ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Roi
López Blanco

Tesis doctoral

Nanosistemas Dendríticos para Transporte de Fármacos

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Ciencia y Tecnología Química

TESIS DOCTORAL

Nanosistemas Dendríticos para Transporte de Fármacos

Roi López Blanco

ESCOLA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

Santiago de Compostela

2023

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

D. **Roi López Blanco**

Título de la tesis: **Nanosistemas dendríticos para transporte de fármacos**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mi para la obtención de otros títulos.
4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela**, **09 de enero de 2023**.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

D. **Eduardo Fernández Megía**

En condición de: **Director y Tutor**

Título de la tesis: **Nanosistemas dendríticos para transporte de fármacos**

INFORMA:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. **Roi López Blanco**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de COMPENDIO DE PUBLICACIONES, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En **Santiago de Compostela**, **09 de enero de 2023**.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

D. **Ricardo Riguera Vega**

En condición de: **Director**

Título de la tesis: **Nanosistemas dendríticos para transporte de fármacos**

INFORMA:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. **Roi López Blanco**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de COMPENDIO DE PUBLICACIONES, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En **Santiago de Compostela**, **09 de enero de 2023**.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A Noa.

Ós meus pais.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS **17**

1. INTRODUCCIÓN **23**

1.1. SISTEMAS DE *DRUG DELIVERY* 23
1.2. NANOTECNOLOGÍA PARA DDS 26
1.2.1. Modificación de la superficie de los DDS *28*
1.2.1.1. PEGuilación 28
1.2.2. Targeting de DDS *30*
1.2.2.1. Transporte pasivo (EPR) 30
1.2.2.2. Transporte activo *31*
1.2.2.3. Liberación inducida por estímulos *33*
1.2.3. Arquitectura de DDS *34*
1.2.3.1. Forma 35
1.2.3.2. Carga *36*
1.2.3.3. Tamaño *36*
1.3. TIPOS DE NANOPARTÍCULAS EN DD 37
1.3.1. Lipídicas *38*
1.3.2. Inorgánicas *40*
1.3.3. Bioinspiradas *41*
1.3.4. Híbridas *42*
1.3.5. Poliméricas *43*
1.3.5.1. Dendrímeros 44
1.3.5.2. Copolímeros de bloque 52
1.3.5.3. Micelas poliméricas 54
1.3.5.3.1. Micelas PIC 56

2. OBJETIVOS **67**

3. CAPÍTULO 1. LIVER X RECEPTOR ACTIVATION WITH AN INTRANASAL POLYMER THERAPEUTIC PREVENTS COGNITIVE DECLINE WITHOUT ALTERING LIPID LEVELS **73**

3.1. INTRODUCTION 73
3.2. RESULTS AND DISCUSSION 75
3.3. CONCLUSIONS 81
3.4. EXPERIMENTAL SECTION 82
3.5. SUPPORTING INFORMATION 85
3.6. REFERENCES 102

4. CAPÍTULO 2. POLYSACCHARIDES MEET DENDRIMERS TO FINE-TUNE THE STABILITY AND RELEASE PROPERTIES OF POLYION COMPLEX MICELLES **109**

4.1. INTRODUCTION 109
4.2. RESULTS AND DISCUSSION 111
4.3. CONCLUSIONS 117
4.4. SUPPORTING INFORMATION 118
4.5. REFERENCES 132

5. CAPÍTULO 3. DE MICELAS NANOMÉTRICAS A GIGANTES PIC MEDIANTE AUTOENSAMBLAJE JERÁRQUICO DE POLÍMEROS DENDRÍTICOS **137**

5.1. INTRODUCCIÓN 137
5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 139
5.3. CONCLUSIONES 147
5.4. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA 147
5.5. REFERENCIAS 163

6. CAPÍTULO 4. GALLIC ACID-TRIETHYLENE GLICOL APTADENDRIMERS SYNTHESIS, BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION AND CELLULAR EVALUATION 169

6.1. INTRODUCTION 169
6.2. MATERIALS AND METHODS 170
6.3. RESULTS AND DISCUSSION 175
6.4. CONCLUSIONS 182
6.5. SUPPORTING INFORMATION 183
6.6. REFERENCES 190

7. DISCUSIÓN GENERAL 195

8. CONCLUSIONES 211

9. ANEXOS 215

9.1. ANEXO 1: LIVER X RECEPTOR ACTIVATION WITH AN INTRANASAL POLYMER THERAPEUTIC PREVENTS COGNITIVE DECLINE WITHOUT ALTERING LIPID LEVELS 215
9.2. ANEXO 2: POLYSACCHARIDES MEET DENDRIMERS TO FINE-TUNE THE STABILITY AND RELEASE PROPERTIES OF POLYION COMPLEX MICELLES 219
9.3. ANEXO 3: GALLIC ACID-TRIETHYLENE GLYCOL APTADENDRIMERS SYNTHESIS, BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION AND CELLULAR EVALUATION 229

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Alexa Fluor
AFM	*Atomic Force Microscopy*
AF488	*Alexa Fluor 488*
ALG	*Alginate* (Alginato)
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BIC	*Blockiomer Complex*
Boc	*Tert-butoxycarbonyl*
br	*Broad* (referido a señales espectroscópicas)
C3M	*Core Coacervate Complex Micelles*
CD	*Circular Dichroism*
CMC	Concentración Micelar Crítica
CS	*Chitosan* (Quitosano)
CuAAC	*Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*
Cy5	Cianina-5
d	Doblete
Da	Dalton
DD	*Drug Delivery*
dd	Doble doblete
DDS	*Drug Delivery System*
DBCO	*Dibenzocyclooctyne*
DL	*Drug Loading*
DLS	*Dynamic Light Scattering*
DMF	*N,N-Dimethylformamide*
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*
DMSO	*Dimethyl sulfoxide*
DOTA	*1,4,7,10-tetraazacy-clododecane-1,4,7,10-tetraactic acid*
DOX	Doxorrubicina
DP	*Degree of polymerization*
DS	*Degree of substitution*
dt	Doble triplete
DTPA	*Diethylenetriaminepentaacetic acid*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ECACC	*European Collection of Authenticated Cell Cultures*
EDC	*1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide*
EDTA	*Ethylendiaminetetraacetic acid*
EE	*Encapsulation Efficiency*
EMA	*European Medicines Agency*
EPR	*Enhanced Permeation and Retention*
eq	Equivalentes
FBS	*Fetal Bovine Serum*
FDA	*Food and Drug Administration*
FITC	*Fluorescein isothiocyanate*
G	Generación
GATG	*Gallic Acid-Triethylene Glycol*
GPC	*Gel Permeation Chromatography*
HA	*Hyaluronic acid* (Ácido hialurónico)
HABA	*2-(4'-Hydroxy-benzeneazo)benzoic acid*
HOBt	*1-Hydroxybenzotriazol*
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
Hz	Hercios
IPEC	*Interpolyelectrolite Complex*
IR	*Infrared*
J	Constante de acoplamiento
K	Kelvin
LDA	*Laser Doppler Anemometry*
LXR	*Liver X Receptor*
m	Multiplete
M	Molar
M_n	*Number average molecular weight*
M_p	*Peak molecular weight*
M_w	*Weight average molecular weight*
MALDI	*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*
MALLS	*Multi Angle Laser Light Scattering*
MPLC	*Medium Pressure Liquid Chromatography*
MRI	*Magnetic Resonance Imaging*
MS	*Mass Spectrometry*
MTT	*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MW	*Molecular Weight*
MWCO	*Molecular Weight Cut Off*
NHS	*N-Hydroxysuccinimide*
NIR	*Near Infrared*
NMR	*Nuclear Magnetic Resonance*
NOR	*Novel object recognition*
NP	Nanopartícula
P2VP	Poli(2-vinilpiridina)
P4EVP	Poli(N-etil-4-vinilpiridinio)
PAA	Poli(acrílico)
PAAm	Poli(acrilamida)
PAETB	Poli(4-(2-aminohidrocloruro-etiltio)-butileno)
PAGE	*Polyacrylamide gel electrophoresis*
PAMAM	Poli(amidoamina)
PAMPS	Poli(2-(acrilamido)-2-metilpropanosulfonato sódico)
PArg	Poli(L-arginina)
PAsp	Poli(L-aspártico)
PB	*Phosphate Buffer*
PBS	*Phosphate Buffer Saline*
PCETB	Poli(4-(2-carboxil-etiltio)-butileno
PDI	*Polydispersity Index*
PDMAEMA	Poli(2-(N,N-dimetilamino) etilmetacrilato)
PEG	Poli(etilenglicol)
PEI	Poli(etilenimina)
PGA	Poli(L-glutámico)
PGMA	Poli(glicerolmetracrilato)
PGLSA	Poli(glicerol-(ácido succínico))
PIC	*Polyion Complex*
PLL	Poli(L-lisina)
PMAA	Poli(metacrilato)
PNIPAAM	Poli(N-isopropil acrilamida)
PNVP	Poli(N-vinilpirrolidona)
PPI	Poli(propilenimina)
ppm	Partes por millón
PSCI	Poli((sulfamato-carboxilato)isopreno)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PVA	Poli(vinil alcohol)
QD	*Quantum Dot*
RI	*Refractive Index*
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rt	*Room temperature*
s	Singulete
SDS	*Sodium Dodecil Sulfate*
SEC	*Size Exclusion Chromatography*
SEM	*Scanning Electron Microscopy*
SLS	*Static Light Scattering*
SPAAC	*Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition*
SPIO	*Superparamagnetic Iron Oxide*
t	Triplete
ta	Temperatura ambiente
TBTA	*Tris(benzyltriazoylmethyl)amine*
TEM	*Transmission Electron Microscopy*
TFA	*Trifluoroacetic acid*
THF	*Tetrahydrofuran*
TMS	*Trimethylsilane*
TOF	*Time of flight*
USPIO	*Ultra-Small Superparamagnetic Iron Oxide*
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
V	Voltios
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
°C	Grados Celsius

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Un país sin investigación es un país sin desarrollo.

Margarita Salas

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

A medida que aumenta la esperanza de vida, aparecen nuevos retos en la medicina que requieren tratamientos más personalizados y elaborados capaces de, por ejemplo, mejorar la solubilidad en agua de fármacos poco solubles, superar barreras biológicas y desarrollar formulaciones más eficientes y de acción más prolongada.[1] Si bien los avances en las tecnologías de administración de fármacos durante las últimas siete décadas han sido impresionantes, tan solo un pequeño porcentaje de estas tecnologías han sido aprobadas por las agencias reguladoras de medicamentos y tienen aplicación clínica.[2,3] Las principales razones que explican esta problemática están relacionadas con el hecho de que multitud de fármacos presentan una gran actividad *in vitro*, pero son inactivos *in vivo* debido a su incapacidad de llegar intactos a las zonas de acción. Otros fármacos son capaces de llevar a cabo una acción poco selectiva que tiene como resultado el daño de tejidos sanos. Con el fin de resolver estos y otros muchos problemas de la medicina moderna, se han ido desarrollado una serie de sistemas de transporte de fármacos o sistemas de *Drug Delivery* (DD).[4]

1.1. SISTEMAS DE *DRUG DELIVERY*

El nacimiento de los sistemas transporte de fármacos, de aquí en adelante DDS por sus siglas en inglés (*Drug Delivery Systems*), data del año 1952 con la introducción de la tecnología de liberación prolongada Spansule Dexedrine® (liberación sulfato de dextroanfetamina durante 12 h) y Contac® 600 (clorhidrato de fenilpropanolamina y maleato de clorfeniramina).[3] Estos primeros ejemplos de DDS desarrollados como implantes poliméricos biodegradables capaces de llevar a cabo una liberación controlada de fármacos, dieron paso al desarrollo de diferentes tipos de hidrogeles, parches e implantes.[5,6] Un posterior punto de inflexión se produjo en el año 1976 cuando Robert Langer y Judah Folkman demostraron que usando matrices poliméricas se podían administrar proteínas y macromoléculas durante largos períodos de tiempo.[7,8]

Este primer período se conoce como la *era macro*, que tras la evolución de estos primitivos DDS dio paso a la *era micro* y permitió su administración intravenosa gracias a la reducción en el tamaño de los sistemas. Esta nueva vía de entrada en el organismo permitió un mejor y más rápido acceso a las zonas donde el fármaco debía ejercer su acción. El siguiente hito de esta progresión se conoce como la *era nano* dónde los nuevos DDS presentaban un tamaño nanométrico inferior al de la célula, lo que supuso una gran revolución en la forma de interactuar con el organismo.[6,9]

---

[1] Vargason, A. M.; Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. *Nat. Biomed. Eng.* **2021**, *5*, 951-967.
[2] Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Science* **2004**, *303*, 1818-1822.
[3] Park, H.; Otte, A.; Park, K. *J. Control. Release* **2022**, *342*, 53-65.
[4] Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 15-28.
[5] Hoffman, A. S. *J. Control. Release* **2008**, *132*, 153-163.
[6] Kamaly, N.; Yameen, B.; Wu, J.; Farokhzad, O. C. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2602-2663.
[7] Langer, R.; Folkman, J. *Nature* **1976**, *263*, 797-800.
[8] Langer, R.; Peppas, N. A. *Biomaterials* **1981**, *2*, 201-214.
[9] Park, K. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 3-8.

La Figura 1.1 muestra el desarrollo histórico de los DDS y su aprobación por la *Food and Drug Administration* (FDA) a lo largo de los últimos 70 años. Como se puede ver en la parte izquierda de la figura, los DDS iniciales se basaban en formulaciones principalmente orales y transdérmicas en las que se usaban moléculas pequeñas. El transporte de estas moléculas depende en gran medida de sus propiedades fisicoquímicas, por lo que los primeros esfuerzos se centraron en mejorar la solubilidad de fármacos, controlar su liberación, aumentar su actividad y regular su farmacocinética.[9-11]

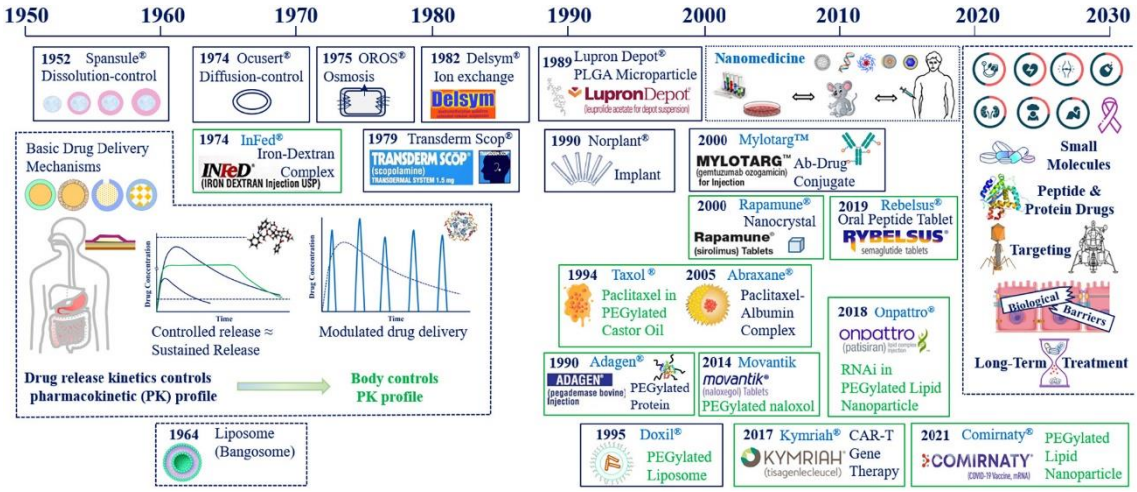


Figura 1.1. Evolución histórica de los principales DDS aprobados por la FDA. Adaptada de la referencia 3.

Con el paso del tiempo, nuevas generaciones de tratamientos, que incluyen proteínas y péptidos, anticuerpos o ácidos nucleicos, han planteado nuevos desafíos que atienden a una serie de demandas:[1,12]

- Aumento de la solubilidad en agua y aumento de la permeabilidad a través de mucosas.
- Aumento del tiempo de vida media en el organismo.
- Reducción de los efectos secundarios.
- Mejora de la farmacocinética y de la biodistribución.

Con el fin de desarrollar nuevos DDS capaces de superar estos desafíos y hacer frente a las demandas de la medicina moderna, se han desarrollado una serie de aproximaciones (Figura 1.2):

1. *Modificación del propio fármaco.* Abarca desde pequeñas modificaciones químicas en su estructura hasta su conjugación con ligandos u otras moléculas. Algunas de las modificaciones más utilizadas afectan a grupos funcionales, la incorporación de ligandos directores o de polímeros como el polietilenglicol (PEG).[13,14]

[10] Gidal, B. E.; DeCerce, J.; Bockbrader, H. N.; Gonzalez, J.; Kruger, S.; Pitterle, M. E.; Rutecki, P.; Ramsay, R. E. *Epilepsy Res.* **1998**, *31*, 91-99.
[11] Serajuddin, A. T. M. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 1058-1066.
[12] Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 101-124.
[13] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
[14] Pereira, D. A.; Williams, J. A. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 53-61.

2. *Alteración del entorno del fármaco*. Desde modificaciones en el entorno del fármaco a cambios muy específicos en la zona de acción. Algunos ejemplos son el uso de adyuvantes y excipientes capaces de modular el pH o inhibir la actividad de enzimas como proteasas.[15-17]
3. *DDS inteligentes*. La importancia de esta aproximación nace de combinar las dos estrategias anteriores, construyendo una interfaz capaz de interaccionar a la vez con el fármaco y su entorno.[1]

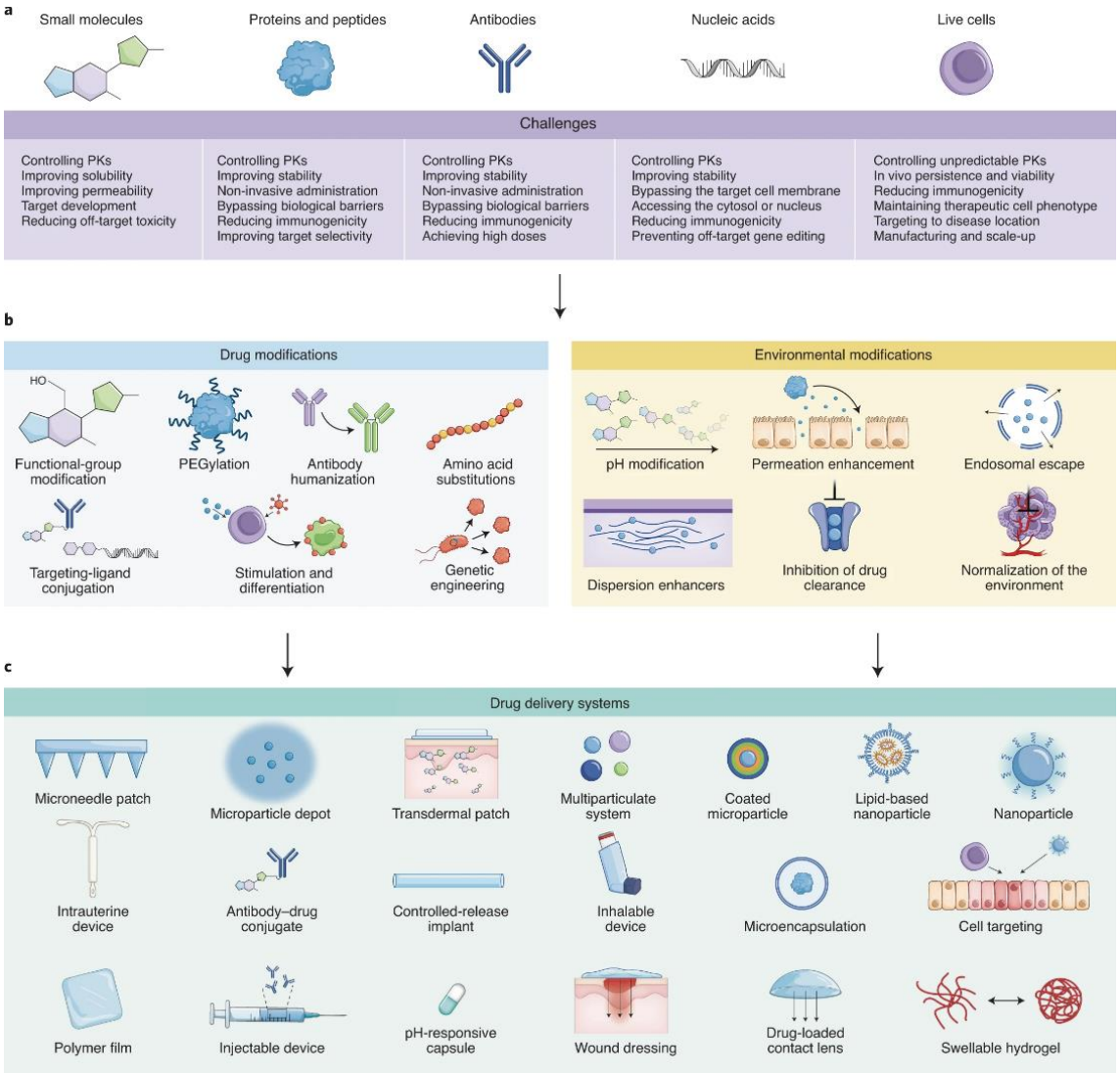


Figura 1.2. Esquema de las aproximaciones más importantes utilizadas en el desarrollo de DDS. Adaptada de la referencia 1.

