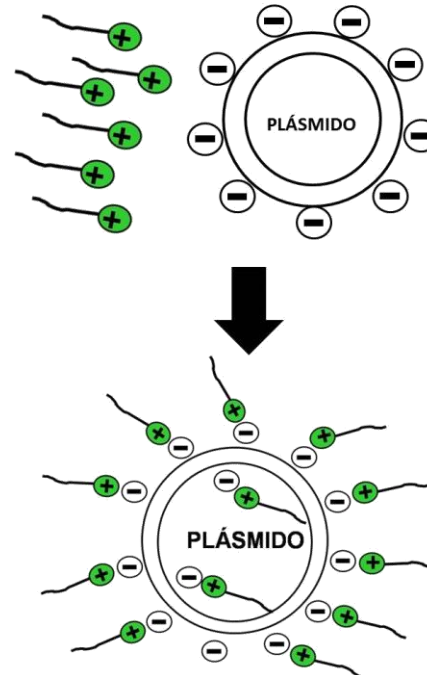
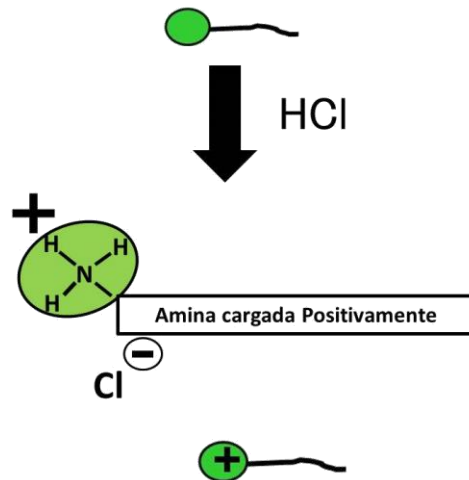
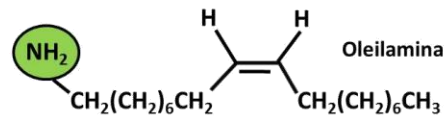
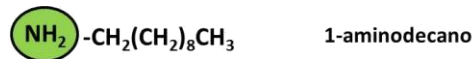
Pluronic L61	EO ₂ -PO ₃₀ -EO ₂	MW = 1950
Pluronic P85	EO ₂₆ -PO ₄₀ -EO ₂₆	MW = 4600
Pluronic F127	EO ₁₀₀ -PO ₆₅ -EO ₁₀₀	MW = 12600

Hydrophobicity
increases
(HLB decreases)

Kabanov et al. 2002



El vehículo ayudo a la transfección y la expresión del plásmido
Luc en líneas celulares de cáncer



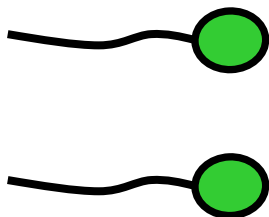
HIPÓTESIS

Si se funcionalizan moléculas de poloxámero con terminales de amina, entonces estos compuestos modificados son mejores moléculas para encapsular, transportar y transfectar plásmidos, debido a que promueven un balance adecuado de interacciones de i) carga, ii) hidrofóbicas e iii) hidrofílicas necesarias para vehiculizar el material genético.

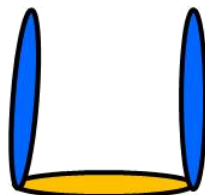
OBJETIVO GENERAL

Obtener y caracterizar fisicoquímica/espectroscópicamente vehículos ensamblados entre poloxámeros funcionalizados con amina y el plásmido de la proteína verde fluorescente y finalmente evaluar la eficiencia de la transferencia del plásmido *in vitro*.

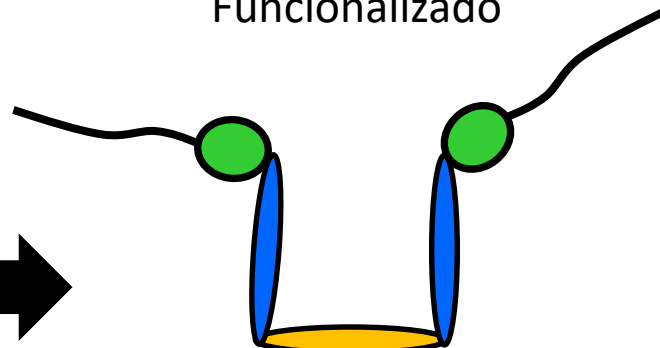
Oleilamina
1-aminodecano
u otras aminas



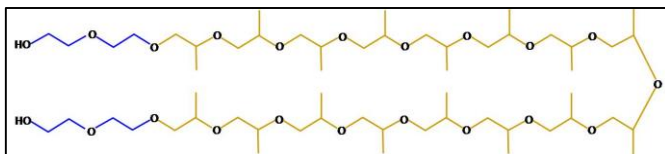
Poloxámero



Poloxámero
Funcionalizado



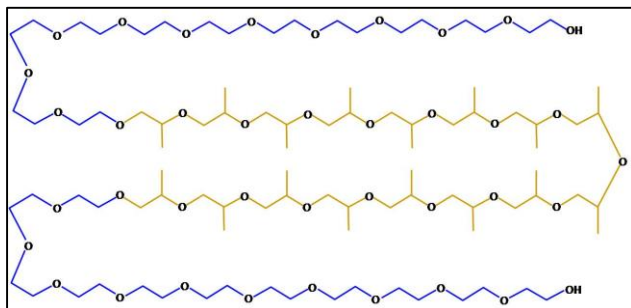
Poloxámero
L31
 $\text{EO}_2\text{-PO}_{16}\text{-EO}_2$



Peso Molecular 1100 g/Mol

Hidrofóbico

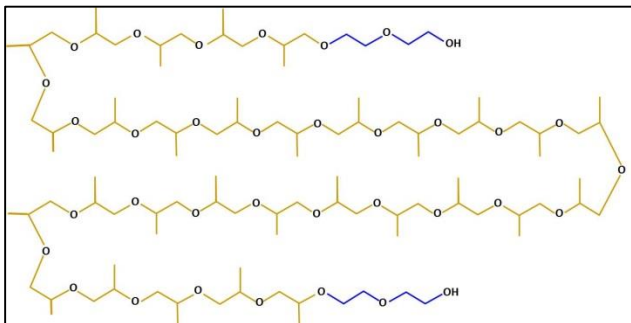
Poloxámero
L35
 $\text{EO}_{11}\text{-PO}_{16}\text{-EO}_{11}$



Peso Molecular 1916 g/Mol

Hidrofílico

Poloxámero
L61
 $\text{EO}_2\text{-PO}_{30}\text{-EO}_2$

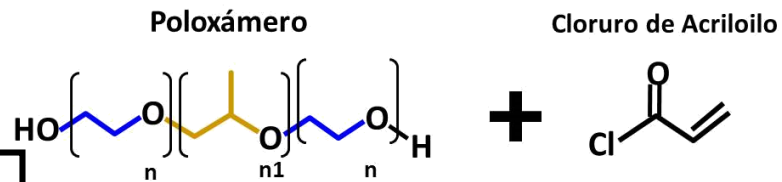


Peso Molecular 2000 g/Mol

Hidrofóbico

CONSTRUCCIÓN DE VEHÍCULOS

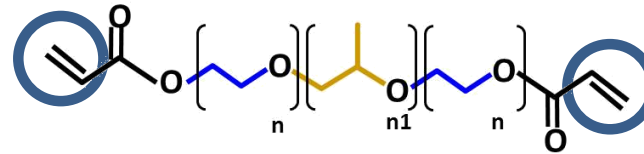
ESTRATEGIA DE FUNCIONALIZACIÓN PASO UNO



Temp.
Ambiente

CH_2Cl_2

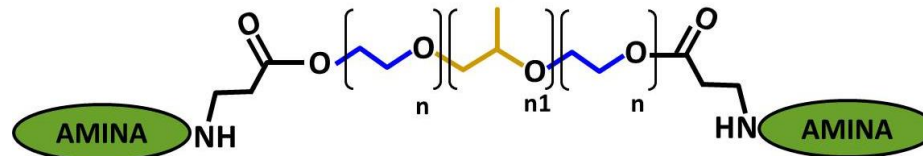
Protocolo modificado
de Zhang et al 2013