[15] Evans, B. C.; Fletcher, R. B.; Kilchrist, K. V.; Dailing, E. A.; Mukalel, A. J.; Colazo, J. M.; Oliver, M.; Cheung-Flynn, J.; Brophy, C. M.; Tierney, J. W.; Isenberg, J. S.; Hankenson, K. D.; Ghimire, K.; Lander, C.; Gersbach, C. A.; Duvall, C. L. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5012-5030.
[16] Taniguchi, C.; Kawabata, Y.; Wada, K.; Yamada, S.; Onoue, S. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *11*, 505-516.
[17] Welling, S. H.; Hubalek, F.; Jacobsen, J.; Brayden, D. J.; Rahbek, U. L.; Buckley, S. T. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, *86*, 544-551.

1.2. NANOTECNOLOGÍA PARA DDS

El término nanotecnología se encuentra definido de diversas formas en la bibliografía. En el año 2000, la *National Nanotechnology Initiative* de los EE.UU. definió que la nanotecnología se ocupa de los materiales y sistemas cuyas estructuras y componentes exhiben propiedades, fenómenos y procesos físicos, químicos y biológicos novedosos y significativamente mejorados debido a su tamaño en la escala nanométrica (1 a 100 nm).[18,19]

El gran interés que la nanotecnología ha despertado en los últimos años se debe principalmente a que, al manipular la materia a una escala tan pequeña, sus propiedades físicas cambian. El campo de la nanotecnología se puede combinar con otras muchas áreas de investigación como la medicina o la administración de fármacos, dando lugar a nuevos y mejores DDS capaces de llevar a cabo una acción más segura y selectiva. Algunas de las ventajas más importantes son el aumento de solubilidad y estabilidad, mejoras en la biodistribución y farmacocinética, mayor selectividad y menor toxicidad.[20,21]

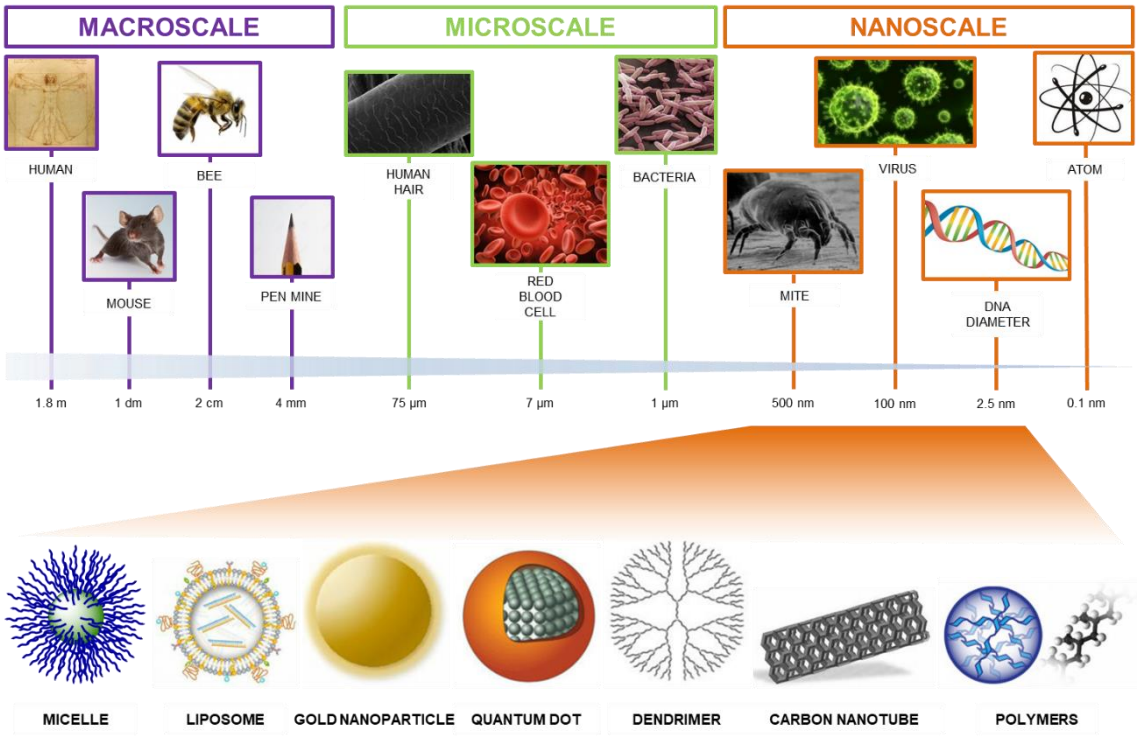


Figura 1.3. Esquema de las macro, micro y nano-escalas. Principales estructuras nanométricas utilizadas en DD. Adaptada de la referencia 19.

[18] National Nanotechnology Initiative. Leading to the Next Industrial Revolution. A Report by the Interagency Working Group on Nanoscience, Engineering and Technology. 2000.
[19] Wilczewska, A. Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K. H.; Car, H. *Pharmacol. Rep.* **2012**, *64*, 1020-1037.
[20] Bamrungsap, S.; Zhao, Z.; Chen, T.; Wang, L.; Li, C.; Fu, T.; W., T. *Nanomedicine* **2012**, *7*, 1253-1271.
[21] Riehemann, K.; Schneider, S. W.; Luger, T. A.; Godin, B.; Ferrari, M.; Fuchs, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 872-897.

Algunos de los primeros nanosistemas empleados como DDS fueron desarrollados en la década de los 70 y desde entonces se han descrito una gran variedad.[22,23] Polímeros, dendrímeros, micelas o liposomas (Figura 1.3) son algunos de los muchos ejemplos que, a pesar de sus diferencias, comparten estrategias comunes que han contribuido a su enorme éxito. En líneas generales los nanosistemas para DD deben cumplir una serie de requisitos:[24-26]

- Elevada solubilidad en medio acuoso o posibilidad de presentarse en forma coloidal.
- Estar compuesto de materiales biocompatibles y que no generen respuesta inmune por parte del organismo.
- Gran capacidad de incorporación del fármaco.
- Protección física y química del fármaco.
- Aumento de la absorción del fármaco facilitando su difusión a través de las barreras biológicas. Además, es importante destacar la internalización y distribución celular, en concreto cuando la zona de acción se encuentra dentro de la célula.
- Modificación de la farmacocinética del fármaco y, por tanto, su perfil de biodistribución en el organismo, ya sea para producir un incremento en la eficacia o una disminución de los efectos adversos.

A lo largo de las últimas décadas se han identificado una serie de factores clave en el éxito de los nanosistemas para DD. En concreto, las propiedades de los materiales en la superficie, su arquitectura, posibilidad de direccionamiento (*targeting*) ya sea mediante transporte activo o pasivo, y la liberación controlada por estímulos (Figura 1.4).[12,27,28] A continuación, se explicarán con mayor detalle estos factores.

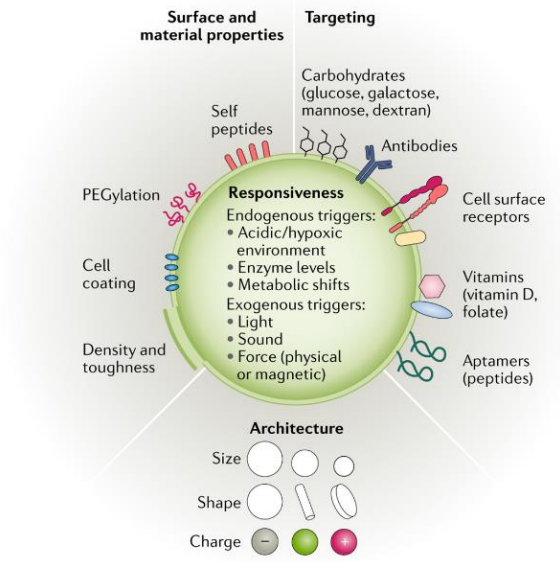


Figura 1.4. Principales factores que determinan el éxito de los DDS nanométricos. Adaptada de la referencia 12.

[22] Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238-252.
[23] Gregoriadis, G.; Swain, C. P.; Wills, E. J.; Tavill, A. S. *Lancet* **1974**, *29*, 1313-1316.
[24] Couvreur, P.; Vauthier, C. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 1417-50.
[25] Shi, J.; Votruba, A. R.; Farokhzad, O. C.; Langer, R. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3223-3230.
[26] Torchilin, V. P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1532-1555.
[27] Haag, R.; Kratz, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1198-1215.
[28] Torchilin, V. P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 302-315.

1.2.1. Modificación de la superficie de los DDS

La modificación de la superficie de los DDS puede llevarse a cabo empleando distintos materiales que le otorgan propiedades y funcionalidades específicas dependientes de sus características. Algunas de las aproximaciones más utilizadas son el recubrimiento con proteínas y anticuerpos, que pueden resultar además en una mejora de la selectividad.[29] El *cell coating* es otra estrategia que se basa en el recubrimiento de nanopartículas con membranas celulares que aportan una gran biocompatibilidad al sistema.[30,31] También se ha explorado el uso de estructuras de ADN para el recubrimiento de DDS que presentan como ventajas su elevada especificidad, baja inmunogenicidad y gran biocompatibilidad.[32,33] Por último, una de las modificaciones de la superficie de DDS más extendidas es el uso de polímeros sintéticos o de origen natural, cuyo uso permite la modificación de la estructura química de sus cadenas y por tanto el ajuste de sus propiedades. Algunos ejemplos de los polímeros más utilizados son el polietilenglicol (PEG), policaprolactona, polisorbato, ácido poliláctico, dextrano o quitosano.[34-36] A continuación se describen con mayor detalle las propiedades del si cabe, polímero más importante de todos, el PEG.

1.2.1.1. PEGuilación

El PEG es un polímero sintético, neutro, flexible, hidrófilo y biocompatible, sintetizado mediante polimerización de óxido de etileno (Figura 1.5). Es con diferencia uno de los polímeros más utilizados en biomedicina, biotecnología y farmacia desde que, en el año 1977, se llevase a cabo la primera modificación con PEG de fármacos de naturaleza proteica para conseguir un aumento en su estabilidad y tiempo de permanencia en el flujo sanguíneo.[37] Su aplicación en DDS está tan extendida, que la modificación covalente de moléculas con PEG recibe el nombre de PEGuilación.[38] Además, cabe destacar que cuenta con la aprobación de la FDA y la *European Medicines Agency* (EMA) para su uso en productos farmacéuticos.

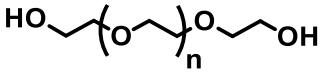


Figura 1.5. Estructura química de PEG.

[29] Dong, P.; Rakesh, K. P.; Manukumar, H. M.; Mohammed, Y. H. E.; Karthik, C. S.; Sumathi, S.; Mallu, P.; Qin, H. L. *Bioorg. Chem.* **2019**, *85*, 325-336.
[30] Fang, R. H.; Kroll, A. V.; Gao, W.; Zhang, L. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1706759-1706792.
[31] Zhen, X.; Cheng, P.; Pu, K. *Small* **2019**, *15*, 1804105-1804123.
[32] Furst, A. L.; Klass, S. H.; Francis, M. B. *Trends Biochem. Sci.* **2019**, *44*, 342-350.
[33] Kaur, H.; Bruno, J. G.; Kumar, A.; Sharma, T. K. *Theranostics* **2018**, *8*, 4016-4032.
[34] Fam, S. Y.; Chee, C. F.; Yong, C. Y.; Ho, K. L.; Mariatulqabtiah, A. R.; Tan, W. S. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 787-804.
[35] Patra, J. K.; Das, G.; Fraceto, L. F.; Campos, E. V. R.; Rodriguez-Torres, M. D. P.; Acosta-Torres, L. S.; Diaz-Torres, L. A.; Grillo, R.; Swamy, M. K.; Sharma, S.; Habtemariam, S.; Shin, H. S. *J. Nanobiotechnology* **2018**, *16*, 71-103.
[36] Pinelli, F.; Perale, G.; Rossi, F. *Gels* **2020**, *6*, 6-21.
[37] Abuchowski, A.; McCoy, J. R.; Palczuk, N. C.; van Es, T.; Davis, F. F. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3582-3586.
[38] Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288-6308.

Tabla 1.1. Listado de formulaciones PEGiladas aprobadas por la FDA.

Año	Nombre comercial	Indicación	Fármaco
1990	Andagen®	Inmunodeficiencia combinada severa	Enzima (96-126 kDa)
1994	Oncaspar®	Leucemia	Enzima (483-548 kDa)
2000	PEG-INTRON®	Hepatitis C	Proteína (31 kDa)
2001	PEGASYS®	Hepatitis C	Proteína (60 kDa)
2002	Neulasta®	Neutropenia	Proteína (39 kDa)
2003	Somavert®	Acromegalia	Proteína (42-52 kDa)
2004	Macugen®	Degeneración macular	Aptámero RNA (50 kDa)
2007	Micera®	Anemia asociada con fallo renal crónico	Citoquina (60 kDa)
2008	Cimzia®	Enfermedad de Crohn	Fragmento anticuerpo (91 kDa)
2010	Puricase1®/Krystexxa®	Gota	Enzima (540 kDa)
2010	Asclera	Varices	Dodecanol (400 Da)
2011	Sylatron®	Melanoma	Proteína (22 kDa)
2012	Omontys®	Anemia	Péptido (45 kDa)
2014	Plegridy®	Esclerosis múltiple	Proteína (44 kDa)
2014	Movantik®	Estreñimiento	Naloxona (339 Da)
2015	Adynovate®	Hemofilia A	Proteína (265 kDa)
2017	Jivi®	Hemofilia A	Proteína (234 kDa)
2017	Rebinyn®	Hemofilia B	Proteína (98 kDa)
2018	Udenyca®	Infección durante quimioterapia	Proteína (39 kDa)
2018	Palynziq®	Fenilcetonuria	Enzima (1000 kDa)
2018	Revcovi®	Déficit de adenosina desaminasa -Inmunodeficiencia combinada severa	Enzima (113 kDa)
2018	Fulphila®	Infección durante quimioterapia	Proteína (39 kDa)
2018	Asparlas®	Leucemia	Enzima (313 kDa)
2019	Esperoct®	Hemofilia A	Proteína (216 kDa)
2019	Ziextenzo®	Infección durante quimioterapia	Proteína (39 kDa)
2020	Nyvepria®	Neutropenia asociada a quimioterapia	Proteína (39 kDa)

La unión covalente de PEG a un fármaco conlleva una serie de cambios que afectan a las propiedades del conjugado final:[39-41]

- Aumento en la solubilidad en medio acuoso.
- Reducción de la respuesta inmune ya que posee un gran volumen de exclusión en disolución acuosa, lo que dificulta su reconocimiento por el sistema inmune (*stealth property*). No obstante, algunos estudios más recientes han cuestionado el uso de PEG en DDS tras haberse detectado anticuerpos anti-PEG.[42]

[39] Kolate, A.; Baradia, D.; Patil, S.; Vhora, I.; Kore, G.; Misra, A. *J. Control. Release* **2014**, *192*, 67-81.
[40] Li, S.-D.; Huang, L. *J. Control. Release* **2010**, *145*, 178-781.
[41] Shi, L.; Zhang, J.; Zhao, M.; Tang, S.; Cheng, X.; Zhang, W.; Li, W.; Liu, X.; Peng, H.; Wang, Q. *Nanoscale* **2021**, *13*, 10748-10764.
[42] Verhoef, J. J.; Anchordoquy, T. J. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2013**, *3*, 499-503.

- Reducción de la velocidad de eliminación a través del sistema reticuloendotelial.
- Repele macromoléculas como otros polímeros y proteínas, así como plaquetas o bacterias, dotando de protección al conjugado.
- Su conformación extendida y al mismo tiempo flexible lo dota de una gran movilidad.

Actualmente, existen cerca de 30 formulaciones aprobadas por la FDA y comercializadas que incorporan PEG (Tabla 1.1).[43]

1.2.2. *Targeting* de DDS

El concepto de *targeting* en DD se define como la administración dirigida o selectiva de un fármaco a su zona de acción. Es uno de los grandes objetivos de los DDS y cobra especial relevancia en el campo de la nanomedicina. Existen varias aproximaciones entre las que destacan el transporte pasivo y activo, y la liberación inducida por estímulos.

1.2.2.1. Transporte pasivo (EPR)

El transporte pasivo o efecto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) se fundamenta en el flujo y acumulación de los compuestos en el organismo aprovechando determinados fallos en su funcionamiento. Este efecto, descrito por Maeda y colaboradores en el año 1986,[44] se debe a que ciertas enfermedades, entre las que cabe destacar el cáncer, producen una serie de alteraciones en los tejidos adyacentes (inflamación, angiogénesis e hipoxia celular) que generan grandes espacios intersticiales entre las células de los capilares (Figura 1.6).

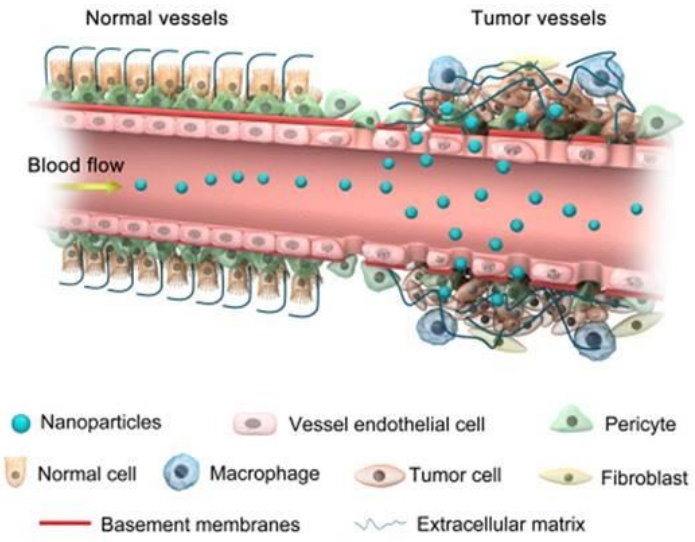


Figura 1.6. Representación esquemática del comportamiento de un nanosistema y el efecto EPR en tejido sano y un tumor. Adaptada de la referencia 45.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[43] U. S. Food and Drug Administration. https://www.fda.gov/.
[44] Matsumura, Y.; Maeda, H. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387-6392.
[45] Abdalla, A. M. E.; Xiao, L.; Ullah, M. W.; Yu, M.; Ouyang, C.; Yang, G. *Theranostics* **2018**, *8*, 533-548.

De forma general, los compuestos de bajo peso molecular son capaces de difundir a través tanto del tejido sano como del tumoral. En el caso de las macromoléculas (tamaño menor de 200 nm y peso molecular mayor de 40 kDa) su acceso a través del tejido sano está restringido, mientras que en los tejidos tumorales la capa endotelial de los capilares tiene unas cavidades con diámetros que permiten su paso. A esto se suma una deficiente circulación linfática, responsable de la eliminación de macromoléculas en tejido sano.[45,46]

El Doxil® es un nanosistema formado por doxorrubicina encapsulada dentro de un liposoma PEGilado. Se trata de uno de los DDS más efectivo para el tratamiento de algunos tipos de cáncer y su efectividad se basa en este efecto.[47] No obstante, se sabe que la eficacia de acumulación depende del tipo de tumor, de su vascularización, circulación y porosidad, por lo que esta estrategia presenta ciertas limitaciones.[48]

1.2.2.2. Transporte activo

El transporte activo representa uno de los grandes objetivos de la medicina moderna. Consiste en dirigir los DDS a un lugar específico del organismo mediante la incorporación de ligandos sobre su superficie, que permiten el reconocimiento por determinados receptores celulares y su acumulación selectiva.[49,50]

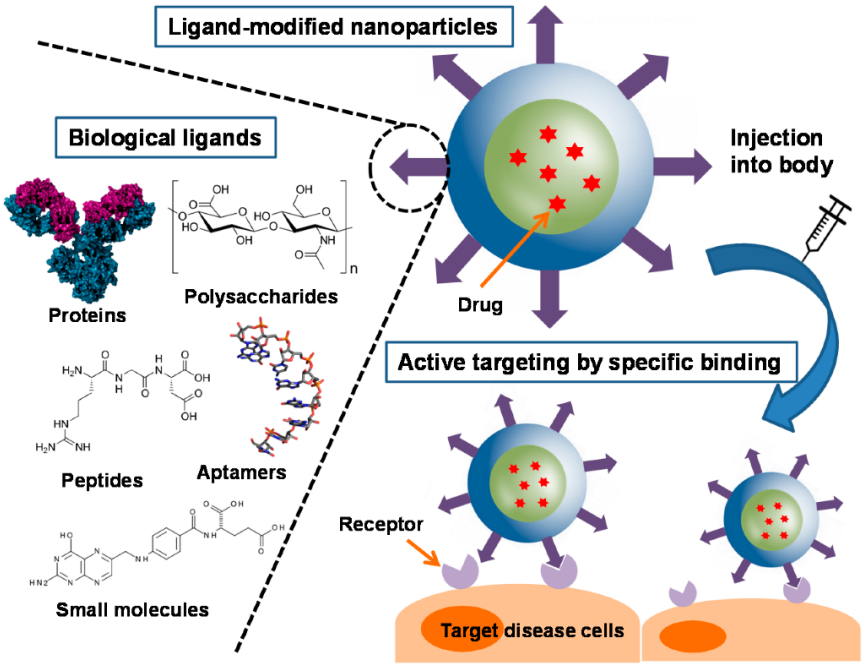


Figura 1.7. Representación esquemática del transporte activo de un DDS a través de la incorporación de distintos ligandos. Adaptada de la referencia 57.

[46] Nichols, J. W.; Bae, Y. H. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 451-464.
[47] Barenholz, Y. *J. Control. Release* **2012**, *160*, 117-34.
[48] Lee, E. S.; Na, K.; Bae, Y. H. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 325-329.
[49] Movassaghian, S.; Merkel, O. M.; Torchilin, V. P. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2015**, *7*, 691-707.
[50] Zhao, Z.; Ukidve, A.; Kim, J.; Mitragotri, S. *Cell* **2020**, *181*, 151-167.

Los ligandos más utilizados son biomoléculas como proteínas,[51] péptidos,[52] vitaminas,[48] carbohidratos,[53,54] anticuerpos,[55] y aptámeros[56]. Todos ellos son capaces de reconocer selectivamente determinados receptores presentes en los tejidos o células de interés (Figura 1.7).

En particular, un grupo de ligandos con un gran atractivo son los aptámeros, cadenas de ácidos nucleicos a menudo denominados "anticuerpos químicos", puesto que son funcionalmente comparables a los anticuerpos tradicionales, pero ofrecen ventajas como su menor tamaño, elevada estabilidad, estructura flexible, rápida producción y versatilidad.[58] Los aptámeros pueden lograr afinidades de unión similares a las de los anticuerpos, pero a diferencia de ellos pueden almacenarse fácilmente a temperatura ambiente y desnaturalizarse térmicamente de forma reversible.[59]

Una característica importante de muchos aptámeros es su capacidad de internalizar células de forma selectiva mediante unión a determinados receptores, lo que los convierte en ligandos adecuados para DDS.[60] Debido a su reducido tamaño, los aptámeros se eliminan fácilmente de la circulación sanguínea, lo que representa una importante característica para aplicaciones *in vivo*. Además, a través de la conjugación con otras moléculas de mayor tamaño como polímeros o dendrímeros, se puede regular su tiempo de circulación.[61]

Zu *et al.* exploraron el uso de nanoesferas de oro huecas cargadas con doxorrubicina y funcionalizadas con aptámeros específicos del receptor CD30 para terapia antitumoral de linfoma dirigida. En este trabajo fueron capaces de llevar a cabo *in vitro* la eliminación selectiva de células tumorales de linfoma frente a células sanas.[62]

Actualmente existen muchos sistemas con aptámeros que se encuentran en fases clínicas muy avanzadas, como por ejemplo Pegaptanib, ACR1905 y E-10030 para el tratamiento de la degeneración macular; REG1, ARC1779, NU172 y BAX499 para tratar problemas de coagulación; AS1411 y NOX-A12 que pueden tener gran aplicación como agentes antitumorales; o NOX-E36 y NOX-H94 para el tratamiento de inflamaciones severas (Figura 1.8).[63]

---

[51] Worm, D. J.; Els-Heindl, S.; Beck-Sickinger, A. G. *Pept. Sci.* **2020**, *112*, 24171-24192.
[52] Jiang, Z.; Guan, J.; Qian, J.; Zhan, C. *Biomater. Sci.* **2019**, *7*, 461-471.
[53] Medina, S. H.; Tekumalla, V.; Chevliakov, M. V.; Shewach, D. S.; Ensminger, W. D.; El-Sayed, M. E. *Biomaterials* **2011**, *32*, 4118-4129.
[54] Roy, R.; Baek, M.-G. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 291-309.
[55] Juan, A.; Cimas, F. J.; Bravo, I.; Pandiella, A.; Ocana, A.; Alonso-Moreno, C. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 802-821.
[56] Wei, H.; Zhuo, R.-X.; Zhang, X.-Z. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 503-535.
[57] Yoo, J.; Park, C.; Yi, G.; Lee, D.; Koo, H. *Cancers* **2019**, *11*, 640-652.
[58] Zhou, J.; Rossi, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 181-202.
[59] Kelly, L.; Maier, K. E.; Yan, A.; Levy, M. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6275-6288.
[60] Zhu, L.; Yang, J.; Ma, Y.; Zhu, X.; Zhang, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 1493-1497.
[61] Thevendran, R.; Sarah, S.; Tang, T. H.; Citartan, M. *J. Control. Release* **2020**, *323*, 530-548.
[62] Zhao, N.; You, J.; Zeng, Z.; Li, C.; Zu, Y. *Small* **2013**, *9*, 3477-3484.
[63] Lao, Y.-H.; Phua, K. K. L.; Leong, K. W. *ACS Nano* **2015**, *9*, 2235-2254.

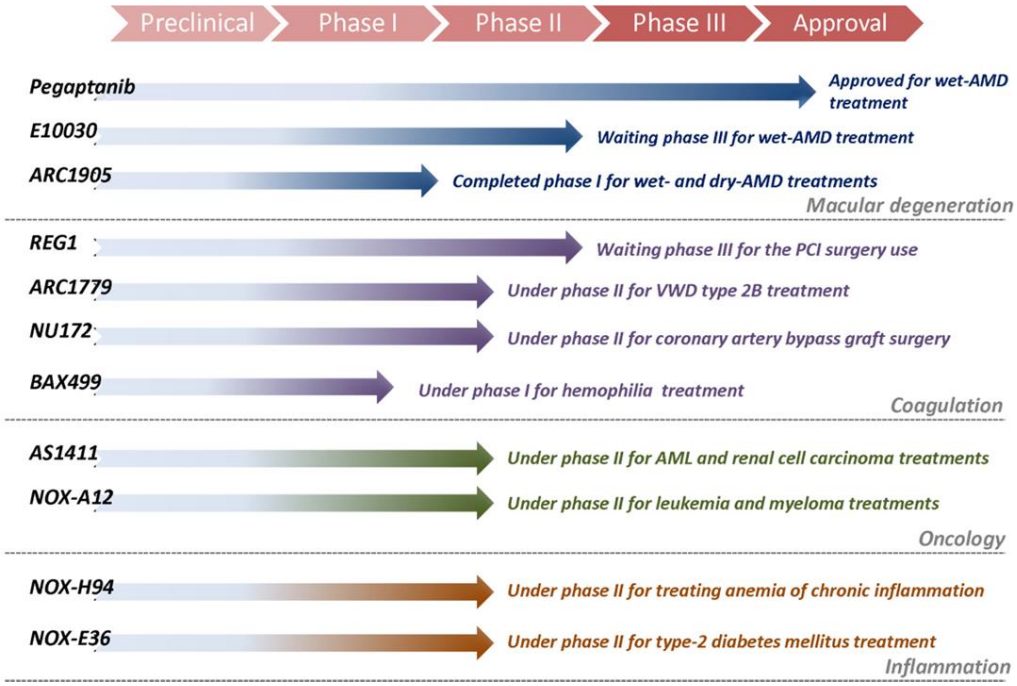


Figura 1.8. Situación actual de sistemas de aptámeros en ensayos clínicos. Adaptada de la referencia 63.

1.2.2.3. Liberación inducida por estímulos

Un último punto clave para el desarrollo de DDS es el control sobre la eficiencia y la cinética de liberación del fármaco. Una liberación tardía del fármaco se puede traducir en el desarrollo del fenómeno de resistencia adquirida al fármaco. Por el contrario, una liberación temprana puede provocar un aumento de los efectos secundarios o la disminución de la concentración óptima para el efecto deseado. Esto ha motivado el desarrollo de nuevos DDS en los que la liberación del fármaco pueda ser inducida por un estímulo, ya sea externo o interno (Figura 1.9). Así, el DDS deja de ser un vehículo pasivo y se convierte en un participante activo de la terapia.[64-68]

Dentro de los estímulos internos o endógenos podemos encontrar factores como: cambios en el pH, útil para el desarrollo de DDS capaces de liberar el fármaco como respuesta a variaciones de pH en el tracto intestinal o en compartimentos intracelulares como los lisosomas; acción enzimática, donde una enzima específica de alguna zona es capaz de degradar el transportador y liberar el fármaco; o también condiciones redox capaces de romper enlaces disulfuro responsables de anclar el fármaco al DDS.[69-71]

[64] Fleige, E.; Quadir, M. A.; Haag, R. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 866-884.
[65] Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991-1003.
[66] Fenton, O. S.; Olafson, K. N.; Pillai, P. S.; Mitchell, M. J.; Langer, R. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1705328-1705383.
[67] Sun, Y.; Davis, E. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 746-845.
[68] Torchilin, V. P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 813-827.
[69] Cook, A. B.; Decuzzi, P. *ACS Nano* **2021**, *15*, 2068-2098.
[70] Liu, M.; Du, H.; Zhang, W.; Zhai, G. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *71*, 1267-1280.
[71] Pham, S. H.; Choi, Y.; Choi, J. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 630-647.

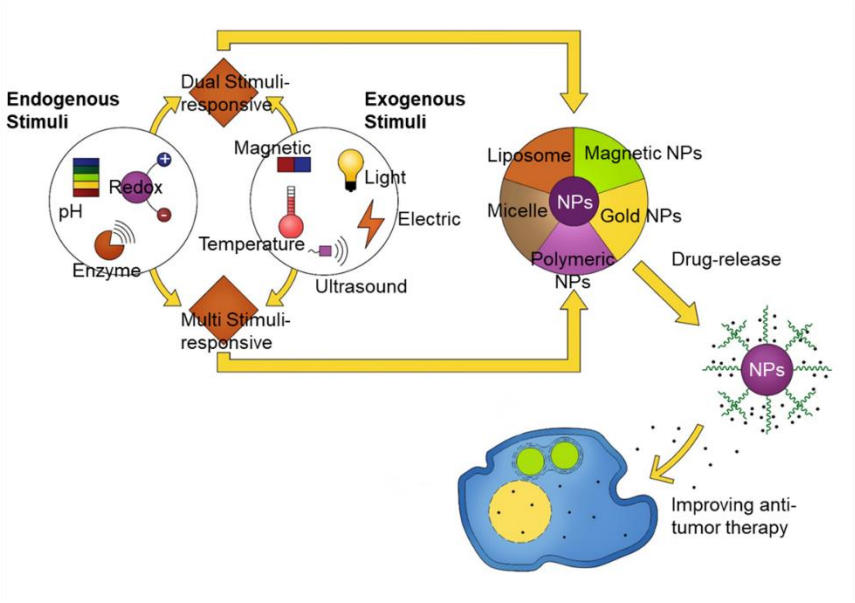


Figura 1.9. Representación esquemática de la liberación de fármacos de un DDS a través de estímulos endógenos y exógenos. Adaptada de la referencia 71.

En el grupo de estímulos externos o exógenos encontramos aquellos inducidos por un agente externo al organismo. Algunos de los más importante son: temperatura, siendo el DDS completamente estable a una temperatura corporal de 37 ºC y capaz de liberar el fármaco al aplicar calor en determinadas zonas del organismo; luz, liberando el fármaco como respuesta a la exposición de luz de una determinada longitud de onda en las regiones UV, visible y NIR; ultrasonidos, muy interesante al tratarse de una técnica no invasiva y de gran penetración en los tejidos; campos magnéticos, para dirigir los DDS que incorporen un centro metálico paramagnético hacia determinados tejidos y que también tienen gran utilidad como sistemas de imagen; o electricidad, que usando un determinado voltaje transmembrana puede provocar la aparición de poros en la membrana de la célula que favorecen la internalización del DDS.[72,73]

1.2.3. Arquitectura de DDS

Otro de los aspectos determinantes a tener en cuenta en los nanosistemas de DD es su arquitectura. Factores como el tamaño, la forma o la carga son determinantes a la hora de su interacción con las barreras biológicas o el tiempo de circulación en el organismo. Se conocen ciertas tendencias generales como que los sistemas esféricos de mayor tamaño tienen menores tiempos de circulación, mientras que sistemas tipo bastón se extravasan más fácilmente, o que sistemas con carga positiva son eliminados más rápidamente por macrófagos (Figura 1.10).[74-78]

[72] Chen, Y.; Chen, N.; Feng, X. *Int. J. Pharm.* **2021**, *592*, 120081-120093.
[73] Karimi, M.; Zangabad, P. S.; Ghasemi, A.; Amiri, M.; Bahrami, M.; Malekzad, H.; Asl, H. G.; Mahdieh, Z.; Bozorgomid, M.; Ghasemi, A.; Boyuk, M. R. R. T.; Hamblin, M. R. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 21107-21133.
[74] Albanese, A.; Tang, P. S.; Chan, W. C. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2012**, *14*, 1-16.
[75] Banerjee, A.; Qi, J.; Gogoi, R.; Wong, J.; Mitragotri, S. *J. Control. Release* **2016**, *238*, 176-185.
[76] Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 941-951.
[77] Ekladious, I.; Colson, Y. L.; Grinstaff, M. W. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2019**, *18*, 273-294.
[78] Hoshyar, N.; Gray, S.; Han, H.; Bao, G. *Nanomedicine* **2016**, *11*, 673-692.

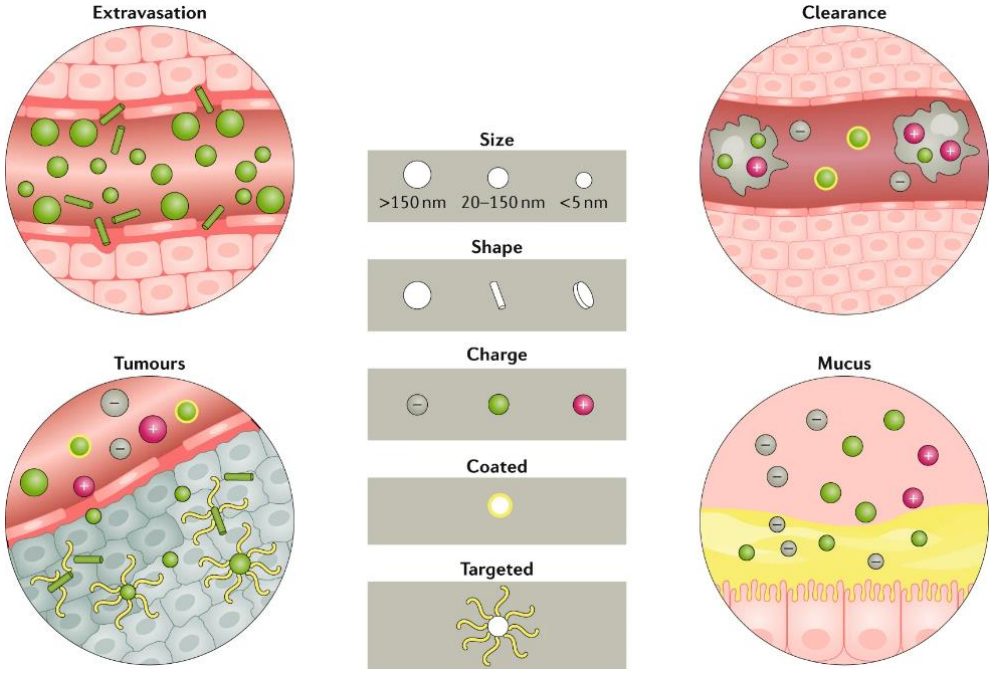


Figura 1.10. Representación esquemática de la distribución de nanopartículas en función de su arquitectura. Adaptada de la referencia 12.

A continuación, se explicarán con mayor detalle los factores principales que determinan la arquitectura de un DDS (forma, carga y tamaño), y sus aplicaciones.

1.2.3.1. Forma

La forma que presenta un DDS es una propiedad importante a la hora de interactuar con su entorno. La geometría juega un papel clave en su comportamiento, existiendo dos clases de nanosistemas de DD con propiedades diferentes, los isotrópicos y los anisotrópicos. La forma isotrópica (por ejemplo, esférica) de una nanopartícula tiende a mostrar una menor y más uniforme distribución en el organismo, mientras que la forma anisotrópica (por ejemplo, bastón o disco) puede presentar una acumulación más selectiva. Además, los tiempos de circulación de ambas formas presentan diferencias significativas, consiguiéndose mayores tiempos para las isotrópicas.[79,80]

Un estudio de Discher *et al*. del año 2012 comparó el tiempo de circulación de nanopartículas poliméricos en forma de varilla con sus homólogos esféricos y observó que presentaban un tiempo de circulación diez veces mayor.[81] De manera similar, Gratton *et al*. demostraron que la forma de las nanopartículas también influye sobre la acumulación e internalización celular donde, nanopartículas con forma filamentosa o de barra internalizan más fácilmente que las esféricas.[82]

[79] Champion, J. A.; Mitragotri, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 4930-4934.
[80] Wilhelm, S.; Tavares, A. J.; Dai, Q.; Ohta, S.; Audet, J.; Dvorak, H. F.; Chan, W. C. W. *Nat. Rev.* **2016**, *1*, 1-12.
[81] Geng, Y.; Dalhaimer, P.; Cai, S.; Tsai, R.; Tewari, M.; Minko, T.; Discher, D. E. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 249-255.
[82] Gratton, S. E. A.; Ropp, P. A.; Pohlhaus, P. D.; Luft, J. C.; Madden, V. J.; Napler, M. E.; DeSimone, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 11613-11618.

En otro estudio con nanopartículas de oro marcadas radioactivamente y ratones portadores de tumores, Xia *et al.* probaron que según la forma (esférica, disco, varilla o de cubo) la acumulación era diferente. Mientras que las partículas esféricas y con forma de disco se localizaban en la periferia del tumor, las partículas con forma de varilla y de cubo estaban uniformemente distribuidas por todo el tumor.[83]

1.2.3.2. Carga

La carga en la superficie es otra característica que ofrece la posibilidad de diseñar mejores DDS. Es bien conocido que nanopartículas cargadas positivamente sufren una rápida eliminación a través del sistema fagocítico, mientras que la carga neutra o negativa tienden a evitarlo.[84,85] Otro hecho es que las nanopartículas con carga positiva tienden a pegarse a la membrana celular cargada negativamente, lo que favorece su internalización. Cabe destacar que las nanopartículas con grupos básicos (por ejemplo, imidazol, amina o guanidinio) facilitan la salida de endosoma a través de lo que se conoce como *proton sponge effect*.[86,87]

Además, en los últimos años se ha descubierto que las nanopartículas, independientemente de su carga superficial, interaccionan con las proteínas presentes en el suero sanguíneo, recubriéndose de ellas y formando una corona proteica que posee carga superficial y propiedades diferentes a las de la nanopartícula original.[88-90]

1.2.3.3. Tamaño

Se sabe que el tamaño de las nanopartículas genera un gran impacto sobre su biodistribución y tiempo de circulación en el organismo. Los DDS que se encuentran en la escala micrométrica permanecen en el cuerpo mucho más tiempo que los que se encuentran en la escala nanométrica.[91,92]

Existen multitud de ejemplos que avalan una diferente biodistribución en función del tamaño de la nanopartícula. Para sistemas con tamaños menores de 5 nm se produce una rápida eliminación a través de los riñones,[93] mientras que si son mayores de 50-100 nm tienden a acumularse de una forma inespecífica en el hígado debido al tamaño de las fenestras vasculares.[94]

---

[83] Black, K. C. L.; Wang, Y.; Luehmann, H. P.; Cai, X.; Xing, W.; Pang, B.; Zhao, Y.; Cutler, C. S.; Wang, L. V.; Liu, Y.; Xia, Y. *ACS Nano* **2014**, *8*, 4385-4394.
[84] Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 505-515.
[85] Yamamoto, Y.; Nagasaki, Y.; Kato, Y.; Sugiyama, Y.; Kataoka, K. *J. Control. Release* **2001**, *77*, 27-38.
[86] Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J.-P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 7297-7301.
[87] Bus, T.; Traeger, A.; Schubert, U. S. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 6904-6918.
[88] Caracciolo, G.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. *Trends Biotechnol.* **2017**, *35*, 257-264.
[89] del Pino, P.; Pelaz, B.; Zhang, Q.; Maffre, P.; Nienhaus, G. U.; Parak, W. J. *Mater. Horiz.* **2014**, *1*, 301-313.
[90] Kopac, T. Int. *J. Biol. Macromol.* **2021**, *169*, 290-301.
[91] Faraji, A. H.; Wipf, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2950-2962.
[92] Yu, W.; Liu, R.; Zhou, Y.; Gao, H. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 100-116.
[93] Choi, H. S.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J. P.; Ipe, B. I.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1165-1170.
[94] Braet, F.; Wisse, E.; Bomans, P.; Frederik, P.; Geerts, W.; Koster, A.; Soon, L.; Ringer, S. *Microsc. Res. Tech.* **2007**, *70*, 230-242.

Además, partículas con tamaños superiores a los 200 nm son filtradas y retenidas en bazo y, cuando pasan a la escala de entre 2 y 5 μm, la acumulación se produce en los pulmones.[95] En conjunto, se pueden seleccionar distintos tamaños para modular la acumulación de las nanopartículas en las zonas de interés, siendo las que están en torno a los 100 nm las que tienen un mayor tiempo de circulación.