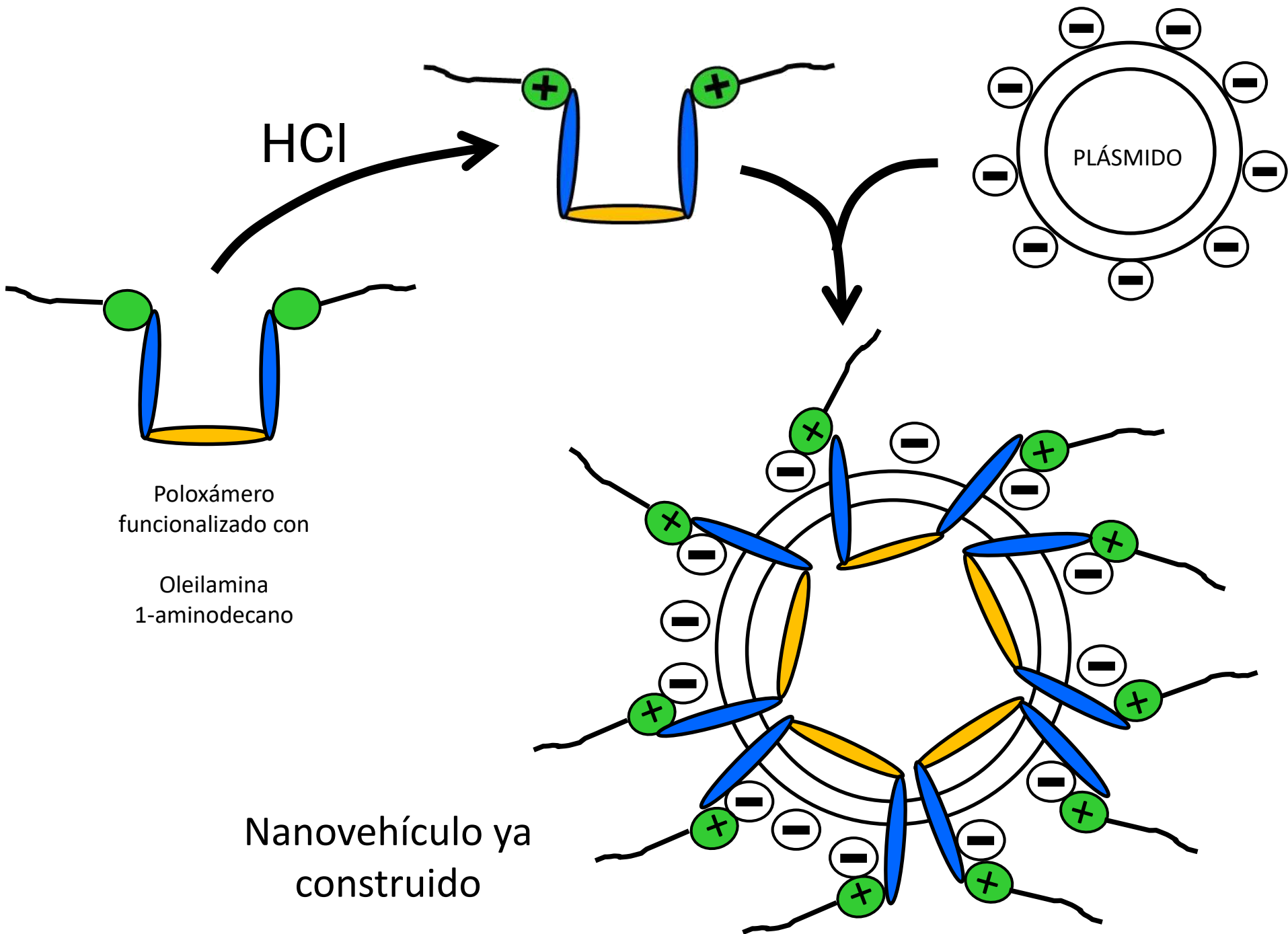


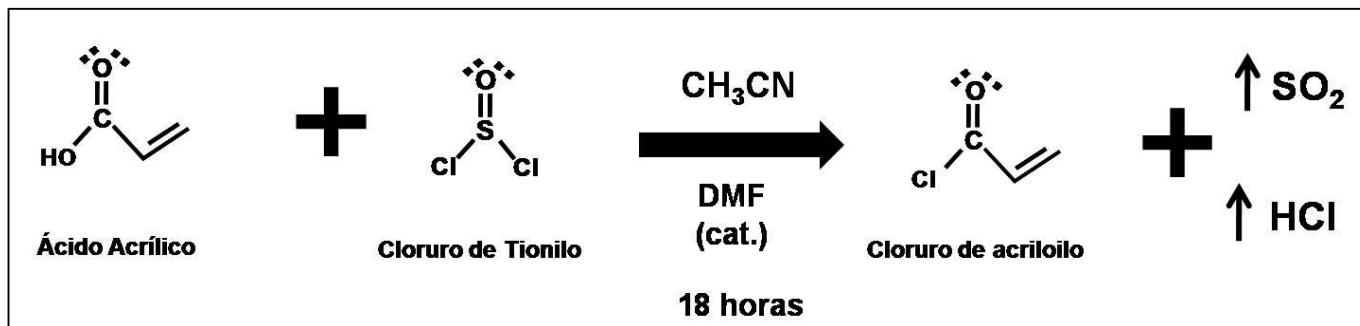
Poloxámero diacrilatado

ESTRATEGIA DE FUNCIONALIZACIÓN PASO DOS

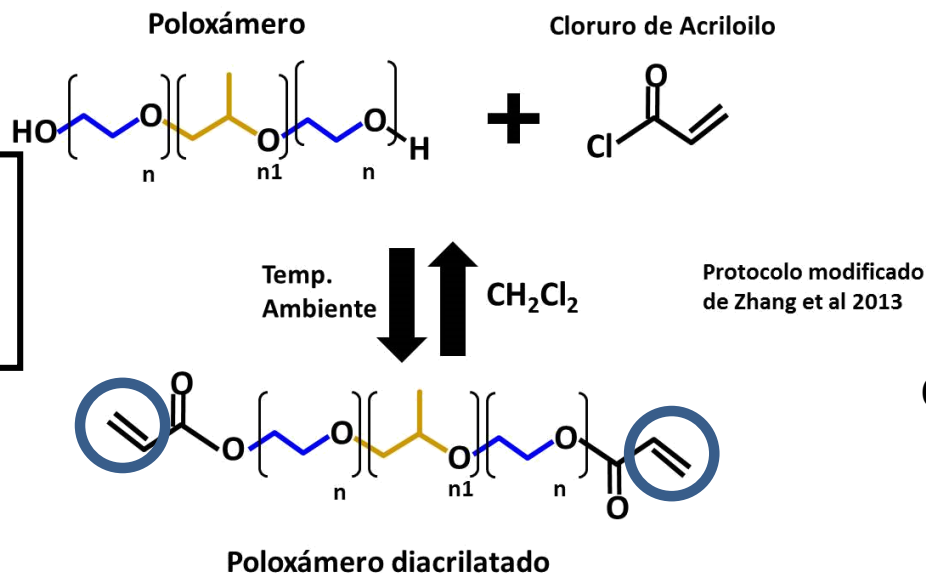
1-Aminodecano
Amino-etil-amino-etanol
Etanolamina







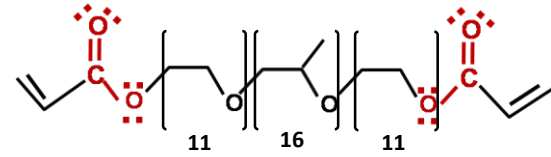
ESTRATEGIA DE FUNCIONALIZACIÓN PASO UNO



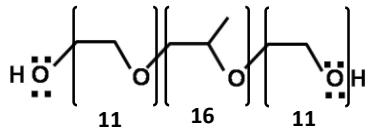
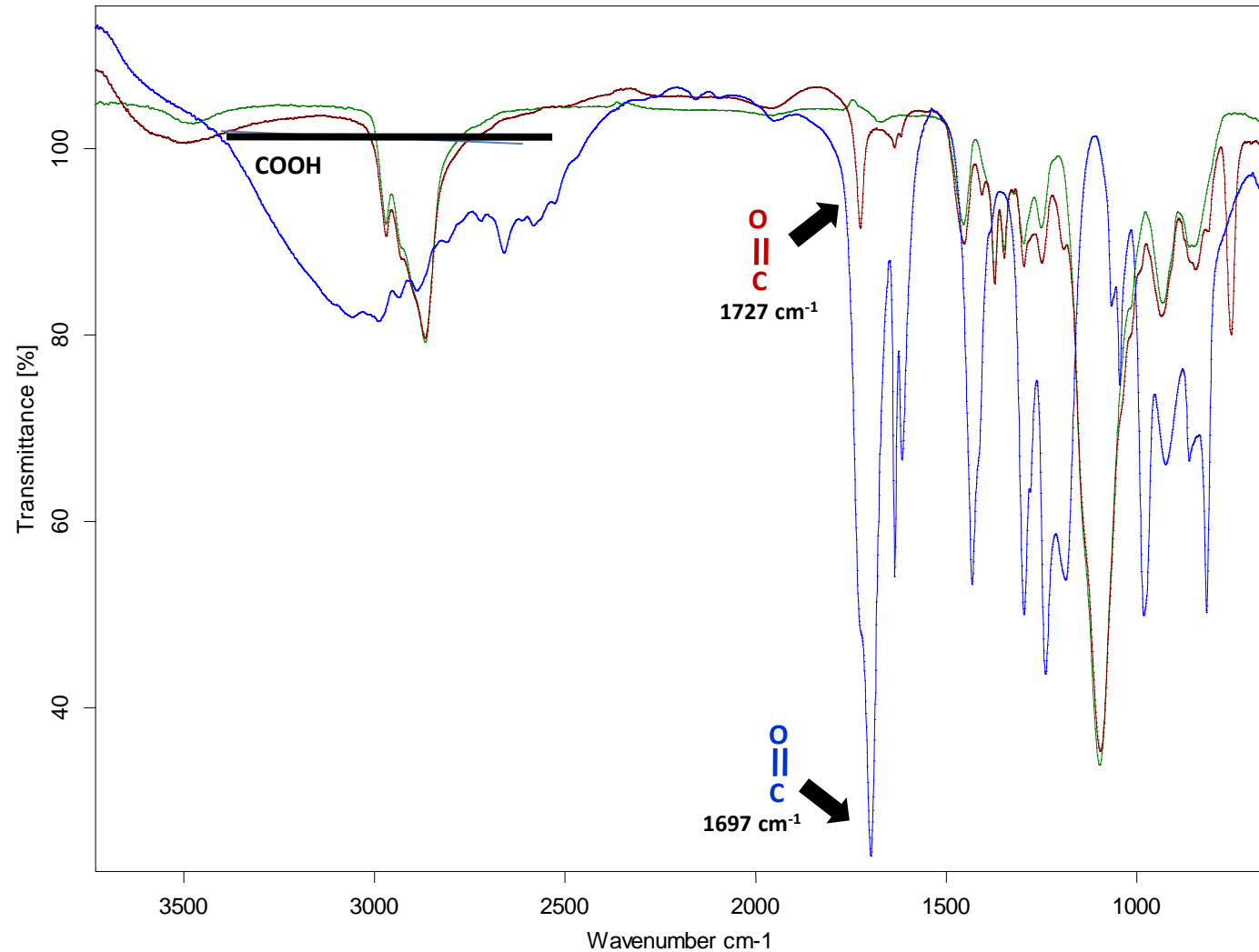
CARACTERIZACIÓN
 RMN ^1H , ^{13}C , 2D
 FTIR, TGA

Poloxámero Di-Acrlatado	Peso Molecular Poloxámero	Mol de cloruro de acrilóilo usado en la reacción
Acry_L31_Acry	1100 g/mol	8 Mol
Acry_L35_Acry	1916 g/mol	10 Mol
Acry_L61_Acry	2000 g/mol	10 Mol

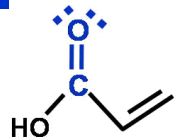
POLOXÁMERO L35 DI-ACRILATADO



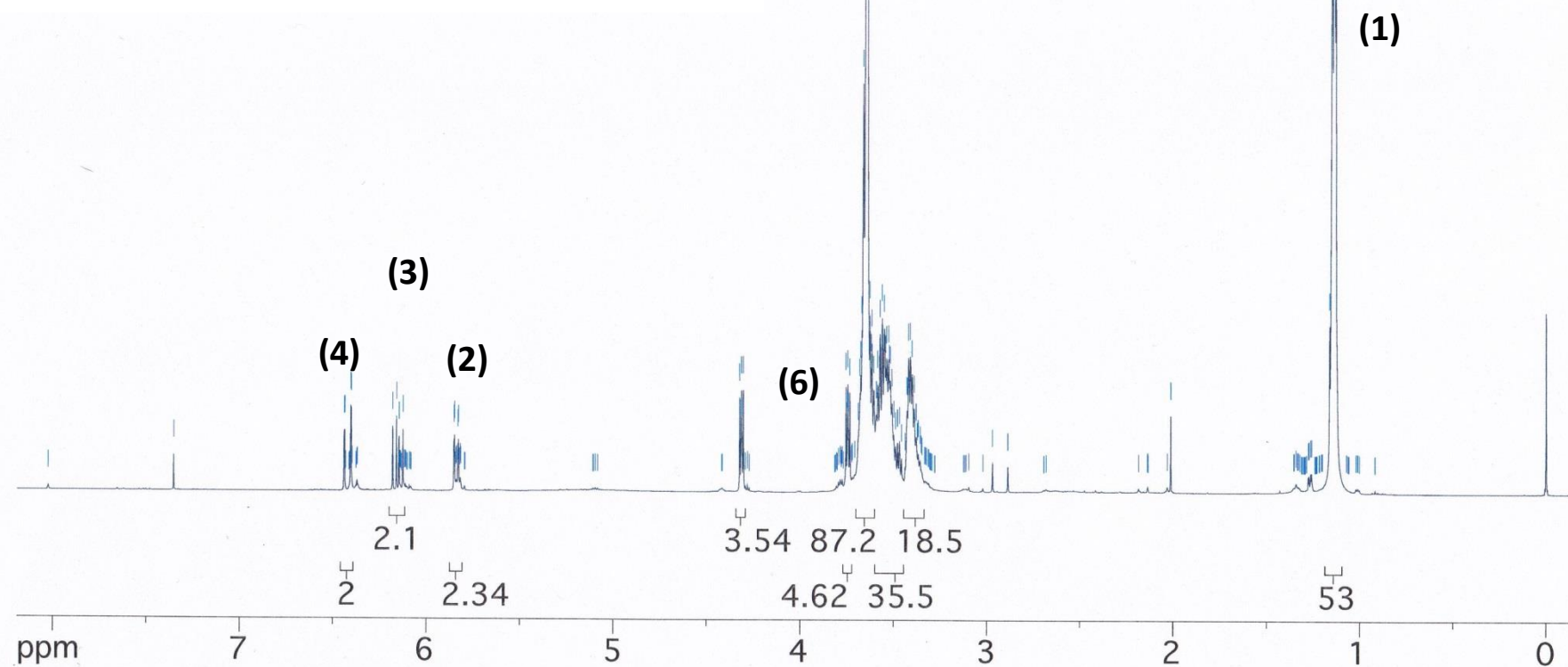
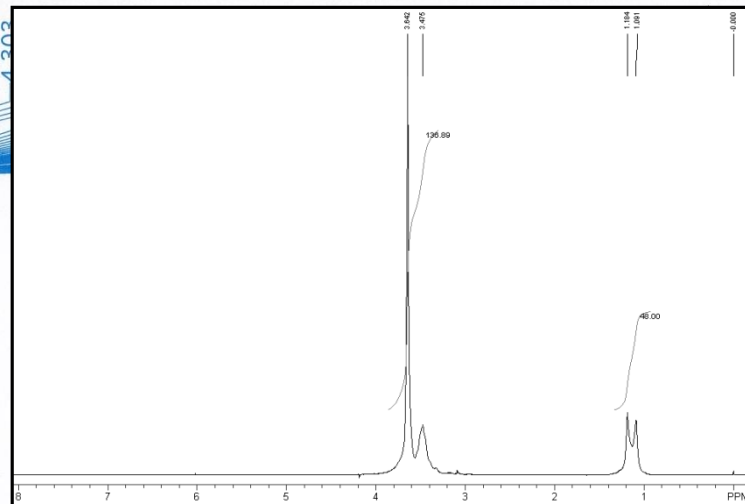
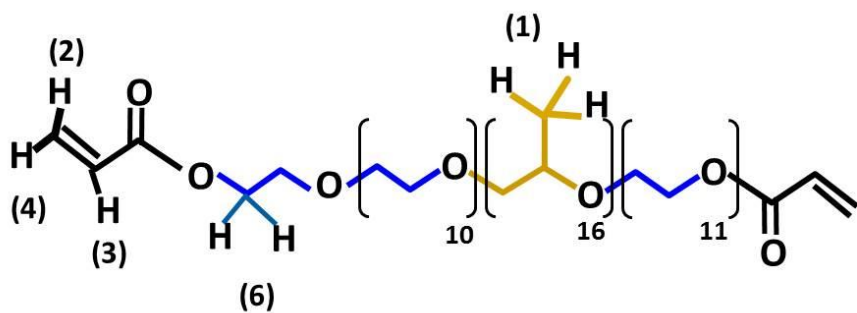
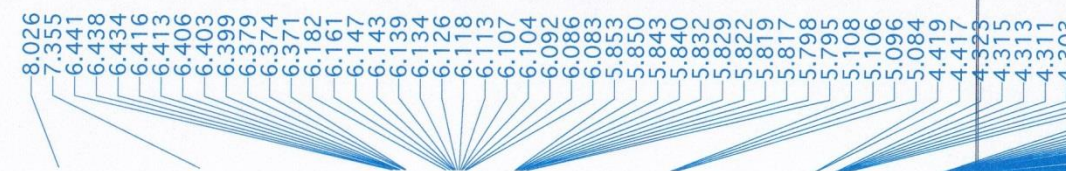
ESPECTRO FT-IR MONTURA ATR

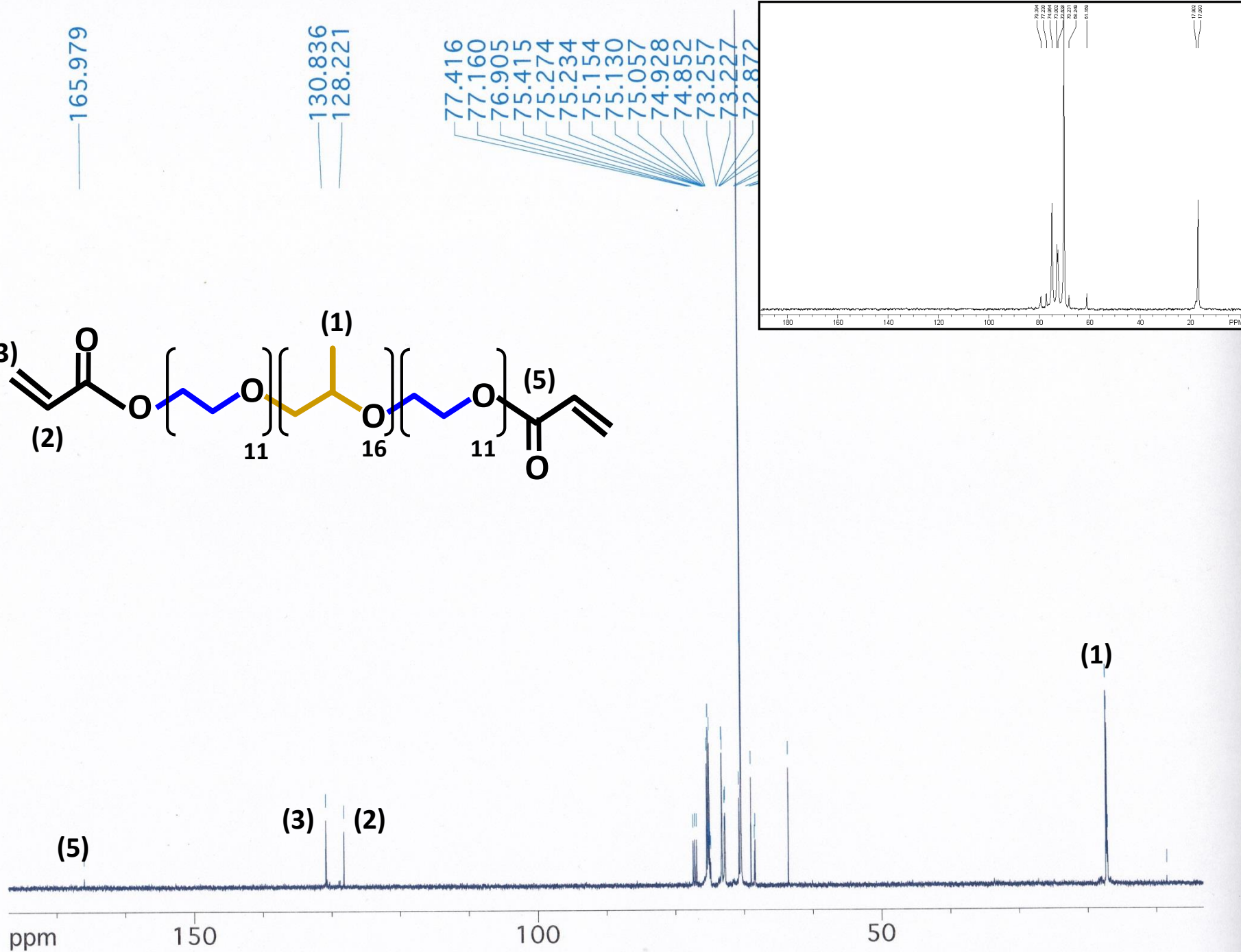
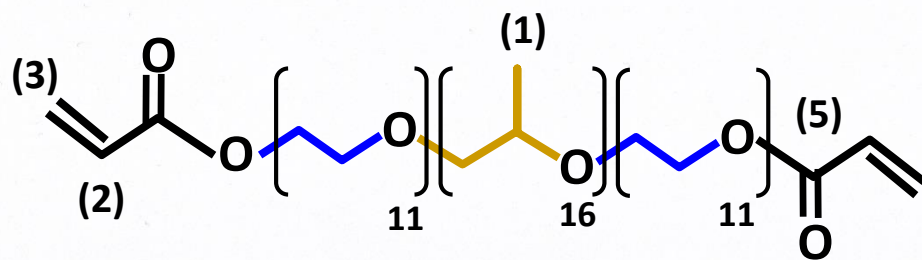