El aumento exponencial de casos de enfermedades que afectan al cerebro como el Alzheimer han despertado una gran expectación en el campo del DD. No todas las partículas son capaces de acceder al cerebro, ya que para llegar a las zonas de interés tienen que atravesar la barrera hematoencefálica, una membrana selectivamente permeable que regula el paso de moléculas desde el torrente sanguíneo al tejido cerebral. Las nanopartículas de un tamaño comprendido entre 15 y 50 nm son capaces de atravesarla, mientras que las de mayor tamaño no.[96-98]

En relación con el efecto EPR comentado anteriormente, es importante señalar la relación que existe entre el tamaño de los DDS y su capacidad de acumularse en un tejido tumoral.[44,99] Kataoka *et al.* probaron la administración de micelas de tamaños 30, 50, 70 y 100 nm a modelos animales con tumores altamente permeables como el adenocarcinoma de colon murino (C26) o el cáncer de páncreas humano (BxPC-3), y demostraron que las micelas eran capaces de penetrar en tumor. Sin embargo, cuando se probó con un tipo poco permeable y caracterizado por una baja vascularización, como el adenocarcinoma pancreático humano, tan solo las micelas de tamaños inferiores a 50 nm lograron acumularse.[100]

1.3. TIPOS DE NANOPARTÍCULAS EN DD

El término nanopartícula (NP) tiene un alcance muy amplio. Generalmente se usa para definir partículas que se encuentran en la escala nanométrica, pero también se aplica a estructuras de mayor tamaño llegando a definirse en un rango entre 1 y 1000 nm. Aunque existen muchas formas de clasificar una nanopartícula, uno de los criterios más empleados para su clasificación es el material del que se componen. Según esto, podemos encontrarnos cinco grandes categorías de nanopartículas (Figura 1.11): poliméricas, lipídicas, inorgánicas, bioinspiradas e híbridas.[101,102]

[95] Chen, L.-T.; Weiss, L. *Blood* **1973**, *41*, 529-537.
[96] Kulkarni, S. A.; Feng, S. S. *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 2512-2522.
[97] Pinheiro, R. G. R.; Coutinho, A. J.; Pinheiro, M.; Neves, A. R. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11654-11675.
[98] Terstappen, G. C.; Meyer, A. H.; Bell, R. D.; Zhang, W. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 362-383.
[99] Maeda, H. *J. Control. Release* **2012**, *164*, 138-144.
[100] Cabral, H.; Matsumoto, Y.; Mizuno, K.; Chen, Q.; Murakami, M.; Kimura, M.; Terada, Y.; Kano, M. R.; Miyazono, K.; Uesaka, M.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *Nat. Nanotechnol*. **2011**, *6*, 815-823.
[101] Harish, V.; Tewari, D.; Gaur, M.; Yadav, A. B.; Swaroop, S.; Bechelany, M.; Barhoum, A. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 457-499.
[102] Yin, L.; Zhong, Z., Introduction to Materials Processing for Biomaterials. In *Biomaterials Science*, Academic Press, 2020; pp 485-486.

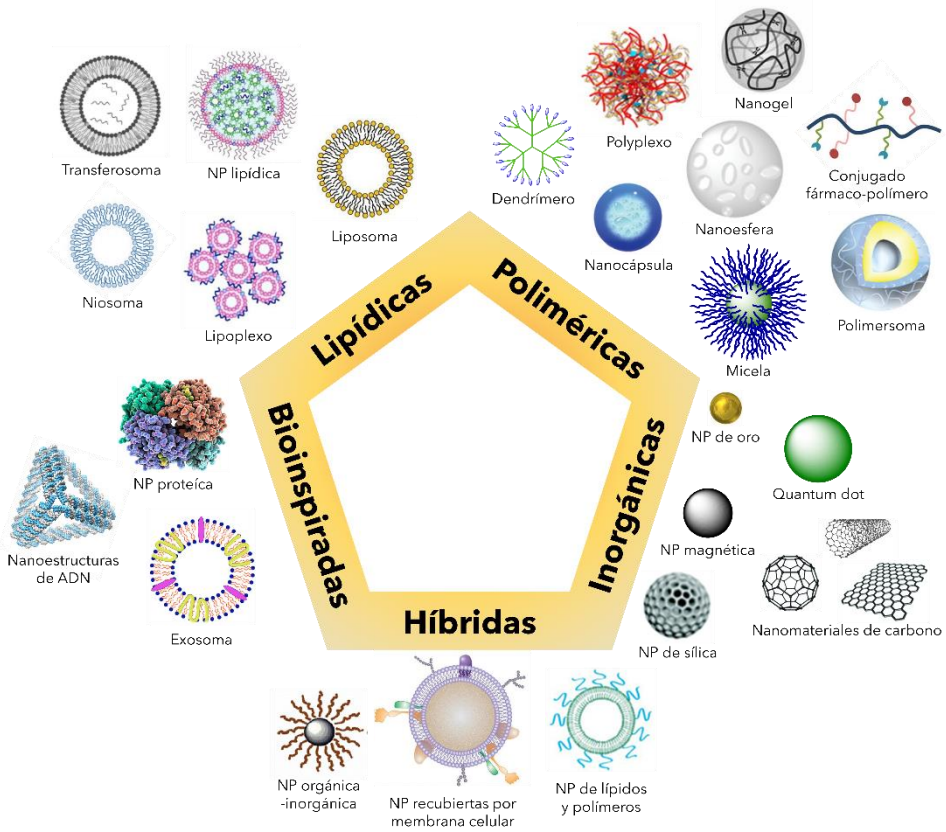


Figura 1.11. Principales tipos de nanopartículas atendiendo al material que las compone.

1.3.1. Lipídicas

Las principales nanopartículas basadas en lípidos se pueden clasificar también en otras cinco categorías en función de los componentes que las formen: liposomas, niosomas, transferosomas, nanopartículas lipídicas sólidas y lipoplexos.[103,104]

Los liposomas están formados por fosfolípidos y colesterol dispuestos en forma de bicapa que, además de presentar una baja toxicidad, otorgan a los fármacos una elevada protección, liberación controlada y buena biodistribución.[23] Los mayores inconvenientes de este tipo de nanopartículas son la deficiente encapsulación de fármacos, en especial los hidrofílicos, y la permeabilidad de su membrana.[105] Una alternativa al uso de liposomas son los niosomas, que al estar formados por tensioactivos no iónicos y colesterol, proporcionan una mayor estabilidad y vida útil. Aunque con propiedades interesantes, este tipo de nanopartículas presentan al igual que los liposomas, problemas de pérdida del fármaco y agregación de las propias partículas.[106] Otro tipo de nanopartículas lipídicas son los transferosomas, compuestos de fosfolípidos, colesterol y estabilizantes como el PEG. Presentan una mejor capacidad de encapsulación de fármacos, pero son más tóxicos, poco estables y de compleja fabricación.[107]

[103] Tapeinos, C.; Battaglini, M.; Ciofani, G. *J. Control. Release* **2017**, *264*, 306-332.
[104] Tenchov, R.; Bird, R.; Curtze, A. E.; Zhou, Q. *ACS Nano* **2021**, *15*, 16982-17015.
[105] Chacko, I. A.; Ghate, V. M.; Dsouza, L.; Lewis, S. A. *Colloids Surf. B* **2020**, *195*, 111262-111275.
[106] Duan, Y.; Dhar, A.; Patel, C.; Khimani, M.; Neogi, S.; Sharma, P.; Siva Kumar, N.; Vekariya, R. L. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 26777-26791.
[107] Jiang, T.; Wang, T.; Li, T.; Ma, Y.; Shen, S.; He, B.; Mo, R. *ACS Nano* **2018**, *12*, 9693-9701.

Las nanopartículas lipídicas sólidas se componen de tensioactivos y triglicéridos formando esferas que poseen un núcleo sólido. Muestran una mayor tendencia a la encapsulación de fármacos de carácter hidrofóbico, que son capaces de conservar durante largos períodos.[108]

Los lípidos de naturaleza catiónica tienen la habilidad de condensar ácidos nucleicos cargados negativamente como el ADN o el ARN formando lipoplexos que, debido a su carga positiva, pueden fusionarse fácilmente con la membrana celular y potenciar así la internalización del material genético.[109]

Hoy en día se comercializan más de 20 fármacos que basan su sistema de administración en nanopartículas lipídicas (Tabla 1.2).[110]

Tabla 1.2. Listado de nanopartículas lipídicas aprobadas por la FDA y la EMA.

Año	Nombre comercial	Fármaco
1995	Doxil®	Doxorrubicina
1995	Abelcet®	Anfotericina B
1996	DaunoXome®	Daunorubicina
1997	AmBisome®	Anfotericina B
1999	DepoCyt®	Citarabina
1999	Curosurf®	SP-B y SP-C
2000	AmBisome®	Anfotericina B
2000	Myocet®	Doxorrubicina
2000	Visudyne®	Verteporfina
2004	DepoDur®	Morfina
2009	Marqibo®	Vincristina
2009	Mepact®	Mifamurtida
2011	Exparel®	Bupivacaína
2013	Lipodox®	Doxorrubicina
2015	Onivyde®	Irinotecán
2017	Doxorrubicina liposomal	Doxorrubicina
2017	Nocita®	Bupivacaína
2017	Vyxeos®	Daunorrubicina y Citarabina
2018	ArikayceTM	Amikacina
2018	LipoplatinTM y NanoplatinTM	Cisplatino

[108] Salah, E.; Abouelfetouh, M. M.; Pan, Y.; Chen, D.; Xie, S. *Colloids Surf. B* **2020**, *196*, 111305-111322.
[109] Buck, J.; Grossen, P.; Cullis, P. R.; Huwyler, J.; Witzigmann, D. *ACS Nano* **2019**, *13*, 3754-3782.
[110] Shah, S.; Dhawan, V.; Holm, R.; Nagarsenker, M. S.; Perrie, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *154-155*, 102-122.

1.3.2. Inorgánicas

Las nanopartículas inorgánicas se han desarrollado más recientemente y son de especial interés para campos como la teranóstica o la terapia fototérmica debido a sus propiedades plasmónicas y optoeléctricas.[111] Dentro de este grupo, destacan las nanopartículas de oro ya que son fáciles de sintetizar con tamaños entre 1 y 150 nm, y se pueden funcionalizar fácilmente con tioles. Además, el núcleo de oro presenta una baja toxicidad y es ideal para terapia fototérmica, ya que si se irradia con luz en la llamada ventana de agua del espectro electromagnético (800-1200 nm) puede causar calentamiento local con aplicación en el tratamiento de tumores.[112]

Otro tipo de nanopartículas inorgánicas de gran importancia, especialmente como agentes de contraste en MRI (por sus siglas en inglés, *Magnetic Resonance Imaging*) son las magnéticas. Los materiales más empleados son el óxido de hierro coloidal y los óxidos de hierro super paramagnéticos (SPIO y USPIO) protegidos por un recubrimiento polimérico. Dependiendo del tipo de sal de hierro empleada, la temperatura, el pH y una serie de parámetros de reacción, se puede controlar la forma y el tamaño de la nanopartícula final, pero con un grado de polidispersión muy elevado.[113]

En este grupo también encontramos las nanopartículas de sílice que presentan una morfología uniforme y tamaño controlado, además de una alta biocompatibilidad y facilidad sintética. Estas características las convierten en nanopartículas muy interesantes para aplicaciones biológicas como el DD o la teranóstica. Se pueden clasificar en dos familias, las de núcleo y corona sólidas y las mesoporosas. Las primeras poseen gran aplicación como sondas de imagen al poderse dopar el núcleo con metales, mientras que las mesoporosas permiten una elevada carga y una liberación controlada de fármacos.[114,115]

Los *quantum dots* (QD) son también nanopartículas inorgánicas, con tamaños entre los 2 y los 10 nm. Están compuestos de elementos semiconductores del grupo II y VI (p. ej. CdSe y CdTe) o del grupo III y V (p. ej. InP e InAs) recubiertos de óxido de trioctilfosfina, que provoca insolubilidad en agua, lo que limita sus aplicaciones biológicas. Estudios más recientes han desarrollado QD recubiertos con ligandos más hidrofílicos o han abordado este problema encapsulándolos con moléculas anfifílicas, lo que ha permitido el uso de estas nanopartículas para la obtención de imágenes o la administración de fármacos.[116-118]

---

[111] Giner-Casares, J. J.; Henriksen-Lacey, M.; Coronado-Puchau, M.; Liz-Marzán, L. M. *Mater. Today* **2016**, *19*, 19-28.
[112] Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293-346.
[113] Gloag, L.; Mehdipour, M.; Chen, D.; Tilley, R. D.; Gooding, J. J. *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1904385-1904410.
[114] Croissant, J. G.; Butler, K. S.; Zink, J. I.; Brinker, C. J. *Nat. Rev. Mater.* **2020**, *5*, 886-909.
[115] Mamaeva, V.; Sahlgren, C.; Linden, M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 689-702.
[116] Dahan, M.; Lévi, S.; Luccardini, C.; Rostaing, P.; Riveau, B.; Triller, A. *Science* **2003**, *302*, 442-445.
[117] Farzin, M. A.; Abdoos, H. *Talanta* **2021**, *224*, 121828-121850.
[118] Marchuk, K.; Guo, Y.; Sun, W.; Vela, J.; Fang, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6108-6111.

Por último, dentro de los nanomateriales de carbono existen multitud de tipos como, por ejemplo, el grafeno, los nanotubos de carbono, los QDs de carbono, o los fullerenos. A su vez, dependiendo de la estructura que tengan, presentan características muy diferentes y de gran interés para la biodetección, DD o ingeniería de tejidos. Sin embargo, este tipo de nanomateriales presentan problemas de toxicidad lo que limita su aplicación clínica.[119-121]

1.3.3. Bioinspiradas

Las nanopartículas bioinspiradas están diseñadas para mejorar la biocompatibilidad y la selectividad del sistema. Se sabe que recubriendo nanopartículas con membranas biológicas se consigue aumentar su tiempo de circulación. Dentro de esta clasificación de nanopartículas nos encontramos tres grupos principales: exosomas, nanopartículas de proteínas y nanoestructuras de ADN.[122,123]

Los exosomas son vesículas derivadas de las células con un tamaño entre 30 y 100 nm, formados en su mayoría por los componentes de la membrana celular como fosfolípidos, colesterol o proteínas de membrana, siendo estas últimas de especial relevancia ya que están implicadas en el transporte y la fusión de membranas.[124,125] Se obtienen a partir de fluidos biológicos y se pueden diseñar para la entrega de diversas cargas como ARN, ADN o agentes quimioterapéuticos e inmunomoduladores. Poseen, además, la capacidad de dirigir su entrega a zonas de interés.[126]

Dentro de las nanopartículas bioinspiradas destaca también el grupo de las nanopartículas de proteínas. Se caracterizan por su baja toxicidad, biodegradabilidad, fácil metabolismo, alta biocompatibilidad y baja respuesta inmune. El tamaño se puede modificar fácilmente a través de cambios en el pH, la fuerza iónica y la temperatura. Además, su funcionalización covalente a través de la incorporación de ligandos es muy sencilla debido a la abundancia de grupos reactivos (carboxilo y amino) en su superficie.[127-129]

---

[119] Bhattacharya, K.; Mukherjee, S. P.; Gallud, A.; Burkert, S. C.; Bistarelli, S.; Bellucci, S.; Bottini, M.; Star, A.; Fadeel, B. *Nanomedicine* **2016**, *12*, 333-351.
[120] Hwang, J. Y.; Shin, U. S.; Jang, W. C.; Hyun, J. K.; Wall, I. B.; Kim, H. W. *Nanoscale* **2013**, *5*, 487-497.
[121]. Siposova, K.; Petrenko, V. I.; Ivankov, O. I.; Musatov, A.; Bulavin, L. A.; Avdeev, M. V.; Kyzyma, O. A. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 32410-32419.
[122] Gdowski, A. S.; Lampe, J. B.; Lin, V. J. T.; Joshi, R.; Wang, Y. C.; Mukerjee, A.; Vishwanatha, J. K.; Ranjan, A. P. *ACS Appl. Nano Mater.* **2019**, *2*, 6249-6257.
[123] Parodi, A.; Molinaro, R.; Sushnitha, M.; Evangelopoulos, M.; Martinez, J. O.; Arrighetti, N.; Corbo, C.; Tasciotti, E. *Biomaterials* **2017**, *147*, 155-168.
[124] Kalluri, R.; LeBleu, V. S. *Science* **2020**, *367*, 6977-6993.
[125] van der Pol, E.; Boing, A. N.; Harrison, P.; Sturk, A.; Nieuwland, R. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 676-705.
[126] Li, P.; Kaslan, M.; Lee, S. H.; Yao, J.; Gao, Z. *Theranostics* **2017**, *7*, 789-804.
[127] Habibi, N.; Mauser, A.; Ko, Y.; Lahann, J. *Adv. Sci.* **2022**, *9*, 2104012-2104045.
[128] Hong, S.; Choi, D. W.; Kim, H. N.; Park, C. G.; Lee, W.; Park, H. H. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 604-632.
[129] Kianfar, E. *J. Nanobiotechnol.* **2021**, *19*, 159-190.

El último grupo de gran relevancia son las nanoestructuras de ADN. La capacidad de autoensamblaje única del ADN permite el diseño de nanoestructuras uniformes con geometrías y topologías bien definidas, lo que ha atraído la atención de campos como la biotecnología y biomedicina para desarrollar nuevas herramientas de detección o para DD. Dependiendo de la estructura que presente el ADN, podemos hablar de nanogeles, nanoesferas, origami, etc.[130-133]

A pesar de las ventajas descritas, tanto las nanopartículas de proteínas como las nanoestructuras de ADN presentan una gran limitación, son extremadamente sensibles a la acción de enzimas proteolíticas.

1.3.4. Híbridas

Dentro de este grupo se engloban las nanopartículas formadas por combinación de dos o más tipos de nanopartículas, tratando de buscar algún efecto sinérgico. Destacan varios ejemplos como las nanopartículas recubiertas de membrana celular, orgánicas-inorgánicas y lipídicas-poliméricas.[134-136] Para la obtención de las primeras se parte de una nanopartícula determinada y se recubre de una membrana celular, que imita las propiedades de la célula de origen. Esto le otorga propiedades típicas de la membrana, como biocompatibilidad o selectividad, manteniendo intacta la función de la nanopartícula de origen.[137]

De la combinación de polímeros y nanopartículas inorgánicas nacen las nanopartículas orgánicas-inorgánicas. No solo aúnan las propiedades ópticas, magnéticas y electrónicas típicas de nanopartículas inorgánicas con la mejor solubilidad, estabilidad y biocompatibilidad de las poliméricas, sino que también exhiben ventajas únicas de la combinación de ambas. La preparación de este tipo de sistemas se puede llevar a cabo a través de una conjugación covalente o no covalente. Un ejemplo de conjugación covalente es la incorporación de un polímero como el PEG sobre la superficie de una nanopartícula metálica. La conjugación no covalente se puede llevar a cabo mediante interacción electrostática, nanoprecipitación, autoensamblaje supramolecular, microfluídica, recubrimiento con un lípido o una membrana celular, etc.[138,139]

[130] Fan, Q.; He, Z.; Xiong, J.; Chao, J. *ChemPlusChem* **2022**, *87*, 202100548-202100560.
[131] Guo, Y.; Tang, J.; Yao, C.; Yang, D. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2022**, *14*, 1753-1769.
[132] Hu, Q.; Li, H.; Wang, L.; Gu, H.; Fan, C. *Chem. Rev.* **2018**, *119*, 6459-6506.
[133] Pitikultham, P.; Wang, Z.; Wang, Y.; Shang, Y.; Jiang, Q.; Ding, B. *ChemMedChem* **2022**, *17*, 202100635-202100645.
[134] Ge, J.; Neofytou, E.; Lei, J.; Beygui, R. E.; Zare, R. N. *Small* **2012**, *8*, 3573-3578.
[135] Jiang, L.; Lee, H. W.; Loo, S. C. J. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 8497-8517.
[136] Sailor, M. J.; Park, J. H. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3779-3802.
[137] Hu, C. M.; Zhang, L.; Aryal, S.; Cheung, C.; Fang, R. H.; Zhang, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 10980-10985.
[138] Chen, G.; Qian, Y.; Zhang, H.; Ullah, A.; He, X.; Zhou, Z.; Fenniri, H.; Shen, J. *Appl. Mater. Today* **2021**, *23*, 101003-101025.
[139] Czarnecki, S.; Bertin, A. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 3354-3373.

El último gran grupo de nanopartículas híbridas resulta de la combinación de polímeros y lípidos, lo que confiere al sistema gran versatilidad para DD. Este tipo de sistemas se caracterizan por su elevada estabilidad, biocompatibilidad y alta capacidad de fusión con membranas biológicas. Todo esto debido a la amplia selección tanto de polímeros como de lípidos que se pueden emplear, así como al proceso de fabricación simple y adaptable a cada fármaco. Dependiendo de su estructura y método de ensamblaje, se pueden clasificar en dos tipos: de matriz monolítica o sistemas tipo *core*-corona.[140-142]

1.3.5. Poliméricas

Como su nombre indica, todas aquellas nanopartículas que se basan en el uso de polímeros conforman este último grupo de la clasificación. Una de las principales características que comparten estos sistemas es la versatilidad intrínseca al uso de distintos tipos de polímeros, pudiendo llegar a modularse aspectos como la solubilidad, biocompatibilidad, capacidad de incorporación de fármacos, farmacocinética o selectividad de la nanopartícula, entre otros muchos.[143-144]

Uno de los primeros sistemas de este tipo, y el más simple de ellos, lo describió Jatzkewitz en el año 1955 cuando desarrolló un conjugado polímero-fármaco para la administración de mescalina.[145] Este sistema, tan sencillo como un fármaco unido directamente a un polímero dio pie al desarrollo de una cantidad enorme de nuevos DDS basados en polímeros (nanogeles, nanocápsulas, micelas, polimerosomas, dendrímeros, etc.), que se describirán a continuación.

Los nanogeles son redes tridimensionales en la escala nanométrica formadas por polímeros hidrofílicos entrecruzados. Poseen una serie de ventajas que los hacen indicados para la encapsulación de biomoléculas y fármacos hidrofílicos: alto contenido en agua, fácil carga y protección de fármacos y biomoléculas, gran sensibilidad frente a estímulos y liberación controlada de la carga. El tamaño, la carga y la porosidad de los nanogeles pueden ajustarse fácilmente introduciendo modificaciones en el polímero o el agente de entrecruzamiento que los forma. Aunque su uso está especialmente orientado a DDS para tratamientos transdérmicos y oftalmológicos, este tipo de sistemas están limitados por la difusión del fármaco hacia el exterior del nanogel.[146-149]

---

[140] Dave, V.; Tak, K.; Sohgaura, A.; Gupta, A.; Sadhu, V.; Reddy, K. R. *J. Microbiol. Methods* **2019**, *160*, 130-142.
[141] Raemdonck, K.; Braeckmans, K.; Demeester, J.; De Smedt, S. C. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 444-472.
[142] Zhang, R. X.; Ahmed, T.; Li, L. Y.; Li, J.; Abbasi, A. Z.; Wu, X. Y. *Nanoscale* **2017**, *9*, 1334-1355.
[143] Duncan, R. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 371-380.
[144] Duncan, R.; Vicent, M. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 60-70.
[145] Jatzkewitz, H. Z. *Naturforsch*. **1955**, *10b*, 27-31.
[146] Molina, M.; Asadian-Birjand, M.; Balach, J.; Bergueiro, J.; Miceli, E.; Calderon, M. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 6161-6186.
[147] Preman, N. K.; Jain, S.; Johnson, R. P. *ACS Omega* **2021**, *6*, 5075-5090.
[148] Sivaram, A. J.; Rajitha, P.; Maya, S.; Jayakumar, R.; Sabitha, M. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2015**, *7*, 509-533.
[149] Yin, Y.; Hu, B.; Yuan, X.; Cai, L.; Gao, H.; Yang, Q. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 290-314.