Poloxámero L35

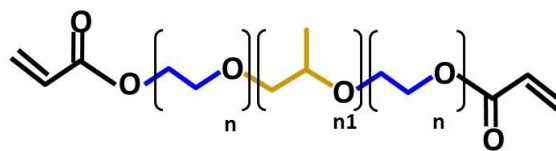


Ácido Acrílico



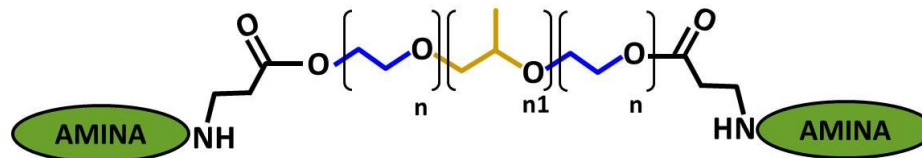


ESTRATEGIA DE FUNCIONALIZACIÓN PASO DOS



+

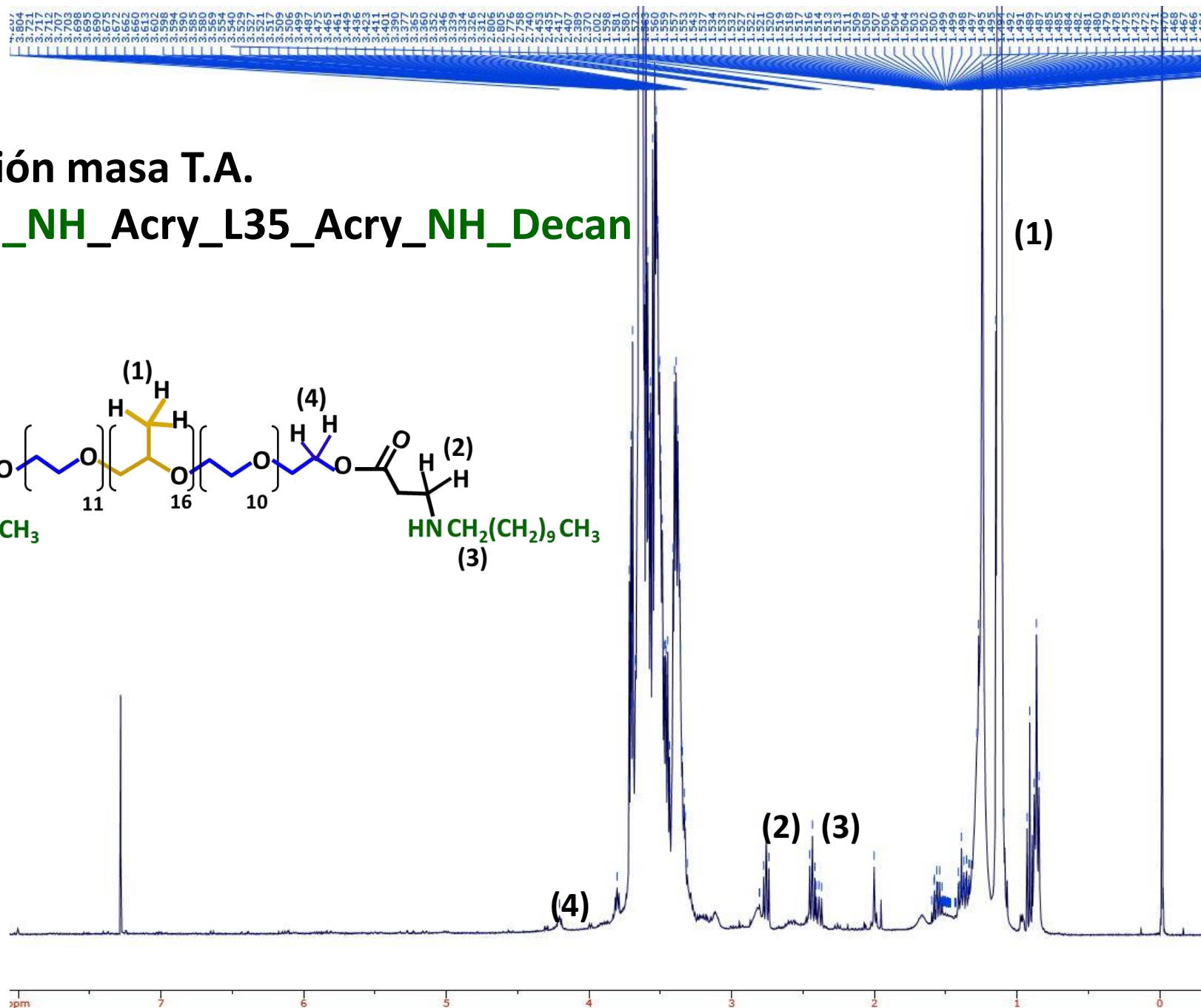
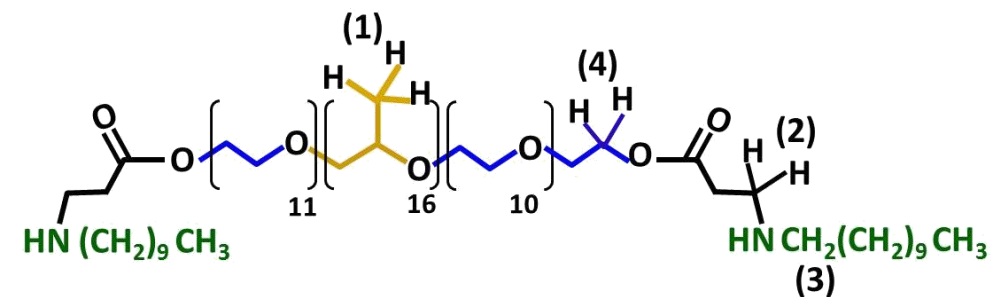
1-Aminodecano
Amino-etil-amino-etanol
Etanolamina

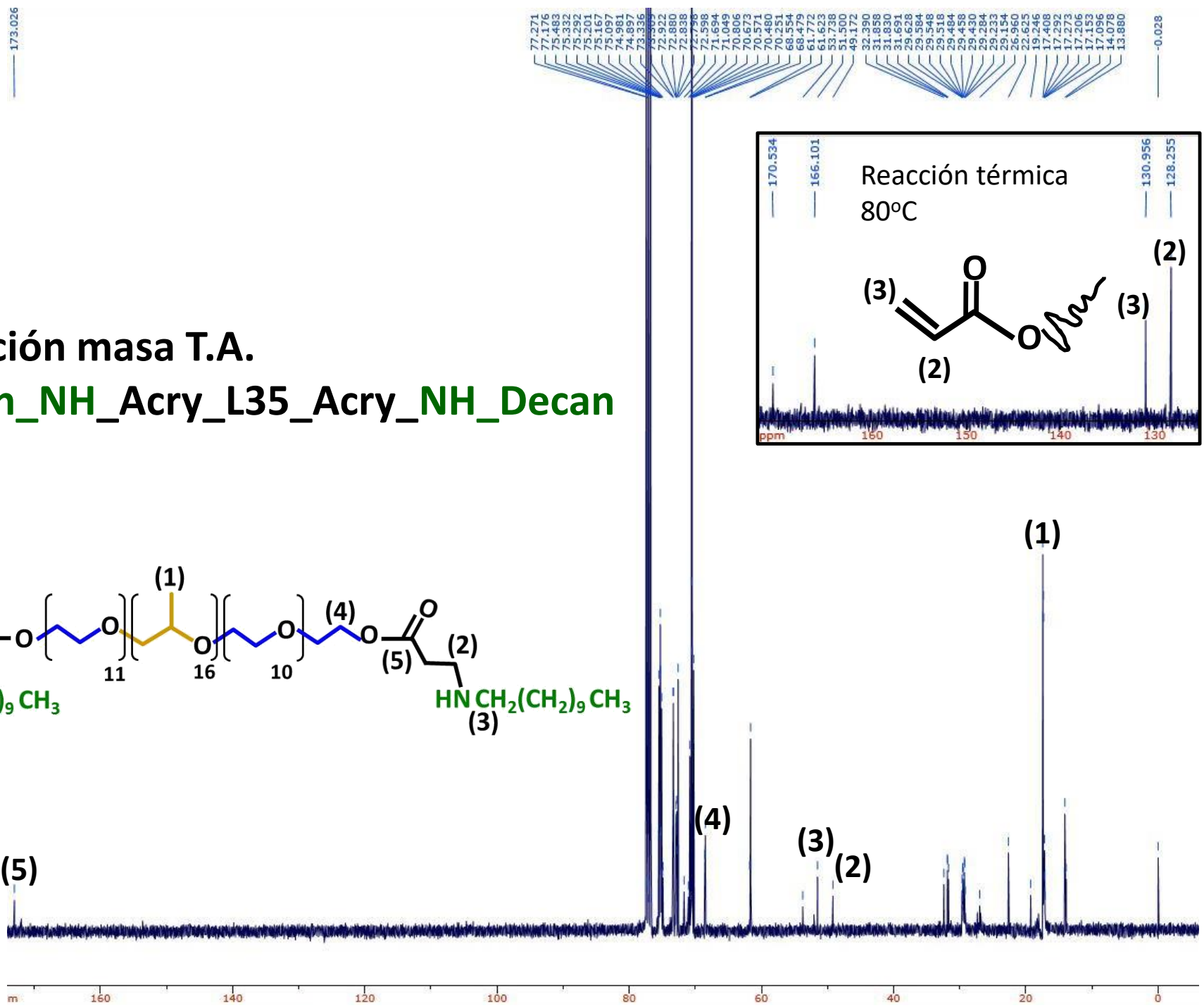


CARACTERIZACIÓN
RMN ^1H , ^{13}C , 2D
FTIR, TGA

Clave Reacción	Amina	Polox Di-Acrilatado	Tipo de Reacción
L35_(Acry_NH_Dec) ₂	1-Aminodecano	Acry_L35_Acry	Masa Temp. Amb. 6 días
L35_(Acry_NH_Dec) ₂	1-Aminodecano	Acry_L35_Acry	Térmica 80°C, 20 h en CH ₂ Cl ₂
L31_(Acry_NH_Dec) ₂	1-Aminodecano	Acry_L31_Acry	Ultrasonido 2h, Masa
L61_(Acry_NH_Dec) ₂	1-Aminodecano	Acry_L61_Acry	Térmica 80°C 20 h en CH ₂ Cl ₂
L31_(Acry_NH_et_NH_et_OH) ₂	Amino-etil-amino-etanol	Acry_L31_Acry	Masa 40°C, 2 días
L35_(Acry_NH_et_OH) ₂	Amino-etanol	Acry_L35_Acry	Masa T. Amb. 3 h 30 min

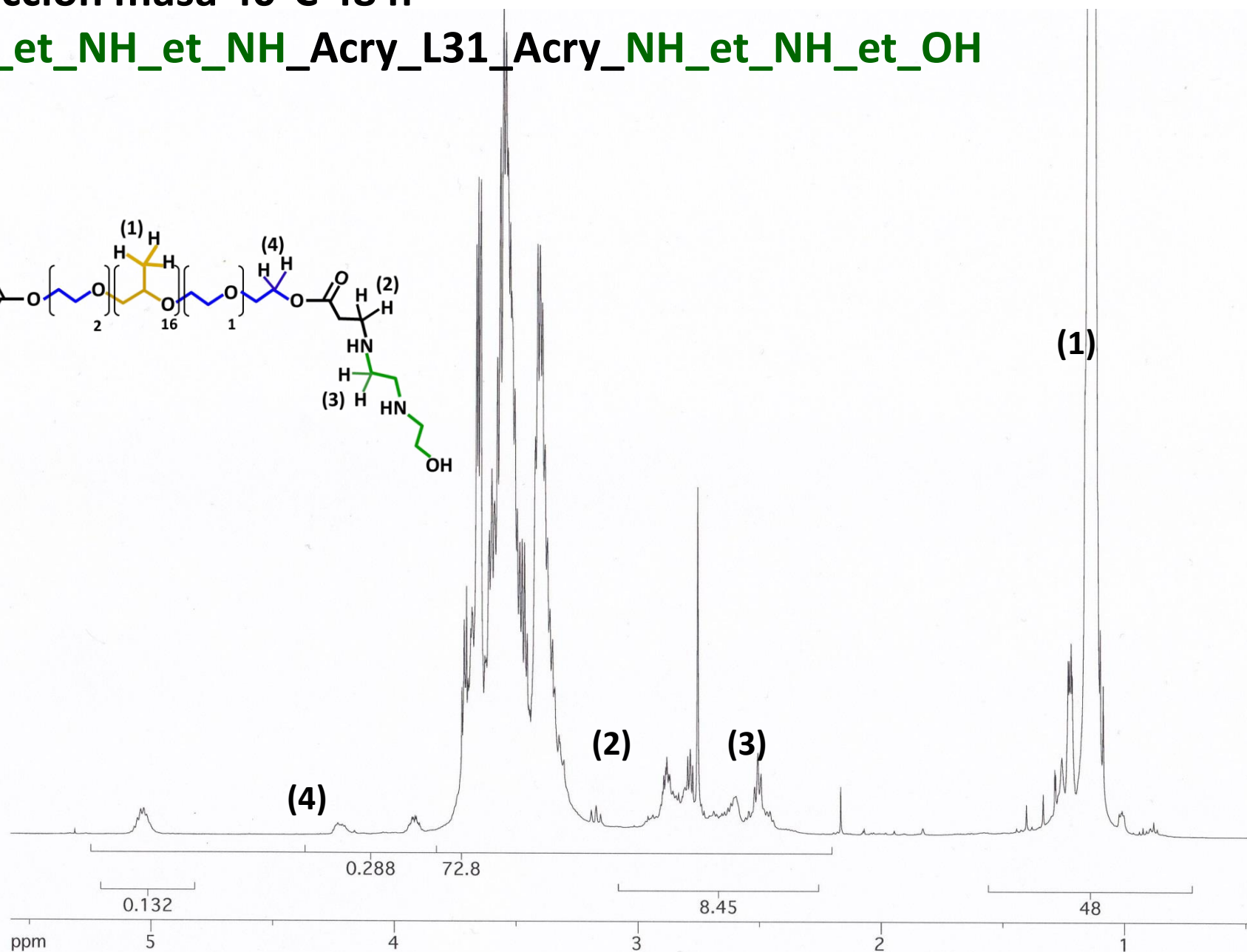
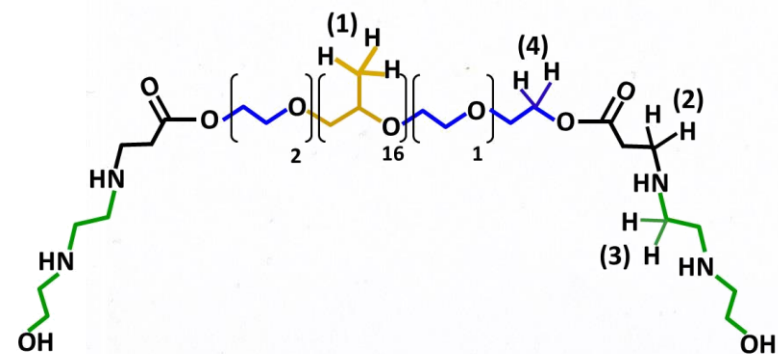
Decan_NH_Acry_L35_Acry_NH_Decan