Un sistema parecido son las nanocápsulas, formadas por un núcleo líquido (oleoso o acuoso, dónde se almacena el fármaco) recubierto de un polímero. Estos sistemas presentan como ventaja la necesidad de una menor cantidad de polímero en su preparación, pero también pueden sufrir procesos de migración del fármaco al exterior.[150,151]

Las nanoesferas son nanopartículas sólidas formadas por polímeros hidrofóbicos, estabilizados a través del uso de tensioactivos. Su uso como DDS está restringido a fármacos hidrofóbicos, ya que se acomodan en la matriz sólida del interior y su tasa de liberación es muy baja.[152]

Otro grupo importante de nanopartículas poliméricas son los polimerosomas. Se trata de nanopartículas muy parecidas a los liposomas pero que presentan una mayor estabilidad y están formadas por el autoensamblaje de polímeros anfifílicos. Generalmente la membrana es una bicapa compuesta por una corona hidrófila con un interior hidrófobo, pero dependiendo del polímero empleado y de las regiones que posea, se pueden obtener otras distribuciones. En cuanto a las aplicaciones como DDS, los polimerosomas son más estables y permanecen mayores tiempos en circulación sanguínea que los liposomas. Además, son capaces de encapsular compuestos hidrofílicos, hidrofóbicos o anfifílicos gracias a la naturaleza de su membrana, pero esto a su vez perjudica su liberación y la permeabilidad del sistema.[153-156]

Los dos últimos grandes grupos de nanopartículas poliméricas y objeto de estudio en esta Tesis Doctoral son los polímeros dendríticos y las micelas poliméricas. Dentro de los polímeros dendríticos se encuentran los dendrímeros y copolímeros de bloque dendríticos.

1.3.5.1. Dendrímeros

Los dendrímeros son una clase de polímeros sintéticos muy ramificados de los que se tiene constancia desde el año 1941, cuando Flory sugirió la posibilidad de sintetizar polímeros ramificados a través de monómeros capaces de reaccionar por varios puntos generando redes infinitas, una teoría que no fue capaz de llevar a la práctica.[157] Años después, en 1978, Vögtle describió sus *cascade molecules* siendo esta la primera síntesis de dendrímeros descrita en bibliografía.[158] Pocos años más tarde, en 1985, Newkome y Tomalia también describieron en trabajos independientes nuevas síntesis de dendrímeros, pero mientras Newkome los nombró como *arborols*, Tomalia acuñó el término de *dendrímero*.[159,160]

[150] Deng, S.; Gigliobianco, M. R.; Censi, R.; Di Martino, P. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 847-882.
[151] Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. *Int. J. Pharm.* **2010**, *385*, 113-142.
[152] Boltnarova, B.; Kubackova, J.; Skoda, J.; Stefela, A.; Smekalova, M.; Svacinova, P.; Pavkova, I.; Dittrich, M.; Scherman, D.; Zbytovska, J.; Pavek, P.; Holas, O. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 749-763.
[153] Baghbanbashi, M.; Kakkar, A. *Mol. Pharm.* **2022**, *19*, 1687-1703.
[154] Bej, R.; Achazi, K.; Haag, R.; Ghosh, S. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 3353-3363.
[155] Brinkhuis, R. P.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M. *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1449-1462.
[156] Tanner, P.; Baumann, P.; Enea, R.; Onaca, O.; Palivan, C.; Meier, W. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1039-1049.
[157] Flory, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 3083-3090.
[158] Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. *Synthesis* **1978**, *2*, 155-158.
[159] Newkome, G. R.; Yao, Z.; Baker, G. R.; Gupta, V. K. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003-2004.
[160] Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117-132.

La estructura de los dendrímeros recuerda a la de un árbol, de ahí que su nombre derive de los términos griegos *dendron* que significa "árbol" y *meros* que significa "parte". Este tipo de polímeros sintéticos presentan ciertas características y propiedades muy interesantes, en especial como DDS. Al contrario que los polímeros clásicos, los dendrímeros son completamente monodispersos, presentando estructuras globulares con una arquitectura tridimensional muy ramificada, compuesta de unidades de repetición. Se pueden diferenciar tres dominios (Figura 1.12):

- Núcleo o *core*. Constituye el centro del dendrímero desde el que nacen las ramificaciones; es responsable de la forma tridimensional del dendrímero.
- Interior. Está formado por el conjunto de ramificaciones o dendrones. Cuando los dendrones no se hayan unidos a un núcleo central, el lugar donde empieza la ramificación o punto divergente, se denomina punto focal. La composición química y la arquitectura de estos dendrones determinará las propiedades del dendrímero para la encapsulación de fármacos. Las capas de ramificaciones o unidades de repetición que se encuentren en un mismo nivel reciben el nombre de generaciones (G).
- Periferia. Se trata de la parte más externa y es la que le aporta su carácter multivalente, además de poder ser funcionalizada para dotar al dendrímero de determinadas propiedades físicas, químicas o biológicas.

Dada su estructura, el tamaño de los dendrímeros aumenta de una forma lineal con cada generación, mientras que los grupos de la periferia lo hacen de forma exponencial, pudiendo generarse cierta congestión estérica en la superficie. Es por esto que los dendrímeros de generaciones bajas son generalmente más abiertos y flexibles, mientras que los de mayores generaciones tienden a tener estructuras mucho más densas y compactas.[161]

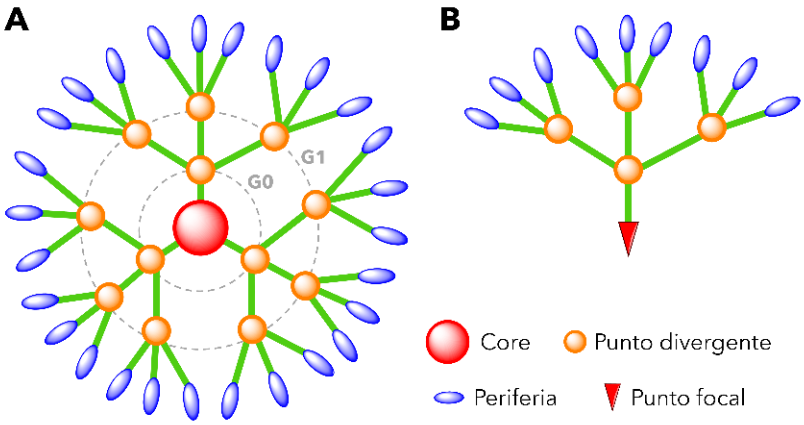


Figura 1.12. Representación esquemática de un dendrímero (**A**) y un dendrón (**B**) con sus principales dominios.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[161] Rolland, O.; Turrin, C.-O.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P. *New J. Chem.* **2009**, *33*, 1809-1824.

Una de las características más importantes de los dendrímeros es su carácter monodisperso. A diferencia de los polímeros tradicionales, la síntesis de dendrímeros se lleva a cabo generación a generación, a través de etapas consecutivas de activación y crecimiento. En general, la síntesis de dendrímeros puede efectuarse siguiendo diferentes estrategias sintéticas, entre las que destacan la convergente y la divergente (Figura 1.13).[162]

La síntesis divergente (Figura 1.13A) comienza con una molécula polifuncional que actúa de núcleo, sobre la que se van creciendo las generaciones del dendrímero mediante una secuencia repetitiva de dos reacciones, la activación de los grupos funcionales de la periferia del dendrímero y su posterior ensamblaje con nuevas unidades de repetición.[158-160] Esta estrategia presenta limitaciones puesto que, a medida que la generación del dendrímero crece, también crece el impedimento estérico de los grupos de la periferia, pudiendo llegar a impedir la reacción lo que conduciría a dendrímeros incompletos. En los últimos años se ha tratado de solucionar este problema a través del uso de reacciones más eficientes como las que proporciona la química *click*.[163,164]

En la síntesis convergente (Figura 1.13B) se sintetizan dendrones por medio de reacciones de activación y crecimiento, para posteriormente, unirlos a una molécula polifuncional que actúa de núcleo. La principal ventaja de esta estrategia es la fácil separación entre el dendrímero final y los dendrones de partida. No obstante, la síntesis de dendrímeros de generaciones altas resulta muy complicada.[165]

Además, existen otros tipos de síntesis como la de doble paso, que combina las síntesis convergente y divergente, la doble exponencial o la basada en hipermonómeros.[166,167]

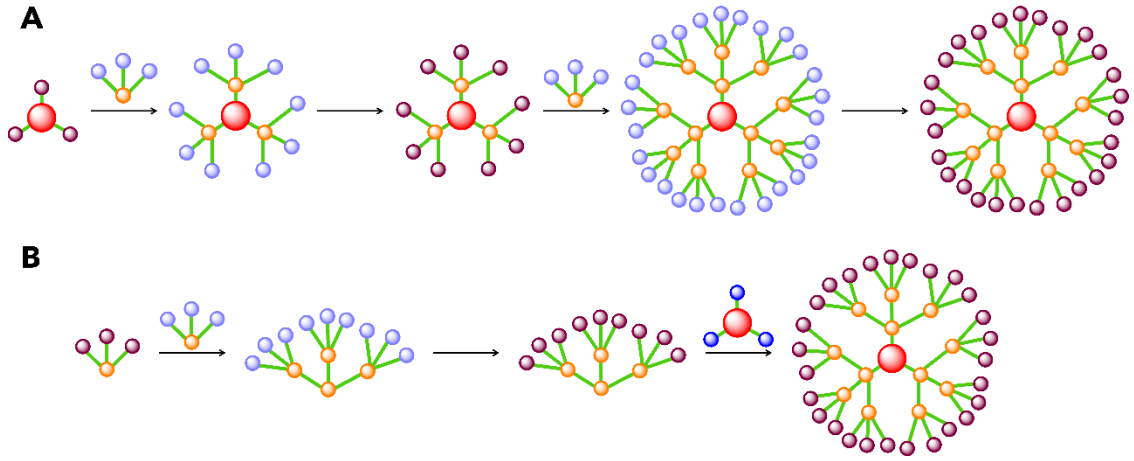


Figura 1.13. Esquema de una síntesis de dendrímeros divergente (**A**) y convergente (**B**).

[162] Mintzer, M. A.; Grinstaff, M. W. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 173-190.
[163] Amaral, S. P.; Correa, J.; Fernandez-Megia, E. *Green Chem.* **2022**, *24*, 4897-4901.
[164] Geng, Z.; Shin, J. J.; Xi, Y.; Hawker, C. J. *J. Polym. Sci.* **2021**, *59*, 963-1042.
[165] Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638-7647.
[166] Kawaguchi, T.; Walker, K. L.; Wilkins, C. L.; Moore, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2159-2165.
[167] Wooley, K. L.; Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1994**, *33*, 82-85.

Existe un gran número de familias de dendrímeros y cada una tiene un nombre que generalmente deriva del de su unidad de repetición. Algunos de los dendrímeros más conocidos son los PPI (propileno imina), PAMAM (poliamidoamina), PLLD (polilisina), Bis-MPA (ácido 2,2-bis(hidroximetil) propanoico), PEI (polietilenimina) y poli(benziléter).[165,168-171]

Una familia de especial relevancia para esta Tesis Doctoral es la de los dendrímeros GATG (*Gallic Acid-Triethylene Glycol*), en los que la unidad de repetición está constituida por ácido gálico sobre el que se unen tres unidades de trietilenglicol con un extremo azida (Figura 1.14). Su síntesis, descrita por Roy *et al.* y mejorada por nuestro grupo de investigación, se basa en el crecimiento del dendrímero a través de la formación de un enlace amida entre una amina terminal y el ácido de la unidad de repetición, para posteriormente reducir los grupos azida de la periferia y continuar con el crecimiento.[172-175]

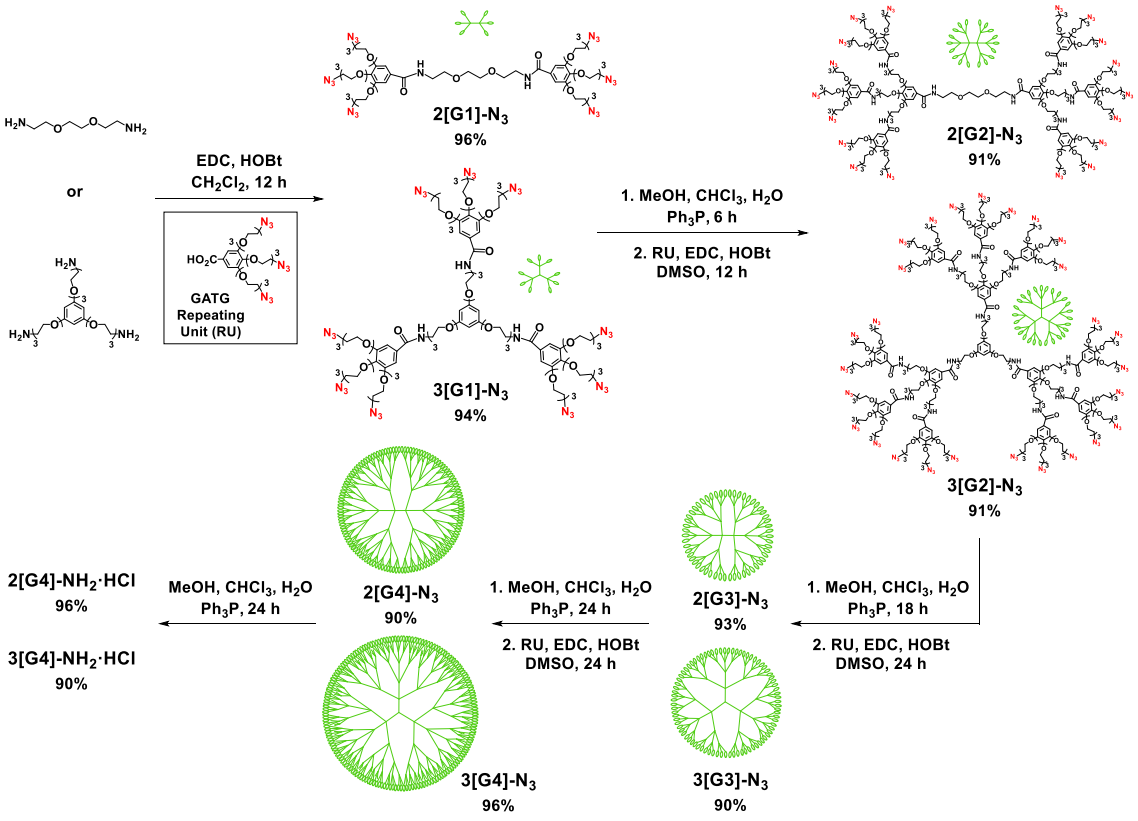


Figura 1.14. Síntesis de dos familias de dendrímeros GATG. Adaptada de la referencia 172.

[168] Ihre, H.; Hult, A.; Söderlind, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6388-6395.
[169] Launay, N.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P. *J. Organomet. Chem.* **1996**, *529*, 51-58.
[170] van der Made, A. W.; van Leeuwen, P. W. N. M.; de Wilde, J. C.; Brandes, R. A. C. *Adv. Mater.* **1993**, *5*, 466-468.
[171] Yemul, O.; Imae, T. *Colloid Polym. Sci.* **2008**, *286*, 747-752.
[172] Amaral, S. P.; Tawara, M. H.; Fernandez-Villamarin, M.; Borrajo, E.; Martinez-Costas, J.; Vidal, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 5273-5277.
[173] Amaral, S. P.; Fernandez-Villamarin, M.; Correa, J.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4522-4525.
[174] Meunier, S. J.; Wu, Q.; Wang, S.-N.; Roy, R. *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 1472-1482.
[175] Fernandez-Megia, E.; Correa, J.; Rodríguez-Meizoso, I.; Riguera, R. *Macromolecules* **2006**, *39*, 2113-2120.

Los dendrímeros de esta familia se caracterizan por su elevada solubilidad, facilidad de modulación y funcionalización, ya sea a través de las azidas periféricas o las aminas producto de su reducción.[175-178]

Un elevado control sobre la síntesis de dendrímeros permite manipular con precisión muchos parámetros como su peso molecular, composición química o arquitectura, lo que facilita controlar factores como la biocompatibilidad o la farmacocinética. Por ello, los dendrímeros tienen multitud de aplicaciones en campos tan diversos como la catálisis, nuevos materiales, tratamiento de residuos o como sensores.[179] Una de sus aplicaciones con mayor impacto es en el campo de la nanomedicina, donde se conocen aplicaciones como fármacos antivirales y antimicrobianos, en reparación de tejidos, portadores de fármacos y biomoléculas (ADN, ARN y proteínas) o agentes de contraste en MRI (Figura 1.15).[180-186]

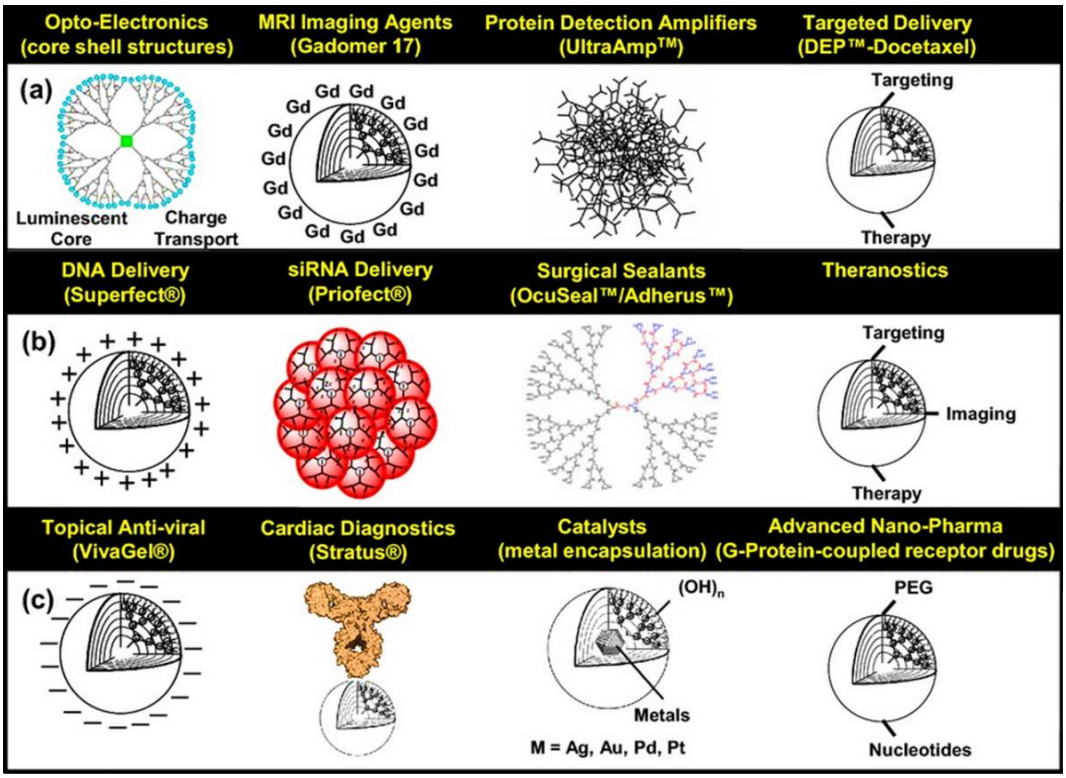


Figura 1.15. Esquema de las principales aplicaciones en nanomedicina de los dendrímeros. Adaptada de la referencia 186.

[176] Leire, E.; Amaral, S. P.; Louzao, I.; Winzer, K.; Alexander, C.; Fernandez-Megia, E.; Fernandez-Trillo, F. *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 998-1006.
[177] Okuro, K.; Kinbara, K.; Tsumoto, K.; Ishii, N.; Aida, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1626-1627.
[178] Suzuki, Y.; Okuro, K.; Takeuchi, T.; Aida, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15273-15276.
[179] Nikzamir, M.; Hanifehpour, Y.; Akbarzadeh, A.; Panahi, Y. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2021**, *31*, 2246-2261.
[180] Ambekar, R. S.; Choudhary, M.; Kandasubramanian, B. *Eur. Polym. J.* **2020**, *126*, 109546-109560.
[181] Astruc, D.; Boisselier, E.; Ornelas, C. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1857-1959.
[182] Dias, A. P.; da Silva Santos, S.; da Silva, J. V.; Parise-Filho, R.; Igne Ferreira, E.; Seoud, O. E.; Giarolla, J. *Int. J. Pharm.* **2020**, *573*, 118814-118836.
[183] Karatas, O.; Keyikoglu, R.; Atalay Gengec, N.; Vatanpour, V.; Khataee, A. *Mater. Today Chem.* **2022**, *23*, 100683-100710.
[184] Lee, C. C.; MacKay, J. A.; Frechet, J. M. J.; Szoka, F. C. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1517-1526.
[185] Liko, F.; Hindre, F.; Fernandez-Megia, E. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 3103-3114.
[186] Kannan, R. M.; Nance, E.; Kannan, S.; Tomalia, D. A. *J. Intern. Med.* **2014**, *276*, 579-617.