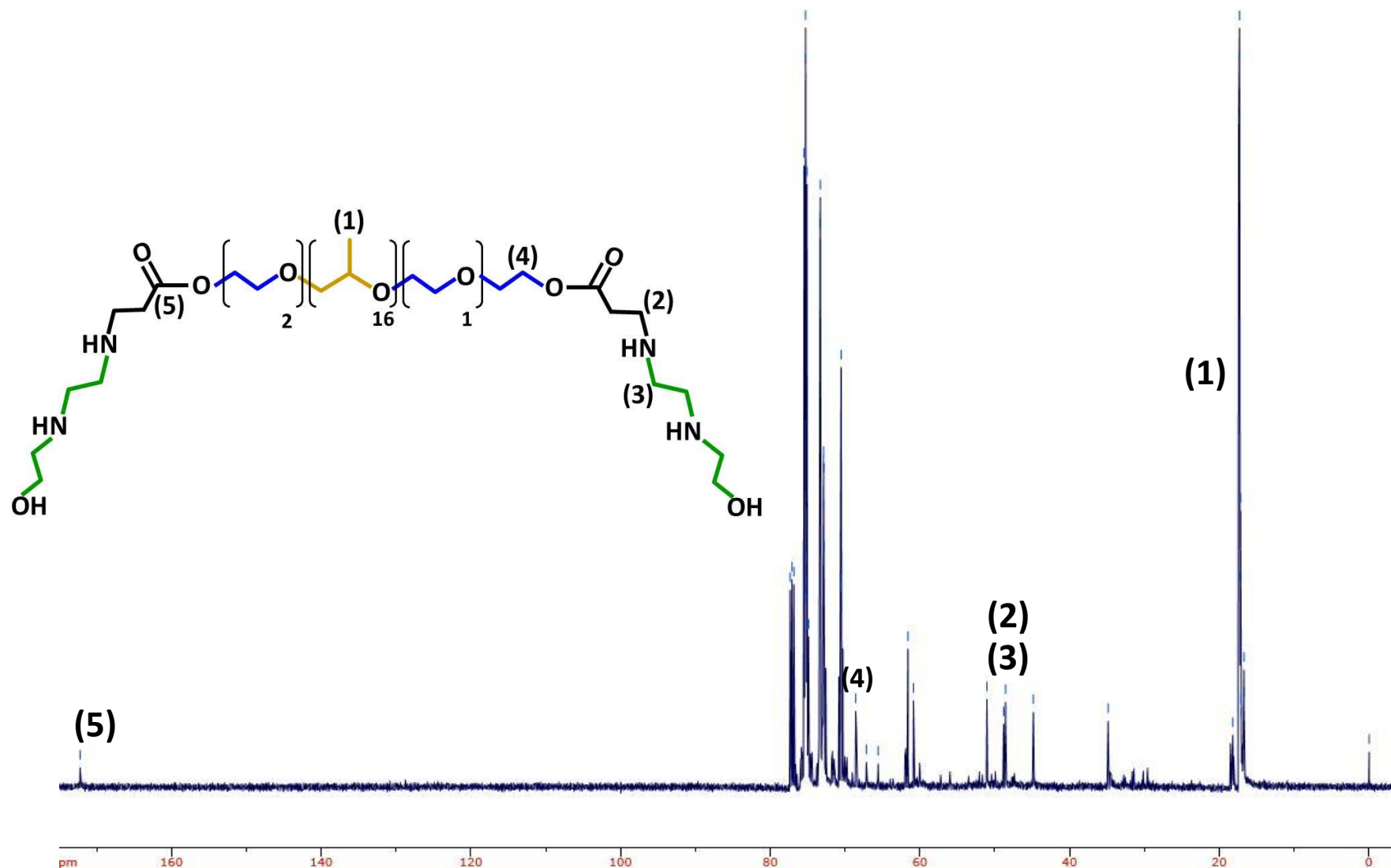
Reacción masa T.A.
Decan_NH_Acry_L35_Acry_NH_Decan

OH_et_NH_et_NH_Acry_L31_Acry_NH_et_NH_et_OH



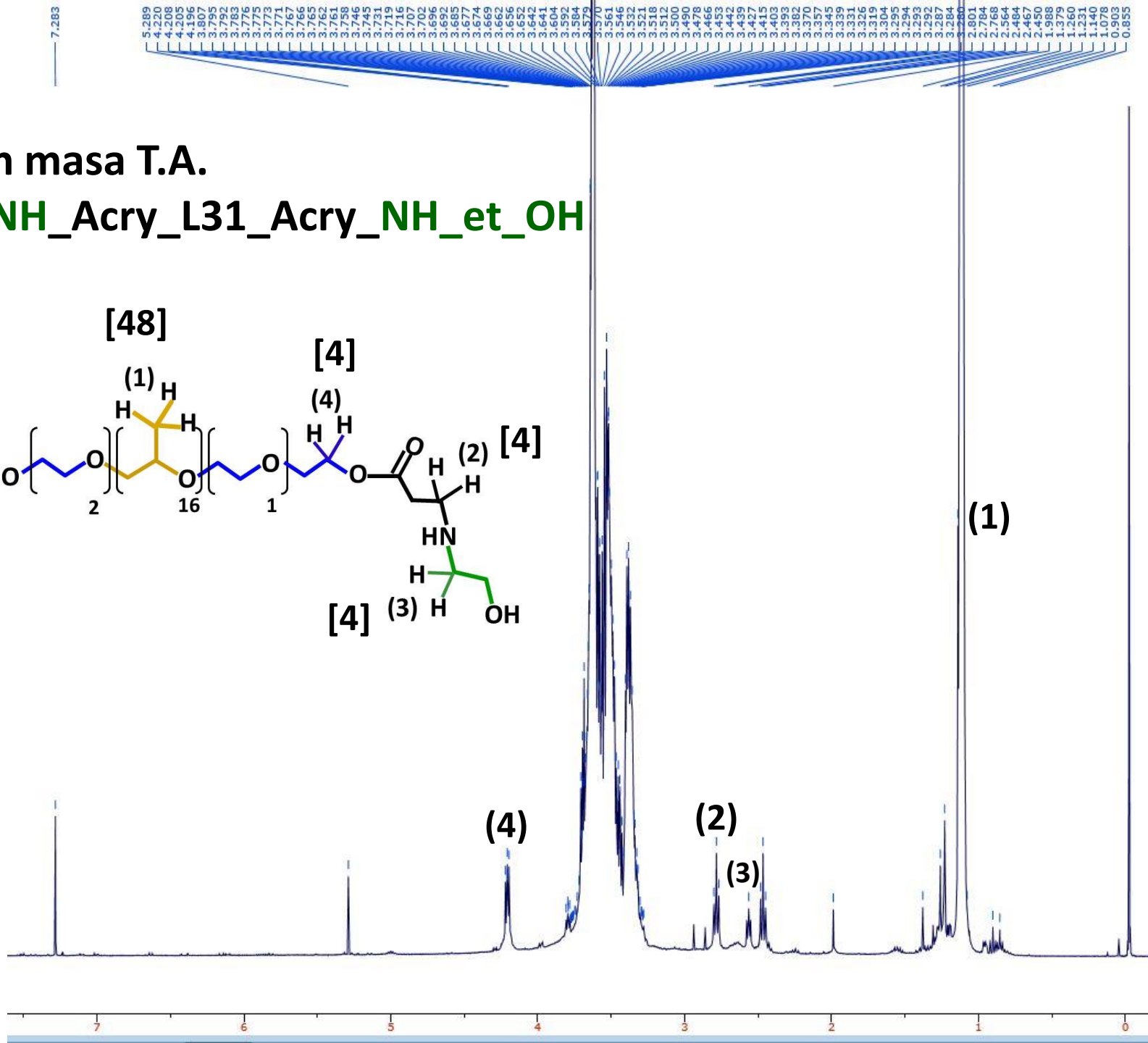
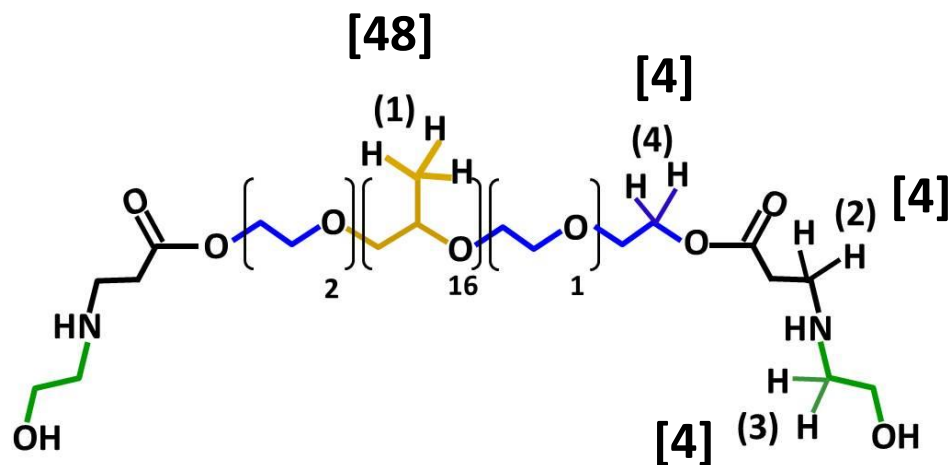
Reacción masa 40°C 48 h