La terapia génica es un campo donde los dendrímeros presentan gran aplicación como vectores no virales de ADN y ARN.[187] Klajnert-Maculewicz *et al.* han descrito dendrímeros basados en lisina para la transfección de plásmidos en modelos de líneas celulares humanas como HeLa (adenocarcinoma de cuello uterino) y HMEC-1 (adenocarcinoma endotelial microvascular) con prometedores resultados.[188]
También se han descrito multitud de ejemplos de dendrímeros como agentes de contraste en MRI. La incorporación de agentes quelantes como DOTA o DTPA en la superficie de dendrímeros ha permitido la complejación de distintos metales paramagnéticos como gadolinio, manganeso o disprosio.[189] Tratando de evitar la incorporación de metales que puedan ser tóxicos para el organismo, en los últimos años, Vidal-Gancedo *et al.* han desarrollado dendrímeros radicales como agentes de contraste alternativos con unas propiedades que los han convertido en prometedores candidatos para MRI.[190]

Se sabe que la actividad antibacteriana de moléculas de bajo peso molecular aumenta cuando se encuentran ancladas a sistemas multivalentes. Los dendrímeros representan una estructura única sobre la que explotar su multivalencia en el desarrollo de sistemas antivirales y antibacterianos.[176] Kakkar *et al.* han descrito el efecto de la generación y estructura de sistemas dendríticos sobre la eficacia como agentes bactericidas.[191]

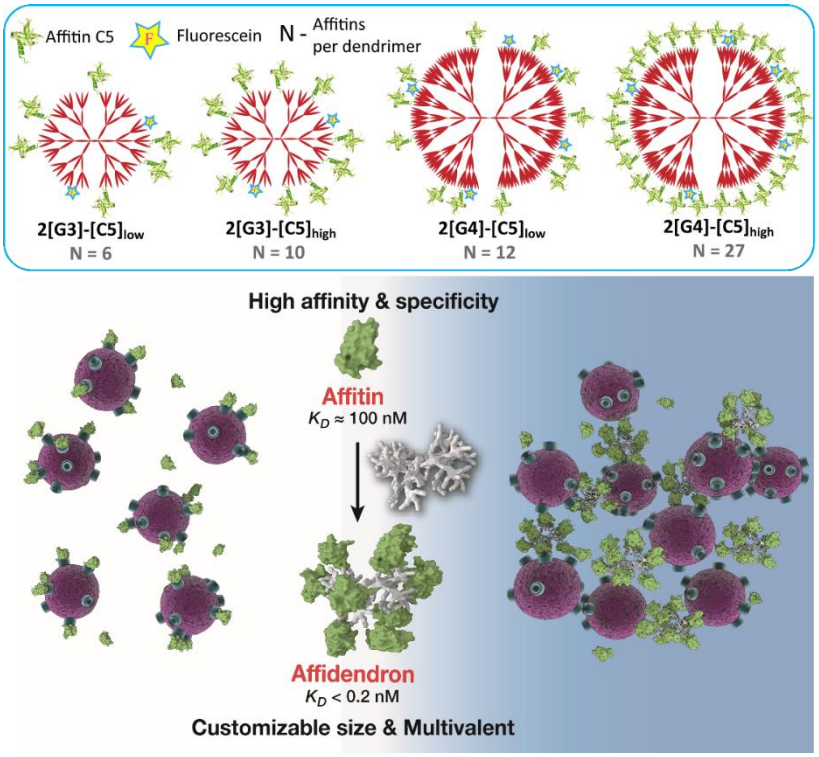


Figura 1.16. Representación esquemática de affidendrons de dos generaciones distintas y su mejor afinidad y especificidad que la affitina monovalente. Adaptada de la referencia 192.

[187] Hu, J.; Hu, K.; Cheng, Y. *Acta Biomater.* **2016**, *35*, 1-11.
[188] Gorzkiewicz, M.; Konopka, M.; Janaszewska, A.; Tarasenko, I. I.; Sheveleva, N. N.; Gajek, A.; Neelov, I. M.; Klajnert-Maculewicz, B. *Bioorg. Chem.* **2020**, *95*, 103504-103514.
[189] McMahon, M. T.; Bulte, J. W. M. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2018**, *10*, 1496-1521.
[190] Zhang, S.; Lloveras, V.; Pulido, D.; Liko, F.; Pinto, L. F.; Albericio, F.; Royo, M.; Vidal-Gancedo, J. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 772-786.
[191] Castonguay, A.; Ladd, E.; van de Ven, T. G. M.; Kakkar, A. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 199-204.

En nuestro grupo de investigación, se han desarrollado herramientas dendríticas para la detección de bacterias como el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a través de la conjugación de unas pequeñas proteínas de afinidad, denominadas affitinas, sobre dendrímeros. Los bioconjugados multivalentes resultante, denominados affidendrons, han demostrado una elevada especificidad y una afinidad por la bacteria muy superior a la de la proteína monovalente (Figura 1.16).[192]

Como DDS de fármacos, los dendrímeros pueden incorporar el compuesto por adsorción en el espacio interno de su estructura, por interacción electrostática o por enlace covalente.[193] Siguiendo la estrategia de incorporación de un fármaco en los huecos internos del dendrímero, Park *et al.* llevaron a cabo con éxito la encapsulación de paclitaxel en el interior de dendrímeros de poliglicerol.[194] De la misma forma Grinstaff *et al.* incorporaron camptotecina en el interior de dendrímeros tipo PGLSA y evaluaron *in vitro* la capacidad de internalización, retención y actividad antitumoral.[195]

Yiyun *et al.* desarrollaron DDS dendríticos basados en la interacción electrostática de pequeños fármacos con grupos carboxilato como el ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno, con las aminas de la superficie de un dendrímero PAMAM-NH_2.[196] En un trabajo paralelo, Kanann *et al.* evaluaron la capacidad de internalización en células A549 (adenocarcinoma epitelial basal alveolar humano) de un sistema similar con ibuprofeno y PAMAM-NH_2 de distintas generaciones.[197]

La unión covalente del fármaco al dendrímero es otra estrategia recurrente. Lopina *et al.* estudiaron la formación de distintos enlaces covalente entre un PAMAM y penicilina V usando un espaciador de PEG.[198] También Ren *et al.* describieron la incorporación covalente de 5-fluoroacilo sobre dendrímeros PAMAM que a su vez podían complejar el oligonucleótido as-miR-21 para el tratamiento de tumores. En su estudio analizaron la internalización celular y la citotoxicidad en células tumorales U251 (glioblastoma multiforme humano) combinada frente a la coadministración de los dos componentes por separado, obteniéndose mejores resultados para el sistema combinado.[199] En otro ejemplo, Yang *et al.* desarrollaron un nanosistema para la regeneración ósea a través de la administración de un dendrímero PAMAM unido al péptido C11 y al aptámero CH6. Demostraron *in vivo* la habilidad de su conjugado CH6-PAMAM-C11 para alcanzar tejido óseo y llevar a cabo la administración de agentes terapéuticos para la regeneración de tejido óseo.[200]

[192] Vukojicic, P.; Behar, G.; Tawara, M. H.; Fernandez-Villamarin, M.; Pecorari, F.; Fernandez-Megia, E.; Mouratou, B. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 21391-21398.
[193] Svenson, S.; Chauhan, A. S. *Nanomedicine* **2008**, *3*, 679-702.
[194] Ooya, T.; Lee, J.; Park, K. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 1221-1229.
[195] Morgan, M. T.; Nakanishi, Y.; Kroll, D. J.; Griset, A. P.; Carnahan, M. A.; Wathier, M.; Oberlies, N. H.; Manikumar, G.; Wani, M. C.; Grinstaff, M. W. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11913-11921.
[196] Yiyun, C.; Tongwen, X. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1188-1192.
[197] Kannan, S.; Kolhe, P.; Raykova, V.; Glibatec, M.; Kannan, R. M.; Lieh-Lai, M.; Bassett, D. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2004**, *15*, 311-330.
[198] Yang, H.; Lopina, S. T. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2003**, *14*, 1043-1056.
[199] Ren, Y.; Kang, C. S.; Yuan, X. B.; Zhou, X.; Xu, P.; Han, L.; Wang, G. X.; Jia, Z.; Zhong, Y.; Yu, S.; Sheng, J.; Pu, P. Y. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2010**, *21*, 303-314.
[200] Ren, M.; Li, Y.; Zhang, H.; Li, L.; He, P.; Ji, P.; Yang, S. *J. Mater. Chem. B* **2021**, *9*, 2831-2844.

Como se ha comentado anteriormente, una familia de dendrímeros de especial relevancia para esta Tesis Doctoral es la de los GATG.[201-203] Además de los ya comentados *affidendrons*, entre las aplicaciones más relevantes en nanomedicina de estos dendrímeros y sus copolímeros de bloque (que se explicarán en el siguiente apartado) cabe destacar su aplicación como agentes de diagnóstico,[204] antimicrobianos,[176] como estabilizantes del color de antocianinas,[205,206] en la regulación de la internalización celular,[207] reconocimiento multivalente,[192,208-210] terapia génica[203,211,212] o DD,[172,213,214] entre otras muchas aplicaciones (Figura 1.17).

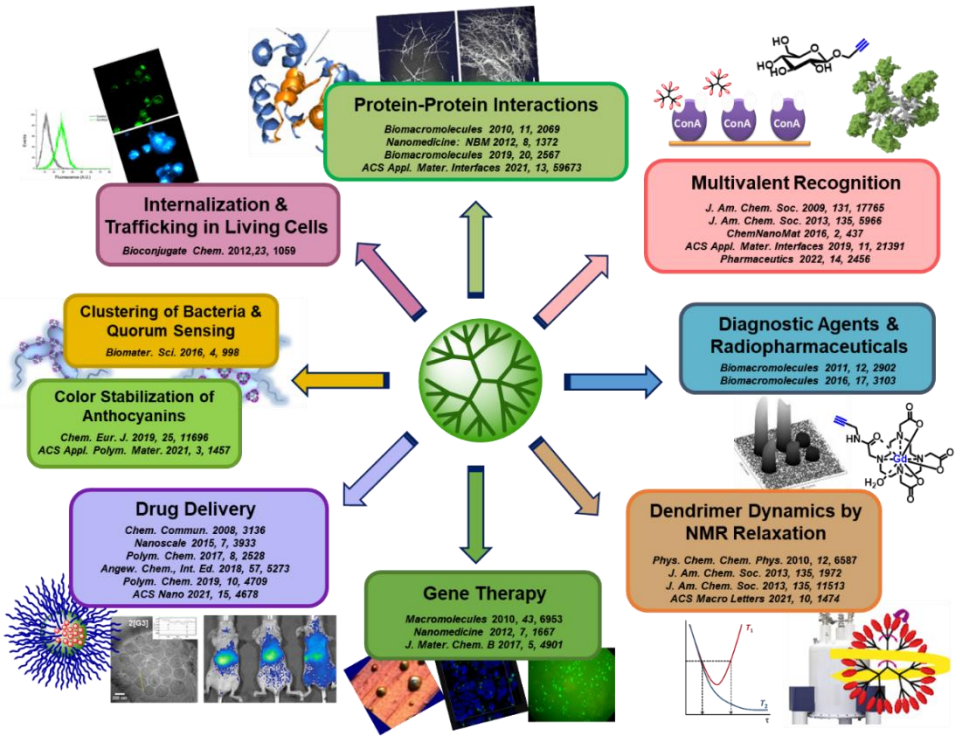


Figura 1.17. Esquema de las principales aplicaciones en nanomedicina de los dendrímeros de la familia GATG.

---

[201] Sousa-Herves, A.; Novoa-Carballal, R.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *AAPS J.* **2014**, *16*, 948-961.
[202] Sousa-Herves, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 205-210.
[203] de la Fuente, M.; Raviña, M.; Sousa-Herves, A.; Correa, J.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E.; Sánchez, A.; Alonso, M. J. *Nanomedicine* **2012**, *7*, 1667-1681.
[204] Fernández-Trillo, F.; Pacheco-Torres, J.; Correa, J.; Ballesteros, P.; Lopez-Larrubia, P.; Cerdán, S.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2902-2907.
[205] Cruz, L.; Basilio, N.; Mendoza, J.; Mateus, N.; de Freitas, V.; Tawara, M. H.; Correa, J.; Fernandez-Megia, E. *Eur. J. Chem.* **2019**, *25*, 11696-11706.
[206] Cruz, L.; Correa, J.; Mateus, N.; de Freitas, V.; Tawara, M. H.; Fernandez-Megia, E. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2021**, *3*, 1457-1464.
[207] Albertazzi, L.; Fernandez-Villamarin, M.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 1059-1068.
[208] Fernandez-Villamarin, M.; Sousa-Herves, A.; Correa, J.; Munoz, E. M.; Taboada, P.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *ChemNanoMat* **2016**, *2*, 437-446.
[209] Lallana, E.; Fernandez-Megia, E.; Riguera, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5748-5750.
[210] Munoz, E. M.; Correa, J.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5966-5969.
[211] Leiro, V.; Garcia, J. P.; Moreno, P. M. D.; Spencer, A. P.; Fernandez-Villamarin, M.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E.; Paula Pego, A. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 4901-4917.
[212]. Raviña, M.; de la Fuente, M.; Correa, J.; Sousa-Herves, A.; Pinto, J.; Fernandez-Megia, E.; Riguera, R.; Sanchez, A.; Alonso, M. J. *Macromolecules* **2010**, *43*, 6953-6961.
[213] Fernandez-Villamarin, M.; Sousa-Herves, A.; Porto, S.; Guldris, N.; Martínez-Costas, J.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 2528-2537.
[214] Sousa-Herves, A.; Sanchez Espinel, C.; Fahmi, A.; Gonzalez-Fernandez, A.; Fernandez-Megia, E. *Nanoscale* **2015**, *7*, 3933-3940.

1.3.5.2. Copolímeros de bloque

Previamente se ha comentado la importancia de las nanopartículas híbridas, que combinan o realzan las propiedades de sus componentes por separado. En el caso de los polímeros también se pueden buscar aproximaciones que traten de mejorar o crear nuevas propiedades. Este es el caso de los copolímeros de bloque que, como su nombre indica, son estructuras híbridas fruto de la combinación de dos tipos de arquitecturas diferentes. Dentro de este nuevo tipo de estructuras destacan los copolímeros de bloque dendríticos, formados por la unión de un dendrímero con un polímero lineal. Se han descrito cuatro principales tipos de estos copolímeros en función de su estructura (Figura 1.18):[202,215,216]

- Copolímeros dibloque AB.
- Copolímeros tribloque ABA.
- Copolímeros dendronizados (la funcionalización se realiza sobre la cadena del polímero lineal).
- Copolímeros estrella (la polimerización se lleva a cabo sobre los dendrímeros que actúan como núcleos polifuncionales).

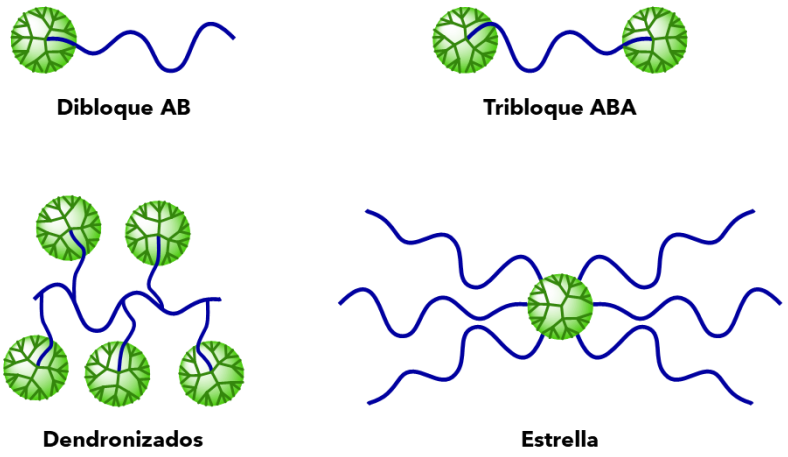


Figura 1.18. Principales tipos de copolímeros de bloque dendríticos.

Los primeros copolímeros de bloque dendríticos fueron descritos por Fréchet en el año 1992. Fueron copolímeros tipo dibloque AB y tribloque ABA, en los que A representa un dendrímero y B un polímero lineal, en concreto PEG.[217] Los copolímeros de bloque PEG-dendrímero, al tener la capacidad de formar nanoestructuras en disolución a causa de las diferencias de solubilidad entre los bloques, han despertado un gran interés en muchos campos, especialmente en el de la nanomedicina y el DD.[201,202,218-220]

[215] Gitsov, I. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 5295-5314.
[216] Yan, J.; Li, W.; Zhang, A. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12221-12233.
[217] Gitsov, I.; Wooley, K. L.; Fréchet, J. M. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1992**, *31*, 1200-1202.
[218] Epps Iii, T. H.; O'Reilly, R. K. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 1674-1689.
[219] Fréchet, J. M. J. *Science* **1994**, *263*, 1710-1715.
[220] Fan, X.; Zhao, Y.; Xu, W.; Li, L. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *62*, 943-959.

La síntesis de estructuras de este tipo supone un gran reto, por lo que se han ido desarrollando distintos tipos de estrategias sintéticas (Figura 1.19):[201,215,221-223]

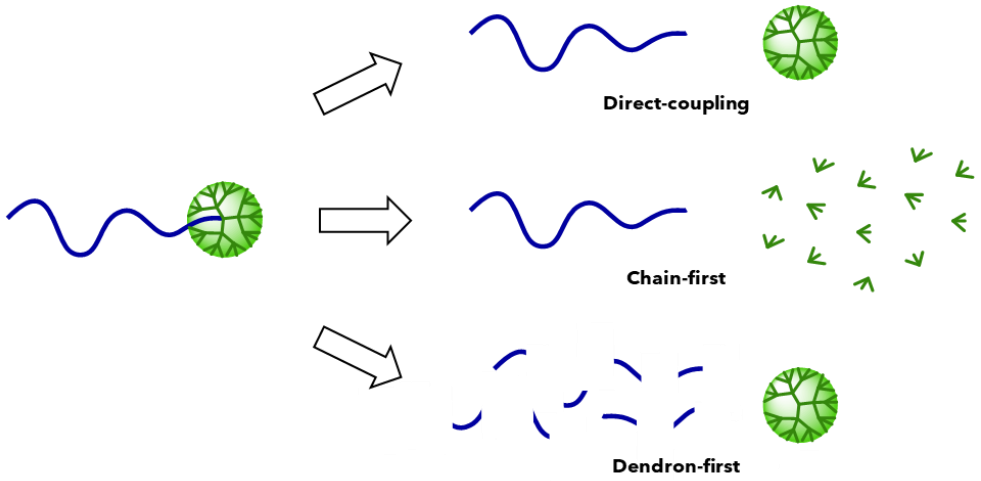


Figura 1.19. Esquema de las estrategias para la síntesis de copolímeros de bloque dendrítico.

- *Direct-coupling* o estrategia sintética de acoplamiento directo. Es la estrategia más sencilla ya que se basa en el acoplamiento directo entre los dos bloques. Primero se sintetizan el dendrímero y el polímero lineal incorporando un punto reactivo en ambos para el posterior acoplamiento, lo que permite un perfecto control sobre la síntesis.[217] No obstante, para este tipo de síntesis hay que tener en cuenta el tamaño de los bloques y la eficiencia del acoplamiento. Esta estrategia presenta grandes limitaciones para el caso de bloques de gran tamaño o muy impedidos.
- *Chain-first* o estrategia de crecimiento del bloque dendrítico sobre el polímero lineal. La preparación del copolímero se lleva a cabo mediante una síntesis divergente desde un extremo del polímero lineal sobre el que se va creciendo el dendrímero.[224,225] Esta estrategia es la más empleada debido a su gran versatilidad frente a la naturaleza del grupo dendrítico. En el año 2006, nuestro grupo de investigación sintetizó y funcionalizó copolímeros de bloque dendrítico usando PEG como polímero lineal y dendrones de la familia GATG.[222]
- *Dendron-first* o estrategia de polimerización sobre el bloque dendrítico. En esta estrategia se parte de un dendrón que contiene un punto focal que se utiliza como iniciador de la reacción de polimerización del bloque lineal.[226-228]

[221] Blasco, E.; Piñol, M.; Oriol, L. *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, *35*, 1090-1115.
[222] Fernandez-Megia, E.; Correa, J.; Riguera, R. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3104-3111.
[223] Wurm, F.; Frey, H. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 1-52.
[224] Chapman, T. M.; Hillyer, G. L.; Mahan, E. J.; Shaffer, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11195-11196.
[225] van Hest, J. C. M.; Delnoye, D. A. P.; Baars, M. W. P. L.; Elissen-Román, C.; van Genderen, M. H. P.; Meijer, E. W. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1616-1626.
[226] Gitsov, I.; Ivanova, P. T.; Fréchet, J. M. J. *Macromol. Rapid Commun.* **1994**, *15*, 387-393.
[227] Leduc, M. R.; Hawker, C. J.; Dao, J.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11111-11118.
[228] Matyjaszewski, K.; Shigemoto, T.; Fréchet, J. M. J.; Leduc, M. *Macromolecules* **1996**, *29*, 4167-4171.

1.3.5.3. Micelas poliméricas

Las micelas poliméricas son un tipo de nanopartículas formadas a través del autoensamblaje de copolímeros de bloque anfifílicos que, normalmente, se ordenan formando un núcleo o *core* hidrofóbico rodeado de una corona hidrofílica exterior (Figura 1.20). Este proceso impulsando termodinámicamente ocurre cuando la concentración de copolímero es mayor que la concentración micelar crítica (CMC), obteniéndose nanoestructuras mucho más estables que las obtenidas mediante compuestos de bajo peso molecular como surfactantes.[229] Efectivamente, la CMC de micelas poliméricas es unas 1000 veces menor que la de los surfactantes. Además, se estima que la estabilidad cinética de este tipo de sistemas es mayor debido al enredamiento de los bloques lineales.[230,231] A diferencia de las micelas de surfactantes, las micelas poliméricas poseen una mayor estabilidad y capacidad de carga, menor toxicidad y la posibilidad de llevar a cabo una liberación controlada del fármaco.[232]

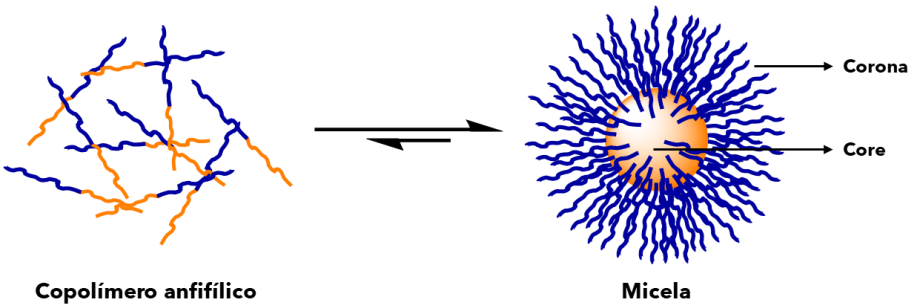


Figura 1.20. Esquema de una micela polimérica.

Si se comparan con otros tipos de nanopartículas, las micelas poliméricas, generalmente tienen un tamaño más pequeño, mejor solubilidad y presentan procesos de preparación más fáciles (nanoprecipitación, evaporación de disolvente, diálisis, dispersión directa, etc.).[233] Además, su estructura *core*-corona, estabilidad, capacidad de encapsular fármacos en su interior y biocompatibilidad, han convertido a las micelas poliméricas en perfectos candidatos como DDS.

A lo largo de los últimos años se han descrito una gran variedad de micelas poliméricas para DD, que pueden mejorar el diagnóstico y el tratamiento de un amplio abanico de enfermedades, muchas de ellas enfocadas en la encapsulación de fármacos antitumorales para el tratamiento del cáncer.[233-241]

---

[229] Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *47*, 113-131.
[230] Mandavi, R.; Sar, S. K.; Rathore, N. *Orient. J. Chem.* **2008**, *24*, 559-564.
[231] Torchilin, V. P. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1-16.
[232] Ahmad, Z.; Shah, A.; Siddiq, M.; Kraatz, H.-B. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 17028-17038.
[233] Ghezzi, M.; Pescina, S.; Padula, C.; Santi, P.; Del Favero, E.; Cantu, L.; Nicoli, S. *J. Control. Release* **2021**, *332*, 312-336.
[234] Ghosh, B.; Biswas, S. *J. Control. Release* **2021**, *332*, 127-147.
[235] Kotta, S.; Aldawsari, H. M.; Badr-Eldin, S. M.; Nair, A. B.; Yt, K. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1636-1668.
[236] Lee, R.-S.; Lin, C. H.; Aljuffali, I. A.; Hu, K. Y.; Fang, J. Y. *J. Nanobiotechnol.* **2015**, *13*, 42-55.
[237] Perumal, S.; Atchudan, R.; Lee, W. *Polymers* **2022**, *14*, 2510-2528.
[238] Raval, N.; Maheshwari, R.; Shukla, H.; Kalia, K.; Torchilin, V. P.; Tekade, R. K. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *126*, 112186-112226.
[239] Sung, M.; Shin, D. H.; Lee, H. J.; Jang, K. H.; Shin, K.; Kim, J. W. *J. Mol. Liq.* **2021**, *344*, 117741-117749.
[240] Whitfield, C. J.; Zhang, M.; Winterwerber, P.; Wu, Y.; Ng, D. Y. W.; Weil, T. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 11030-11084.
[241] Krishnan, A.; Roy, S.; Menon, S. *Eur. Polym. J.* **2022**, *172*, 111224-111253.

Algunos ejemplos los encontramos en trabajamos como el de Sarmento *et al*. donde describen micelas de 140 nm formadas por un copolímero anfifílico de quitosano modificado con cadenas de PEG y ácido oleico. Estas micelas presentan la capacidad de encapsular el fármaco antitumoral camptotecina con una elevada eficiencia de encapsulación, proporcionándole una gran estabilidad frente a la hidrólisis y siendo capaces de llevar a cabo una liberación sostenida *in vitro*.[242] Bae *et al*. desarrollaron otro tipo de micelas poliméricas mixtas que son capaces de encapsular dos fármacos antitumorales, doxorrubicina y geldanamicina, a través de copolímeros anfifílicos capaces de autoensamblarse en micelas de menos de 100 nm para el desarrollo de una terapia combinada contra el cáncer.[243]

Dentro de los ejemplos de micelas poliméricas con otras aplicaciones están las descritas por Pathania *et al*. basadas en quitosano y lecitinas para la administración de timoquinona, un compuesto hidrofóbico que se administra sobre heridas y que tienen actividad cicatrizante.[244] Fang *et al*. desarrollaron micelas poliméricas termosensibles de 150-200 nm, formadas por el autoensamblaje del copolímero anfifílico poli(*N*-isopropil acrilamida)-b-poli(*ε*-caprolactona) (PNiPAAm-b-PCL) y, observaron una mayor acumulación de sus micelas en los pulmones.[236]

Las micelas poliméricas clásicas formadas por el autoensamblaje de copolímeros de bloque anfifílicos habitualmente presentan como limitación el uso de disolventes orgánicos en su preparación o métodos de preparación/purificación poco compatibles con biomoléculas como proteínas o ácidos nucleicos.[245,246] Es por esto que se han desarrollado otros tipos de micelas donde el ensamblaje se produce a través de la interacción electrostática entre especies de carga opuesta. Estos ensamblados, denominados IPEC (por sus siglas en inglés, *InterPolyElectrolyte Complex*), se forman en presencia de un exceso de alguno de los componentes cargados que asegura su estabilidad coloidal.[247-250] Posteriormente, para mejorar la estabilidad de estos sistemas, evitar su agregación y precipitación, se planteó su preparación a partir de copolímeros de bloque formados por una parte hidrofílica de carga neutra y un bloque cargado. Este nuevo tipo de micelas, llamadas micelas PIC (por sus siglas en inglés, *PolyIon Complex*), presentan estructura *core*-corona, donde el *core* es un agregado neutro formado por la interacción electrostática de los bloques cargados, que se encuentra rodeado de una corona hidrofílica formada por el bloque neutro.

[242] Almeida, A.; Araujo, M.; Novoa-Carballal, R.; Andrade, F.; Goncalves, H.; Reis, R. L.; Lucio, M.; Schwartz, S., Jr.; Sarmento, B. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *112*, 110920-110932.
[243] Bae, Y.; Alani, A. W.; Rockich, N. C.; Lai, T. S.; Kwon, G. S. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2421-2432.
[244] Negi, P.; Sharma, G.; Verma, C.; Garg, P.; Rathore, C.; Kulshrestha, S.; Lal, U. R.; Gupta, B.; Pathania, D. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *230*, 115659-115667.
[245] Kaur, J.; Mishra, V.; Singh, S. K.; Gulati, M.; Kapoor, B.; Chellappan, D. K.; Gupta, G.; Dureja, H.; Anand, K.; Dua, K.; Khatik, G. L.; Gowthamarajan, K. *J. Control. Release* **2021**, *334*, 64-95.
[246] Yokoyama, M. *J. Drug Target.* **2014**, *22*, 576-583.
[247] Fouss, R. M.; Sadek, H. *Science* **1949**, *110*, 552-554.
[248] Michaels, A. S.; Miekka, R. G. *J. Phys. Chem. A* **1961**, *65*, 1765-1773.
[249] Philipp, B.; Dautzenberg, H.; Linow, K.-J.; Kötz, J.; Dawydoff, W. *Prog. Polym. Sci.* **1989**, *14*, 91-172.
[250] Tsuchida, E.; Osada, Y.; Sanada, K. *J. Polym. Sci.* **1972**, *10*, 3397-3404.

1.3.5.3.1. Micelas PIC

Las primeras micelas de este tipo fueron descritas en la década de los 90 independientemente por los grupos de Kataoka,[251] que las denominó micelas PIC, y Kabanov,[252] que las llamó BIC (del inglés, *Blocklomer Complex*). Posteriormente, el grupo de Cohen Stuart se referiría a ellas como C3M (*Core Coacervate Complex Micelles*).[253]

Las micelas PIC están formadas por interacción electrostática entre copolímeros de bloque de carga opuesta bajo relación estequiométrica de cargas. Los bloques aniónico y catiónico son los responsables de la interacción electrostática, que queda confinada en el *core* por una corona formada por el bloque neutro. Las especies que intervienen en la formación de este tipo de micelas pueden ser copolímeros y polímeros iónicos, o macromoléculas cargadas (Figura 1.21). La longitud y flexibilidad de la cadena de cada bloque, la densidad de carga o el volumen estérico son factores que determinan las propiedades de estos sistemas.[254] En la tabla 1.3 se recogen algunos ejemplos de los polímeros sintéticos más utilizados para la formación de micelas PIC.

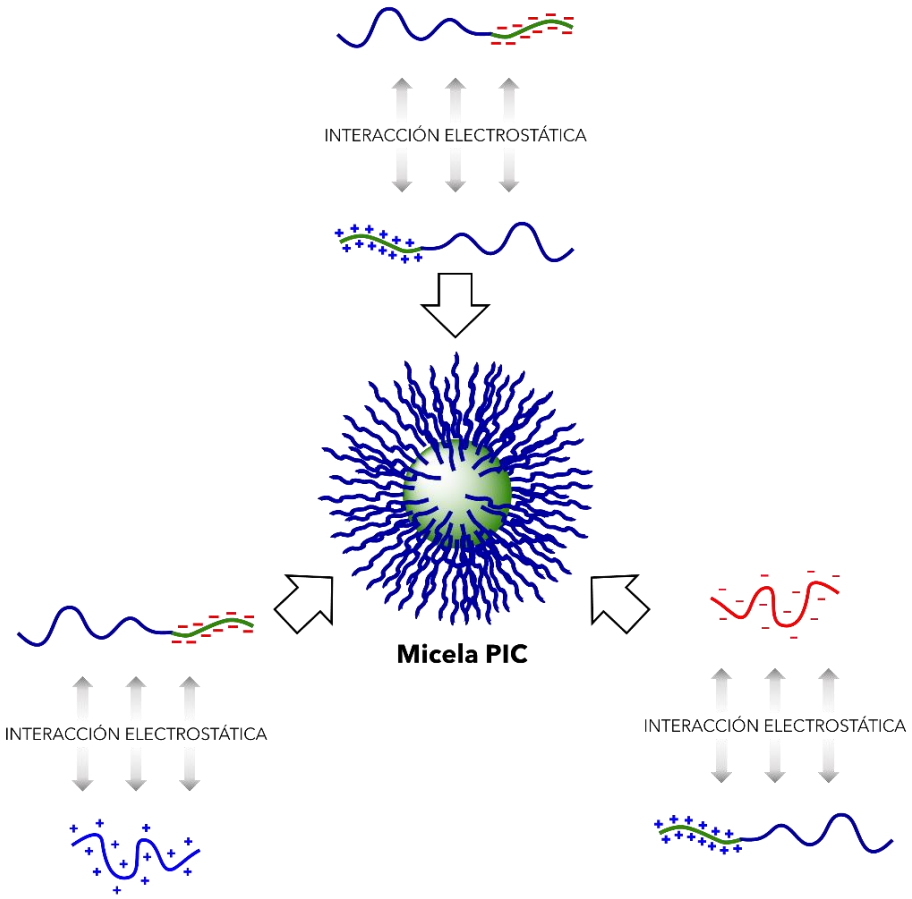


Figura 1.21. Esquema de una micela PIC formada a partir de distintos tipos de poliiones.

[251] Harada, A.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1995**, *28*, 5294-5299.
[252] Kabanov, A. V.; Bronich, T. K.; Kabanov, V. A.; Yu, K.; Eisenberg, A. *Macromolecules* **1996**, *29*, 6797-6802.
[253] Cohen Stuart, M. A.; Besseling, N. A. M.; Fokkink, R. G. *Langmuir* **1998**, *14*, 6846-6849.
[254] Marras, A. E.; Campagna, T. R.; Vieregg, J. R.; Tirrell, M. V. *Macromolecules* **2021**, *54*, 6585-6594.

Tabla 1.3. Lista de polímeros neutros, catiónicos y aniónicos más utilizados en micelas PIC.

	Polímero	Abreviatura	Referencias
Neutros	Poli(etilenglicol)	PEG	213, 251, 252, 255-260
	Poli(vinil alcohol)	PVA	261, 262
	Poli(acrilamida)	PAAm	263-265
	Poli(N-isopropil acrilamida)	PNIPAAM	261, 266
	Poli(N-vinilpirrolidona)	PNVP	267
	Poli(glicerolmetracrilato)	PGMA	268
Catiónicos	Poli(L-lisina)	PLL	213, 260, 269, 270
	Poli(etileninima)	PEI	271
	Poli(2-vinilpiridina)	P2VP	216, 272
	Poli(N-etil-4-vinilpiridinio)	P4EVP	252, 273
	Poli(2-(N,N-dimetilamino) etilmetacrilato)	PDMAEMA	257, 265, 268
	Poli(4-(2-aminohidrocloruro-etiltio)-butileno)	PAETB	274
	Poli(L-arginina)	PArg	275
Aniónicos	Poli(L-aspártico)	PAsp	269, 270
	Poli(L-glutámico)	PGA	213, 276
	Poli(acrílico)	PAA	265, 273
	Poli(metacrilato)	PMAA	277
	Poli(2-(acrilamido)-2-metilpropanosulfonato sódico)	PAMPS	257
	Poli(4-(2-carboxil-etiltio)-butileno)	PCETB	278, 279
	Poli((sulfamato-carboxilato)isopreno)	PSCI	280, 281

[255] Harada, A.; Kataoka, K. *Science* **1999**, *283*, 65-67.
[256] Harada, A.; Kataoka, K. *Macromolecules* **2003**, *36*, 4995-5001.
[257] Paneva, D.; Mespouille, L.; Bougard, F.; Manolova, N.; Degée, P.; Rashkov, I.; Dubois, P. *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 1361-1365.
[258] Jang, W. D.; Nishiyama, N.; Zhang, G. D.; Harada, A.; Jiang, D. L.; Kawauchi, S.; Morimoto, Y.; Kikuchi, M.; Koyama, H.; Aida, T.; Kataoka, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 419-423.
[259] Son, K. J.; Yoon, H. J.; Kim, J. H.; Jang, W. D.; Lee, Y.; Koh, W. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 11968-11971.
[260] Katayose, S.; Kataoka, K. *Bioconjug. Chem.* **1997**, *8*, 702-707.
[261] Voets, I. K.; Moll, P. M.; Aqil, A.; Jérôme, C.; Detrembleur, C.; de Waard, P.; de Keizer, A.; Cohen Stuart, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 10833-10840.
[262] Voets, I. K.; de Keizer, A.; Cohen Stuart, M. A. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *147-148*, 300-318.
[263] Voets, I. K.; de Keizer, A.; de Waard, P.; Frederik, P. M.; Bomans, P. H.; Schmalz, H.; Walther, A.; King, S. M.; Leermakers, F. A.; Cohen Stuart, M. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 6673-6676.
[264] Chen, F.; Stenzel, M. H. *Aust. J. Chem.* **2018**, *71*, 768-780.
[265] Lindhoud, S.; De Vries, R.; Norde, W.; Cohen Stuart, M. A. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2219-2227.
[266] Jiang, Y.; Lu, H.; Chen, F.; Callari, M.; Pourgholami, M.; Morris, D. L.; Stenzel, M. H. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 808-817.
[267] Lee, W.-F.; Chiang, W.-H. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *91*, 2135-2142.
[268] Voets, I. K.; de Keizer, A.; Cohen Stuart, M. A. *Macromolecules* **2006**, *39*, 5952-5955.
[269] Park, J.-S.; Akiyama, Y.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *Langmuir* **2007**, *23*, 138-146.
[270] Itaka, K.; Kanayama, N.; Nishiyama, N.; Jang, W.-D.; Yamasaki, Y.; Nakamura, K.; Kawaguchi, H.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13612-13613.
[271] Lee, Y.; Mo, H.; Koo, H.; Park, J.-Y.; Cho, M. Y.; Jin, G. W.; Park, J.-S. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 13-18.
[272] Nolles, A.; Westphal, A. H.; de Hoop, J. A.; Fokkink, R. G.; Kleijn, J. M.; van Berkel, W. J.; Borst, J. W. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1542-1549.
[273] van der Kooij, H. M.; Spruijt, E.; Voets, I. K.; Fokkink, R.; Cohen Stuart, M. A.; van der Gucht, J. *Langmuir* **2012**, *28*, 14180-14191.
[274] Hofs, B.; Voets, I. K.; de Keizer, A.; Cohen Stuart, M. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 4242-4251.
[275] Kudo, S.; Nagasaki, Y. *J. Control. Release* **2015**, *217*, 256-262.
[276] Chen, Y.; Pang, X.-H.; Dong, C.-M. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 579-586.
[277] Wakebayashi, D.; Nishiyama, N.; Itaka, K.; Miyata, K.; Yamasaki, Y.; Harada, A.; Koyama, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 2128-2136.
[278] Hofs, B.; Brzozowska, A.; de Keizer, A.; Norde, W.; Cohen Stuart, M. A. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *325*, 309-315.
[279] Voets, I. K.; de Keizer, A.; Cohen Stuart, M. A. *Macromolecules* **2007**, *40*, 2158-2164.
[280] Pispas, S. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 8351-8359.
[281] Uchman, M.; Procházka, K.; Gatsouli, K.; Pispas, S.; Špírková, M. *Colloid Polym. Sci.* **2011**, *289*, 1045-1053.

Las micelas de tipo PIC se han convertido en sistemas únicos de un extraordinario valor debido a sus propiedades, entre las que destacan:

- Tamaño e índice de polidispersión (PDI). El tamaño de este tipo de micelas se encuentra habitualmente en el rango de 10 a 200 nm, facilitando enormemente su entrada en las células o su acumulación selectiva en determinados tejidos. Además, presentan PDI bajos en comparación con el resto de nanopartículas poliméricas.
- Estructura *core*-corona y carga neta nula. Aunque en la formación de este tipo de micelas intervienen componentes cargados, la estequiometría de cargas es 1:1. Además, la interacción electrostática del componente aniónico con el catiónico queda confinada en el *core* de la micela y, a su vez, estabilizada por una corona formada por el componente neutro. A su vez, esta corona otorga protección al fármaco que se aloje en el interior además de biocompatibilidad con el medio exterior.[251,252,268]
- Forma esférica. La mayoría de las micelas de tipo PIC presentan una estructura esférica, aunque cabe destacar algunas excepciones. Cohen *et al.* describieron micelas formadas por un copolímero y un metal, que son capaces de cambiar su forma a fibras estiradas a medida que el pH aumenta.[282] Por otro lado, se han desarrollado vesículas de tipo PIC (PICsomas) a través de variaciones en la concentración o en el tamaño de los bloques implicados en su formación.[172,283-287]
- Carga superficial. Como ya se ha comentado, la carga superficial de una partícula puede definir la biodistribución de un DDS y es también un factor importante para la estabilidad de las micelas en medio acuoso. En el caso de las micelas PIC se obtienen sistemas neutros y, aunque alguno de los componentes cargados estuviera en exceso, la corona hidrofílica reduciría el impacto sobre la carga superficial de la partícula al confinar la interacción electrostática en el *core*.[288,289]
- Formación en medio acuoso. A diferencia de otros DDS que emplean disolventes orgánicos o condiciones incompatibles con la encapsulación de biomoléculas, la formación de micelas PIC se lleva a cabo en medio acuoso. Esto permite la encapsulación de todo tipo de fármacos y biomoléculas como proteínas, ADN, ARN, anticuerpos, etc.[290-293]

---

[282] Wang, J.; de Keizer, A.; van Leeuwen, H. P.; Yan, Y.; Vergeldt, F.; van As, H.; Bomans, P. H.; Sommerdijk, N. A.; Cohen Stuart, M. A.; van der Gucht, J. *Langmuir* **2011**, *27*, 14776-14782.
[283] Anraku, Y.; Kishimura, A.; Oba, M.; Yuichi, Y.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1631-1636.
[284] Donath, E.; Sukhorukov, G. B.; Caruso, F.; Davis, S. A.; Möhwald, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2201-2205.
[285] Huang, J.; Gao, Y.; Ding, P.; Guo, X.; Cohen Stuart, M. A.; Wang, J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 6048-6056.
[286] Kishimura, A. *Polym. J.* **2013**, *45*, 892-897.
[287] Koide, A.; Kishimura, A.; Osada, K.; Jang, W.-D.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5988-5989.
[288] Jin, Q.; Cai, T.; Wang, Y.; Wang, H.; Ji, J. *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 679-683.
[289] Nakamura, N.; Mochida, Y.; Toh, K.; Fukushima, S.; Anraku, Y.; Cabral, H. *Polymers* **2020**, *13*, 5-12.
[290] Harada-Shiba, M.; Yamauchi, K.; Harada, A.; Takamisawa, I.; Shimokado, K.; Kataoka, K. *Gene Ther.* **2002**, *9*, 407-414.
[291] Lee, Y.; Ishii, T.; Cabral, H.; Kim, H. J.; Seo, J. H.; Nishiyama, N.; Oshima, H.; Osada, K.; Kataoka, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 5309-5312.
[292] Min, H. S.; Kim, H. J.; Naito, M.; Ogura, S.; Toh, K.; Hayashi, K.; Kim, B. S.; Fukushima, S.; Anraku, Y.; Miyata, K.; Kataoka, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 8173-8180.
[293] Raisin, S.; Morille, M.; Bony, C.; Noel, D.; Devoisselle, J. M.; Belamie, E. *Biomater. Sci.* **2017**, *5*, 1910-1921.