OH_et_NH_et_NH_Acry_L31_Acry_NH_et_NH_et_OH



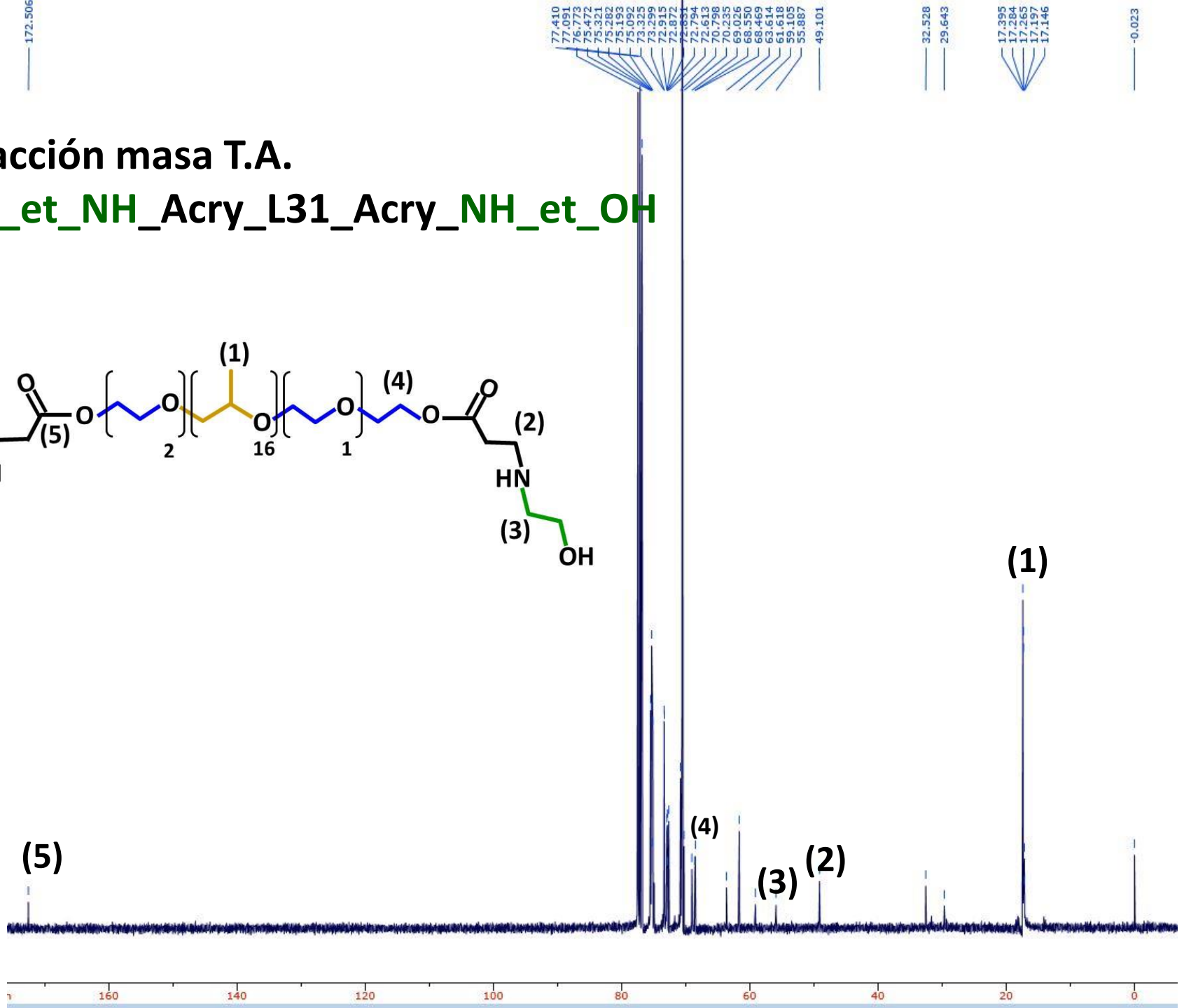
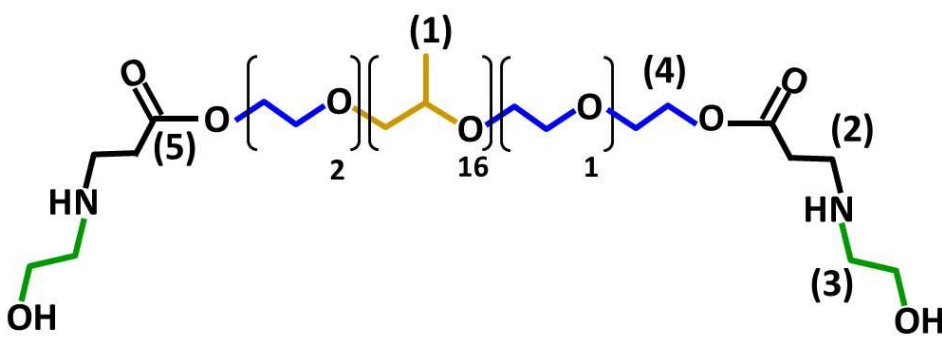
Reacción masa T.A.

OH_et_NH_Acry_L31_Acry_NH_et_OH



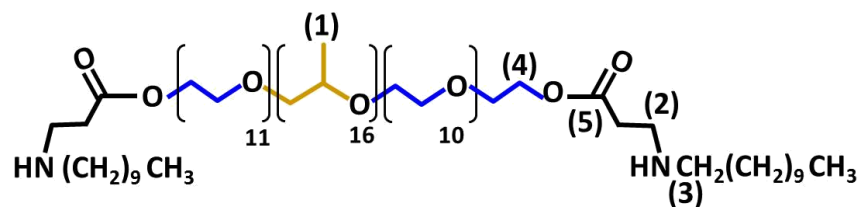
Reacción masa T.A.

OH_et_NH_Acry_L31_Acry_NH_et_OH



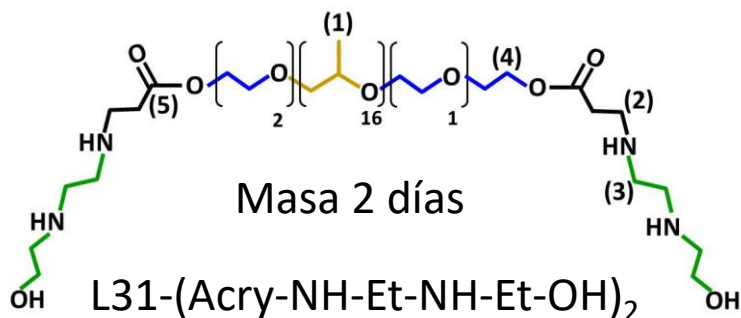
CONCLUSIONES

- Se logro la funcionalización en masa de los poloxámeros como acrilatos y posteriormente como los productos de adición 1-4-Michael con aminas como lo demuestran los espectros de FT-IR, RMN de ^1H y ^{13}C , COSY.
- Los porcentajes de funcionalización varían del 40 a $\approx 95\%$.
- Las reacciones térmicas también son una buena opción pero necesitan optimizarse.
- Con los poloxámeros funcionalizados se harán pruebas de toxicidad y posteriormente serán usados para construir vehículos liposomales con plásmidos.



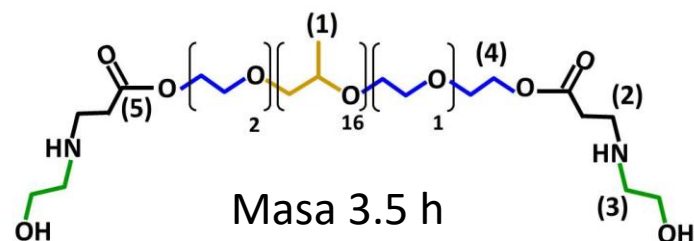
L35-(Acry-NH-Dec)₂

Masa 6 días



Masa 2 días

L31-(Acry-NH-Et-NH-Et-OH)₂

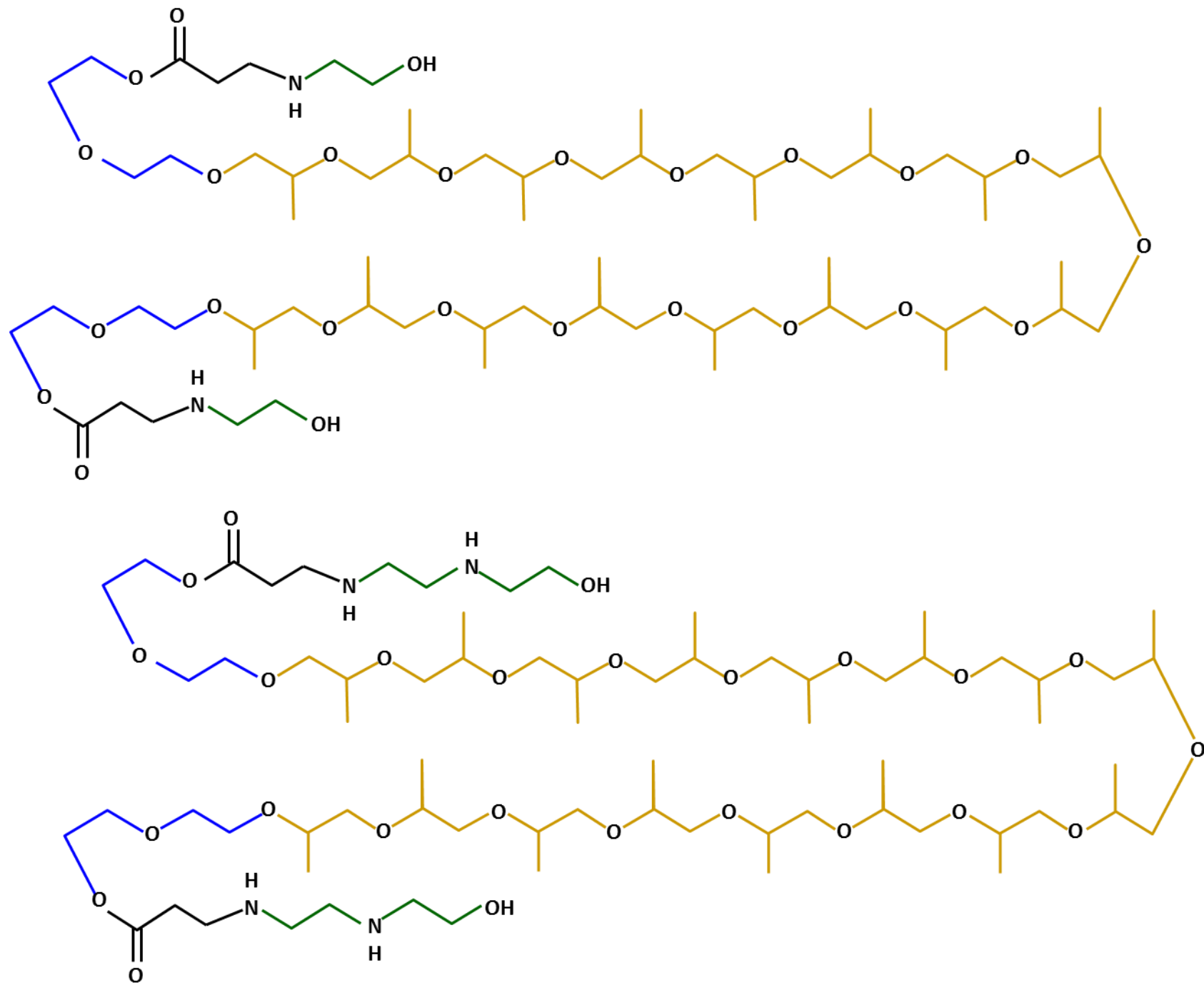


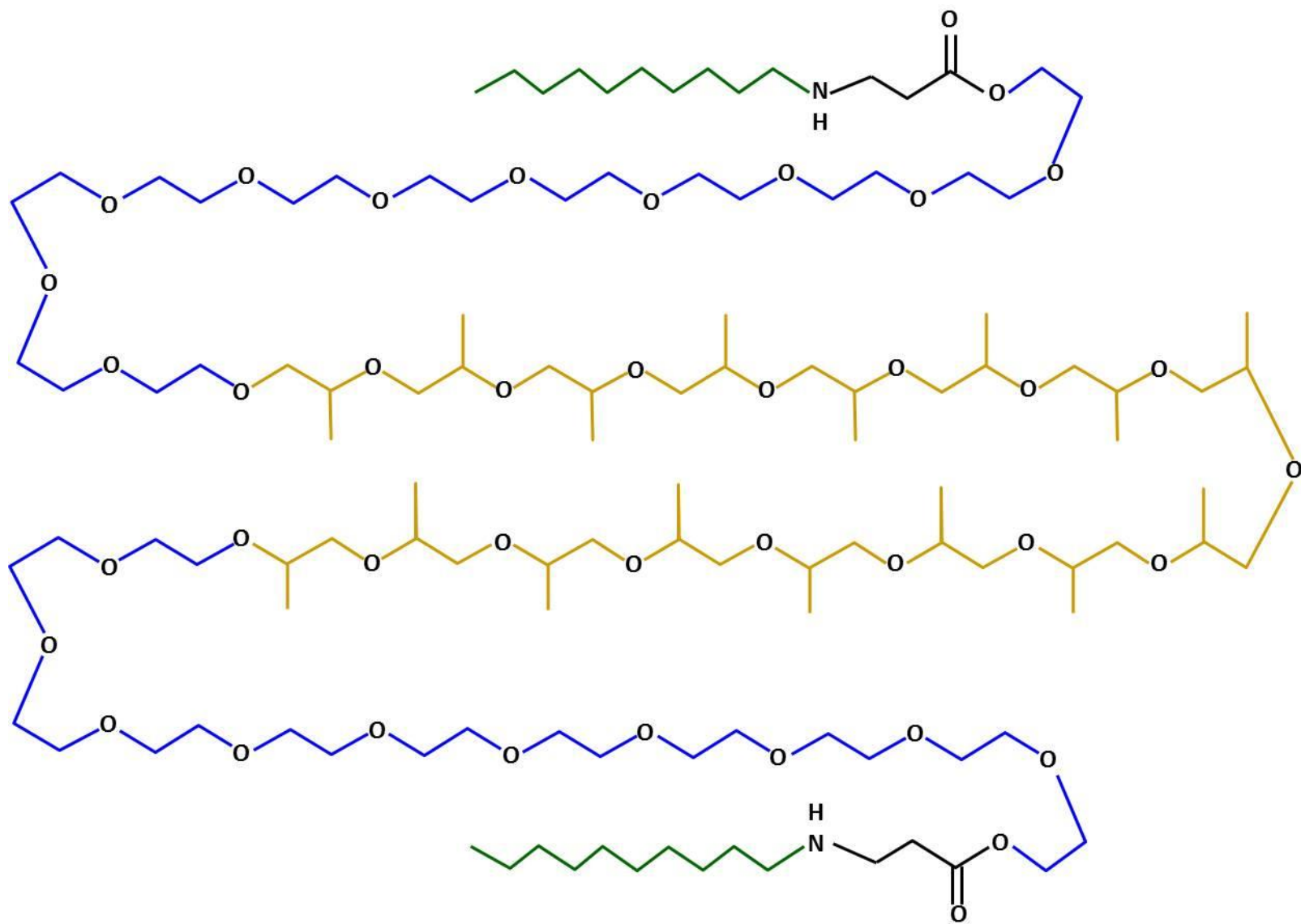
Masa 3.5 h

L31-(Acry-NH-Et-OH)₂

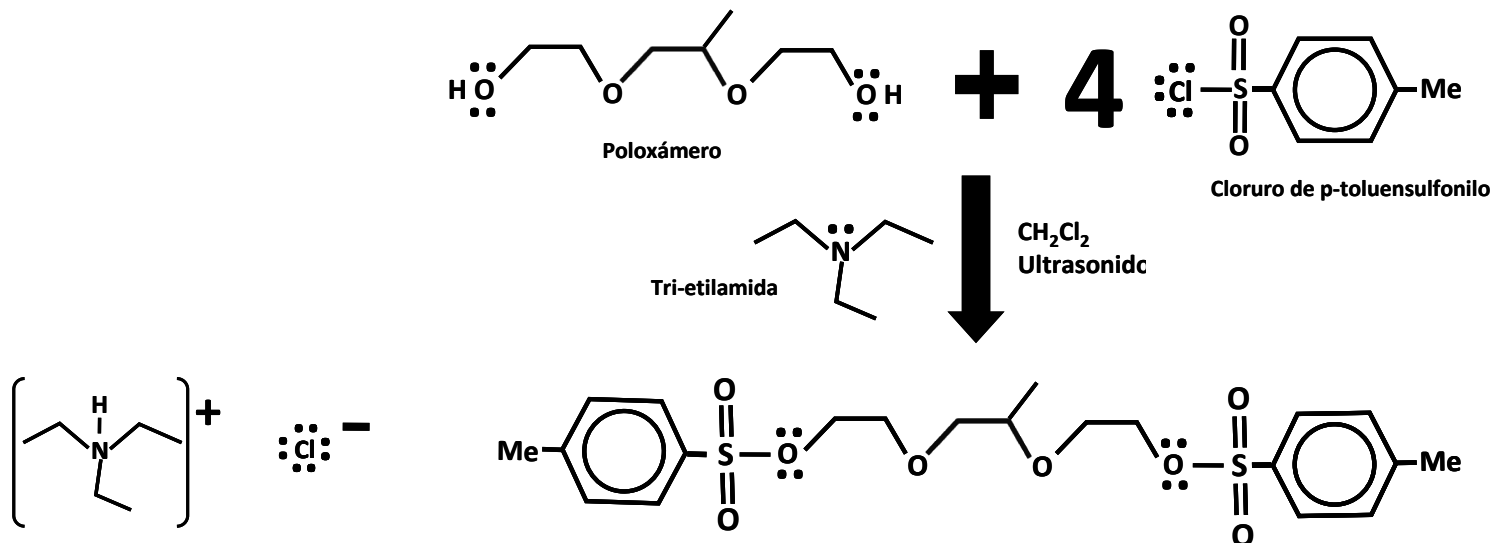
CRONOGRAMA DE TRABAJO

[illegible]



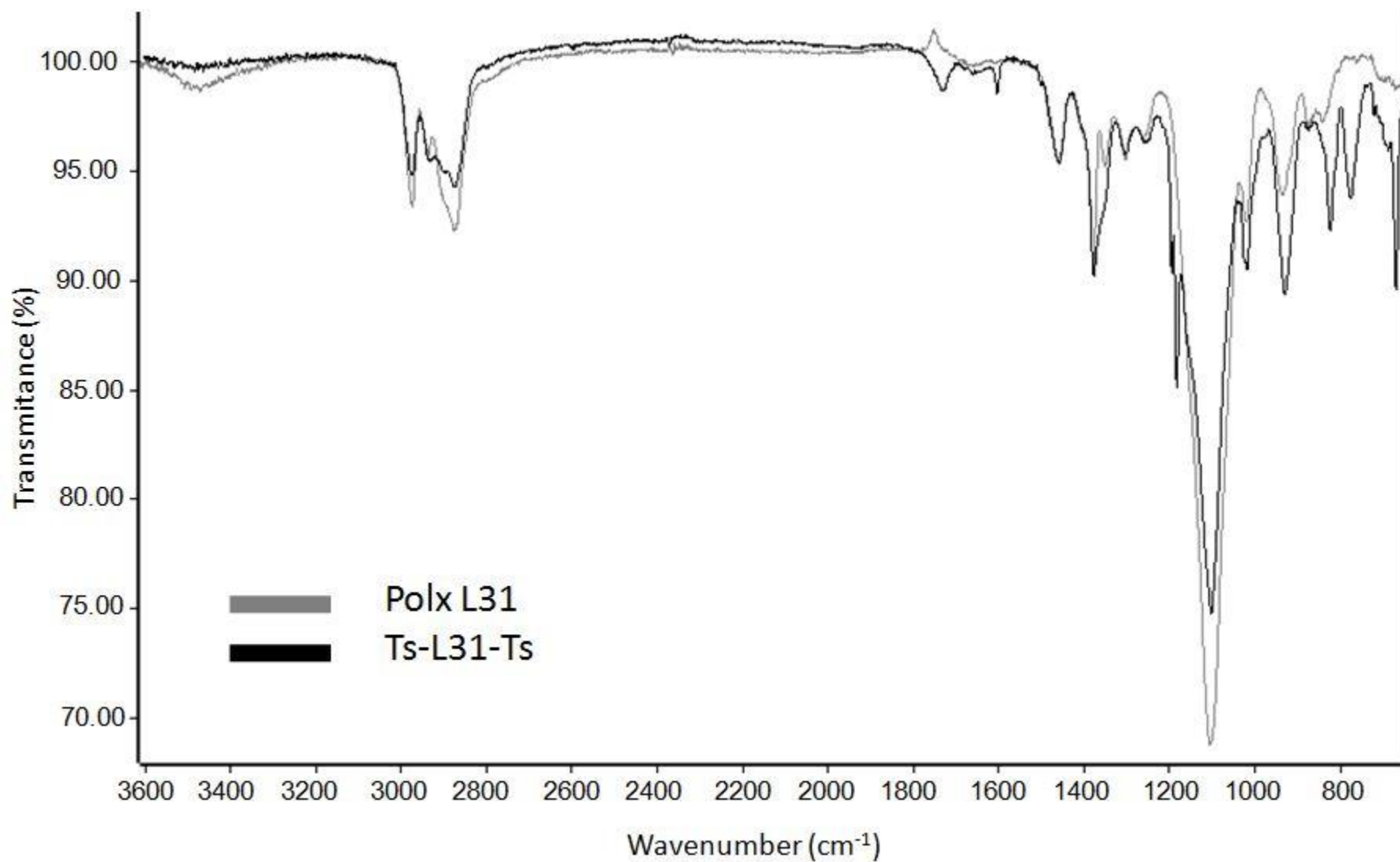


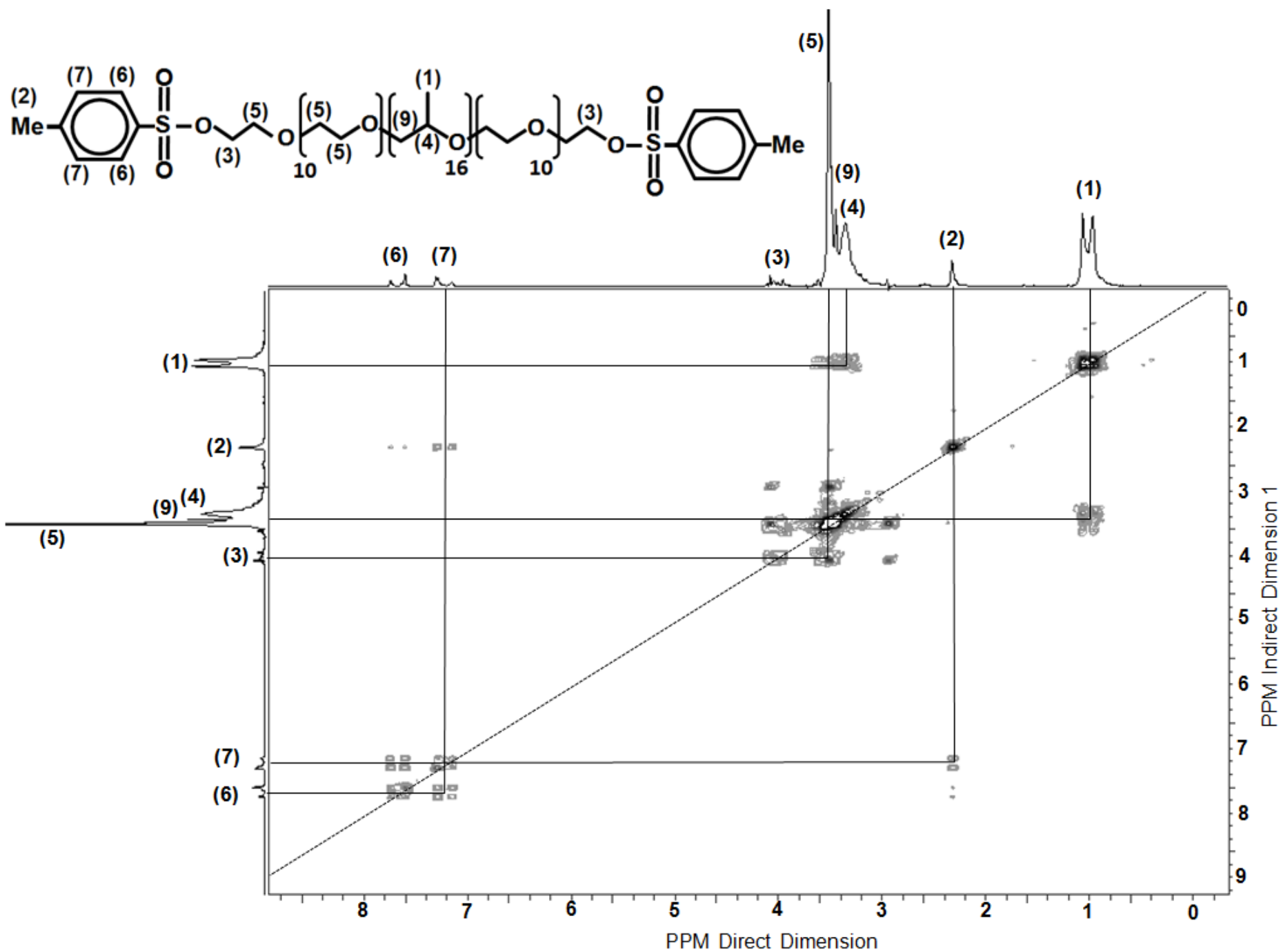
TOSILACIONES DE POLOXAMEROS

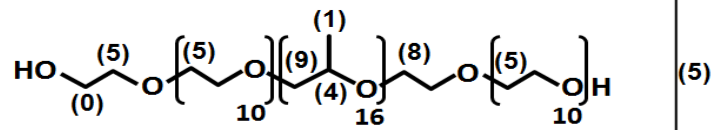


Tosilado	Poloxamero	Tiempo Reacción	Rendimiento
Ts-L31-Ts	L31	8 hrs	85 %
Ts-L35-Ts	L35	10 hrs	86%
Ts-L61-Ts	L61	10 hrs	84%

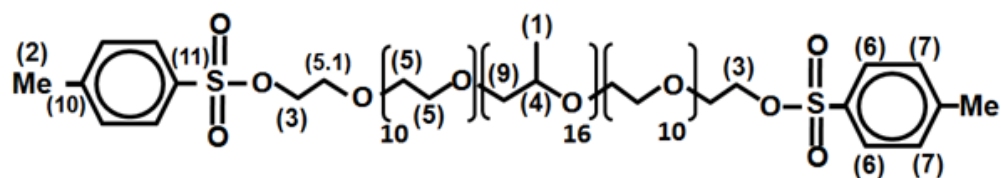
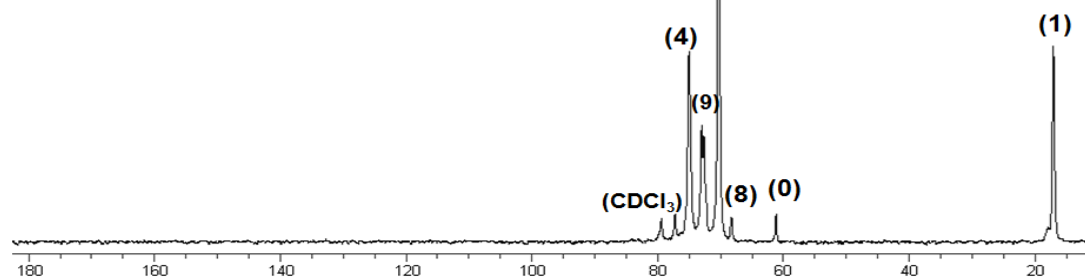
Comparación de FT-IR entre Poloxamero L31 y Ts-L31-Ts



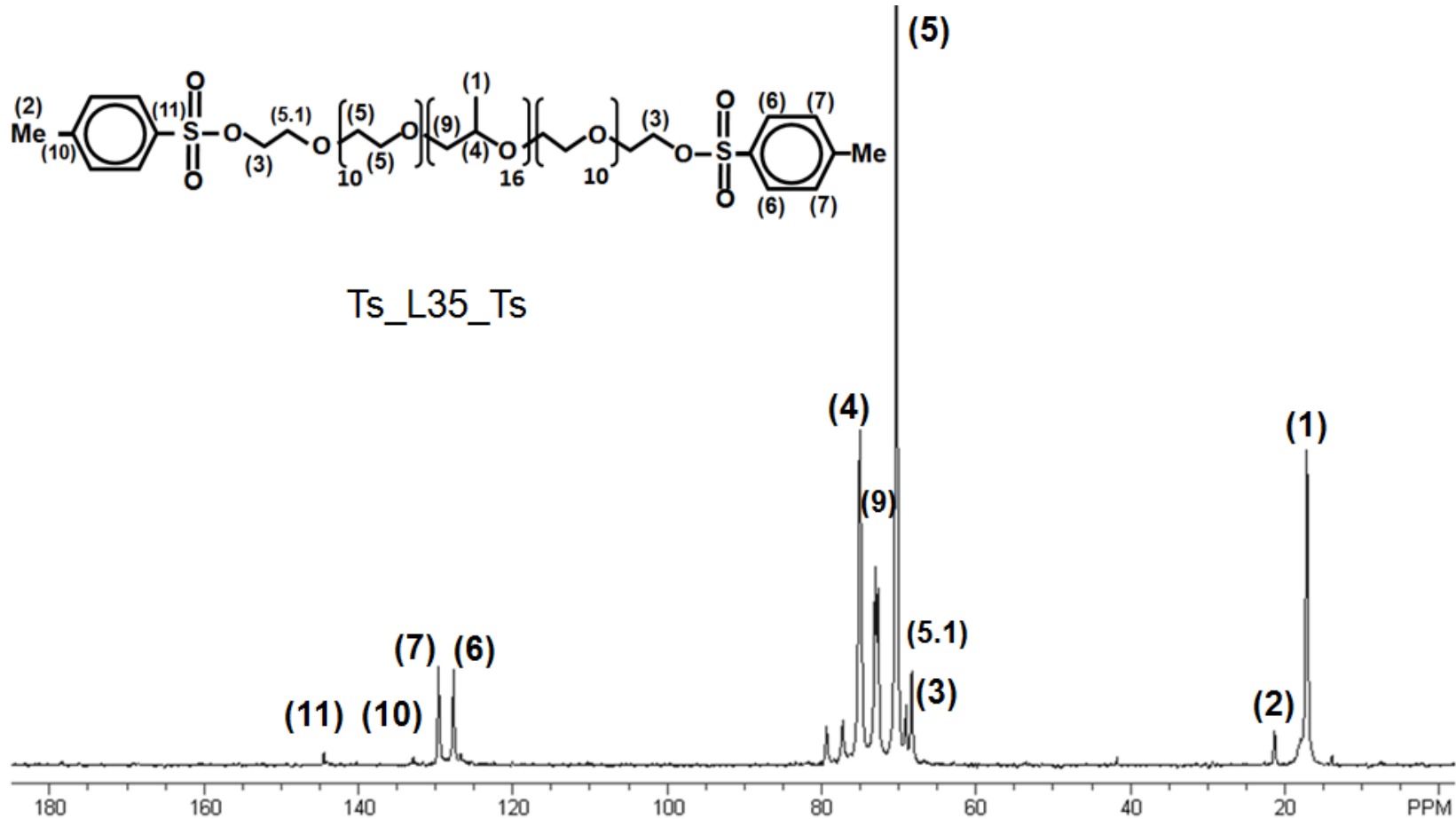




Poloxamer L35



Ts_L35_Ts



CONCLUSIONES

- Se logro obtener el poloxámero ditosilado como lo demuestran los espectros de FT-IR, RMN de ^1H y ^{13}C
- Se uso Ultrasonido a 4°C por periodos entre 8 y 10 hrs, se reduce el tiempo de reacción con respecto a otros trabajos y los rendimientos son buenos

Se esta escribiendo una comunicación corta de esta parte