- Estabilidad coloidal y CMC. La estabilidad coloidal define la capacidad de un sistema para mantenerse estable en disolución sin que se produzca la precipitación del mismo. Para el caso de las micelas PIC está determinada por los factores que afectan a la intensidad de las interacciones electrostáticas y la capacidad estabilizadora del bloque neutro. Un perfecto DDS tendrá una estabilidad coloidal muy elevada, lo que permitirá su almacenamiento durante más tiempo o incluso su liofilización.[262,294,295]
  Cuando un DDS se administra *in vivo*, debe presentar estabilidad frente a la dilución. La CMC, la concentración mínima a partir de la que empieza a producirse la interacción y agregación de los componentes en forma de micela, tiende a tener valores muy bajos para micelas PIC. Al igual que para la estabilidad coloidal, los factores que afectan a los valores de la CMC dependen de la composición y estructura de los bloques neutros y cargados.[296]
- Efecto del pH. Como ya se ha comentado, el pH va a tener una importante influencia directamente sobre los bloques cargados. Para polielectrolitos fuertes la carga sufrirá muy poca variación en función del pH, mientras que, para polielectrolitos débiles, la variación de la densidad de carga con el pH será mucho mayor. Esta variación afectará a la estabilidad de la micela PIC resultante, llegando a provocar su disociación. A pesar de que esto se pueda entender como una limitación, representa una ventaja de este tipo de sistemas, ya que se puede llegar a modular la liberación de un fármaco encapsulado dependiendo del pH del entorno en el que se encuentre la micela, por ejemplo, endosoma o tumor.[261,297-299]
- Efecto de la fuerza iónica. La propia naturaleza electrostática de las micelas PIC representa una de sus mayores limitaciones. Si la fuerza iónica del medio de formación es demasiado alta provoca el apantallamiento de las cargas, lo que se traduce en una interacción electrostática más débil y por tanto una menor estabilidad del sistema.[296] Puesto que la aplicación final de este tipo de sistemas es como DDS, tienen que ser estables a fuerzas iónicas típicas de los medios biológicos (150 mM NaCl, pH 7.4, 37 °C), y es por esto que, en los últimos años gran parte de los esfuerzos se han centrado en la obtención de micelas PIC estables a elevadas fuerzas iónicas.[274,300] Nuestro grupo de investigación ha descrito que las micelas PIC que incorporan dendrímeros presentan una estabilidad frente a la fuerza iónica muy superior a la de las preparadas a partir de polímeros lineales (150 mM *vs.* 3 M de NaCl), un efecto que se ha asociado a la naturaleza globular de los dendrímeros (Figura 1.22).[213]

[294] Dufresne, M.-H.; Leroux, J.-C. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 160-169.
[295] van der Burgh, S.; de Keizer, A.; Cohen Stuart, M. A. *Langmuir* **2004**, *20*, 1073-1084.
[296] Stapert, H. R.; Nishiyama, N.; Jiang, D.-L.; Aida, T.; Kataoka, K. *Langmuir* **2000**, *16*, 8182-8188.
[297] Lee, Y.; Fukushima, S.; Bae, Y.; Hiki, S.; Ishii, T.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5362-5363.
[298] Ohno, S.; Ishihara, K.; Yusa, S. *Langmuir* **2016**, *32*, 3945-3953.
[299] Qiu, Z.; Huang, J.; Liu, L.; Li, C.; Cohen Stuart, M. A.; Wang, J. *Langmuir* **2020**, *36*, 8367-8374.
[300] Ma, M.; Ahsan, B.; Wang, J.; Wang, M.; Guo, X.; Cohen Stuart, M. A.; Wang, J. *Soft Matter* **2019**, *15*, 8210-8218.

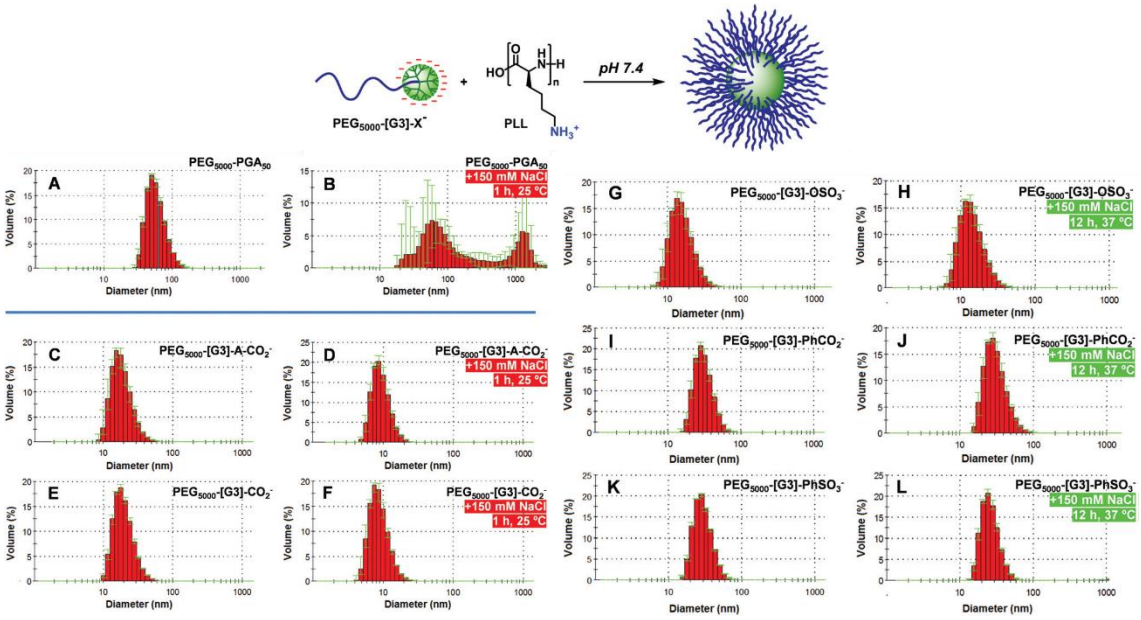


Figura 1.22. Formación de micelas PIC y comparación de su estabilidad frente a la fuerza iónica en función de que estén formadas a partir de copolímeros de bloque lineales *vs.* dendríticos. Adaptada de la referencia 213.

Todas estas propiedades hacen de las micelas PIC sistemas únicos para una multitud de aplicaciones, especialmente para el transporte de material genético, fármacos y proteínas terapéuticas. Algunos de estos ejemplos se comentan a continuación:

- Transporte de material genético. Más conocido como terapia génica, consiste en el transporte de material genético al interior de una célula para: complementar o sustituir un gen defectuoso, inhibir o bloquear el funcionamiento del mecanismo desencadenante de una enfermedad o introducir material genético que permita a la célula la síntesis de proteínas terapéuticas.[229,301,302] En uno de los ejemplos más recientes, Barz *et al.* han descrito un copolímero tipo tribloque ABC para la encapsulación de un ARN de silenciamiento en micelas PIC de 50-60 nm. Estas micelas mostraron una buena capacidad de internalización en células Neuro2A (neuroblastoma de ratón) y KB (carcinoma epitelial humano), pero una mala salida de endosoma.[303] Kataoka *et al.* también han diseñado micelas PIC cargadas con ARNm sensibles a ATP y estudiaron los factores estructurales que afectan a la estabilidad, eficiencia del transporte y actividad de la carga.[304]

[301] Itaka, K.; Yamauchi, K.; Harada, A.; Nakamura, K.; Kawaguchi, H.; Kataoka, K. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4495-4506.
[302] Osada, K.; Christie, R. J.; Kataoka, K. *J. R. Soc. Interface* **2009**, *6*, 352-329.
[303] Capeloa, L.; Yazdi, M.; Zhang, H.; Chen, X.; Nie, Y.; Wagner, E.; Lachelt, U.; Barz, M. *Macromol. Rapid Commun.* **2022**, *43*, 2100698-2100706.
[304] Yoshinaga, N.; Uchida, S.; Dirisala, A.; Naito, M.; Osada, K.; Cabral, H.; Kataoka, K. *J. Control. Release* **2021**, *330*, 317-328.

- Transporte de fármacos. Como ya se ha comentado, las micelas PIC son excelentes candidatos como DDS. Una de sus aplicaciones más prometedoras es el transporte efectivo y selectivo de fármacos de carácter citotóxico con aplicaciones en terapias contra el cáncer, por ejemplo, doxorrubicina, cisplatino o paclitaxel.[305-312] Kataoka *et al.* desarrollaron sistemas PIC de tamaños entre 30 y 100 nm cargados con DACHPt (un fármaco antitumoral con base de platino) para su estudio en diferentes tipos de tumores. Todas las micelas consiguieron penetrar en tumores altamente permeables, pero solamente las micelas de 30 nm pudieron penetrar en tumores pancreáticos poco permeables y lograr un efecto antitumoral.[100] Nuestro grupo de investigación ha descrito la preparación de micelas PIC sensibles al pH para la liberación intracelular controlada de doxorrubicina. Las micelas, en comparación con la doxorrubicina libre, mostraron una mayor toxicidad y mecanismos diferentes de internalización y tráfico intracelular.[213]
- Transporte de proteínas terapéuticas. Las proteínas, enzimas o anticuerpos, en concreto aquellas que pueden actuar como agentes terapéuticos, han sido objeto de estudio para su encapsulación y liberación. Este tipo de biomoléculas son idóneas para la encapsulación en micelas PIC ya que presentan carga y pueden integrarse en el *core* de las micelas o bien convertirse en la especie de carga opuesta que intervienen en la interacción electrostática.[264,266,272,313-315] Chapman *et al.* compararon el efecto de la longitud de la cadena lateral de los copolímeros de bloque cargados sobre el pKa de sus ácidos carboxílicos y su capacidad para la formación de micelas PIC con una proteína modelo como la lisozima. Concluyeron que el aumento de la longitud entre la cadena principal del polímero y el residuo ácido produce un aumento en el pKa y que todos los polímeros empleados son capaces de formar micelas PIC estables a pH 7.4 y 150 mM de NaCl. Además, las micelas formadas a partir de copolímeros con espaciadores más largos mejoran la liberación de la proteína tras su internalización en células.[316] Kataoka *et al.* describieron la encapsulación de anticuerpos en micelas PIC mediante una estrategia de inversión de carga usando ácido citracónico, lo que se tradujo en una mayor estabilidad de las micelas. Estudiaron la internalización celular y la recuperación de la estructura del anticuerpo al revertirse la conversión gracias al pH del interior del endosoma, demostrando así la capacidad de estos sistemas para el transporte de anticuerpos al interior de la célula (Figura 1.23).[317]

---

[305] Amjad, M. W.; Kesharwani, P.; Amin, M. C. I. M.; Iyer, A. K. *Prog. Polym. Sci.* **2017**, *64*, 154-181.
[306] Bontha, S.; Kabanov, A. V.; Bronich, T. K. *J. Control. Release* **2006**, *114*, 163-174.
[307] Kalinova, R.; Dimitrov, I. *Molecules* **2022**, *27*, 2178-2193.
[308] Kim, J. O.; Kabanov, A. V.; Bronich, T. K. *J. Control. Release* **2009**, *138*, 197-204.
[309] Nishiyama, N.; Nakagishi, Y.; Morimoto, Y.; Lai, P. S.; Miyazaki, K.; Urano, K.; Horie, S.; Kumagai, M.; Fukushima, S.; Cheng, Y.; Jang, W. D.; Kikuchi, M.; Kataoka, K. *J. Control. Release* **2009**, *133*, 245-251.
[310] Ramasamy, T.; Ruttala, H. B.; Choi, J. Y.; Tran, T. H.; Kim, J. H.; Ku, S. K.; Choi, H. G.; Yong, C. S.; Kim, J. O. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5758-5761.
[311] Wang, C. H.; Wang, W. T.; Hsiue, G. H. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3352-3358.
[312] Yang, X.-Z.; Du, X.-J.; Liu, Y.; Zhu, Y.-H.; Liu, Y.-Z.; Li, Y.-P.; Wang, J. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 931-936.
[313] Fu, A.; Tang, R.; Hardie, J.; Farkas, M. E.; Rotello, V. M. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1602-1608.
[314] Magana, J. R.; Sproncken, C. C. M.; Voets, I. K. *Polymers* **2020**, *12*, 1953-1989.
[315] Miyazaki, T.; Chen, S.; Florinas, S.; Igarashi, K.; Matsumoto, Y.; Yamasoba, T.; Xu, Z. Q.; Wu, H.; Gao, C.; Kataoka, K.; Christie, R. J.; Cabral, H. *ACS Nano* **2022**, *16*, 12290-12304.
[316] Li, K.; Chen, F.; Wang, Y.; Stenzel, M. H.; Chapman, R. *Macromol. Rapid Commun.* **2020**, *41*, 2000208-2000214.

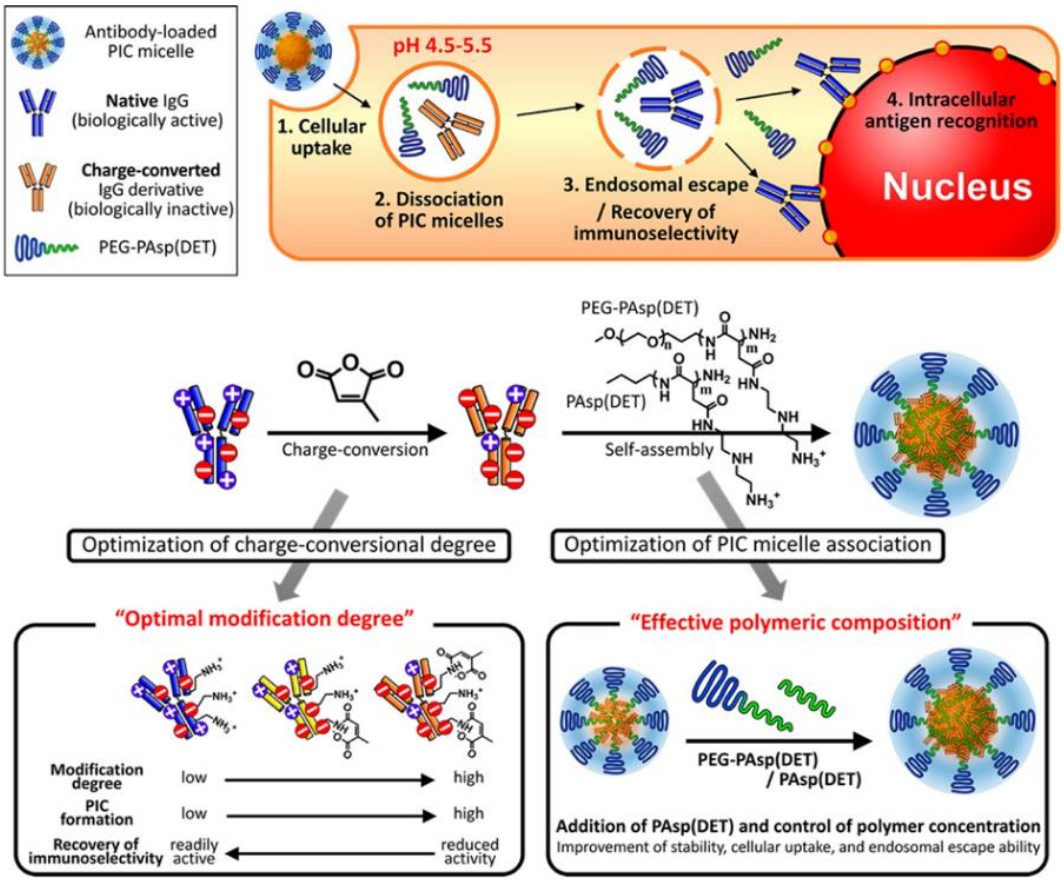


Figura 1.23. Esquema de la modificación de la carga de anticuerpos para la formación de micelas PIC y su internalización celular. Adaptada de la referencia 317.

En los últimos años han despertado gran interés los PICsomas, sistemas vesiculares formados por la interacción electrostática de especies de carga opuesta. Estos sistemas, a diferencia de los clásicos liposomas, presentan ciertas características que los hacen únicos, como su preparación en medio acuoso usando condiciones experimentales muy sencillas, y su adecuada permeabilidad.[283,285,287] Entre sus muchas aplicaciones cabe destacar su papel como nanoreactores enzimáticos.[318,319] Kataoka *et al.* desarrollaron PICsomas de 100 nm para la encapsulación de L-asparaginasa, una enzima terapéutica con actividad en células tumorales con deficiencia de asparagina sintetasa, y observaron *in vivo* una actividad mejorada en comparación con la de la enzima libre.[320]

[317] Kim, A.; Miura, Y.; Ishii, T.; Mutaf, O. F.; Nishiyama, N.; Cabral, H.; Kataoka, K. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 446-453.
[318] Anraku, Y.; Kishimura, A.; Kobayashi, A.; Oba, M.; Kataoka, K. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6054-6056.
[319] Anraku, Y.; Kishimura, A.; Kamiya, M.; Tanaka, S.; Nomoto, T.; Toh, K.; Matsumoto, Y.; Fukushima, S.; Sueyoshi, D.; Kano, M. R.; Urano, Y.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 560-565.
[320] Sueyoshi, D.; Anraku, Y.; Komatsu, T.; Urano, Y.; Kataoka, K. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 1189-1196.

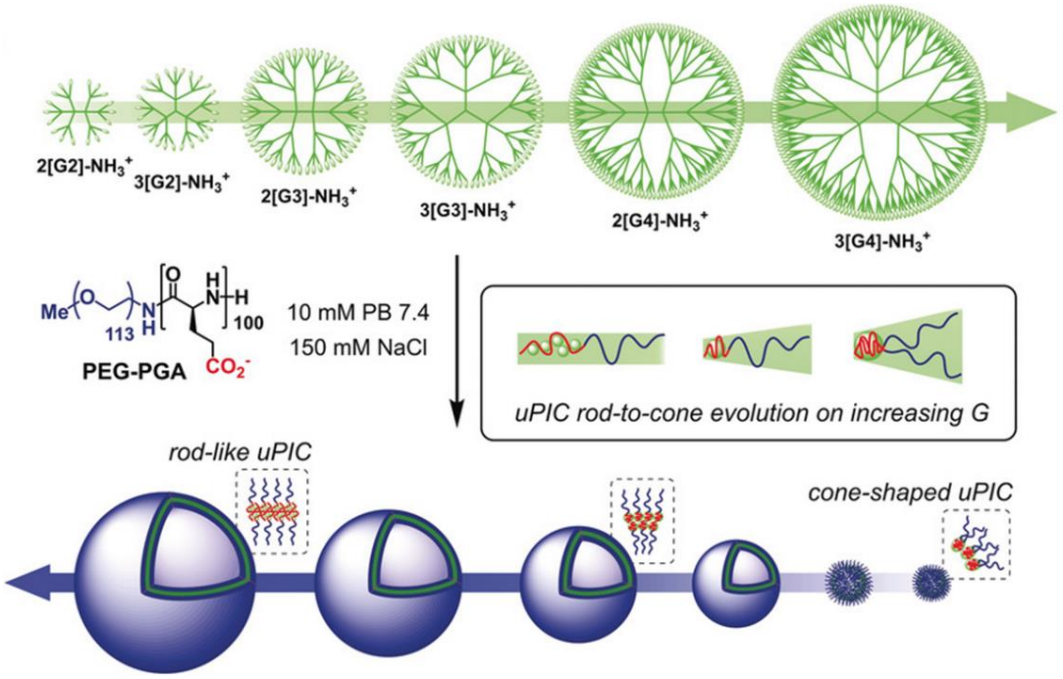


Figura 1.24. Esquema de transferencia jerárquica de información estructural de dendrímero a PIC. Adaptada de la referencia 172.

Nuestro grupo de investigación ha descrito PICsomas formados por dendrímeros y copolímeros de bloque lineales de carga opuesta. Se demostró la existencia de una transferencia jerárquica de información estructural del dendrímero al sistema PIC. En este trabajo se usó una selección de seis dendrímeros y cinco copolímeros de bloque con diferente número de cargas, observándose que, al disminuir la generación del dendrímero se obtenían ensamblados PIC de mayor tamaño (entre 80 y 500 nm) acompañados de una transición de micela a vesícula (Figura 1.24), que se justifica a través de la arquitectura de la unidad PIC (*u*PIC), descrita inicialmente por Kataoka *et al.*[321] Además, se determinó en estudios *in vivo* que los PICsomas de 100 nm presentaban una mejor biodistribución y unos tiempos de circulación más largos que los PICsomas de mayor tamaño.[172]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[321] Anraku, Y.; Kishimura, A.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1423-1429.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La ciencia es el gran antídoto contra el veneno del entusiasmo y la superstición.

Adam Smith

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

1. **Capítulo 1:** la acumulación progresiva del péptido *β*-amiloide en determinadas áreas del cerebro es un síntoma del inicio de la enfermedad de Alzheimer. Aunque se sabe que la activación mediante agonistas de los receptores LXR disminuye los niveles del péptido *β*-amiloide y mejora el déficit de memoria, la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia asociadas a estos tratamientos limitan su aplicación clínica. La *N*,*N*-dimetil-3*β*-hidroxicolenamida (DMHCA) es un agonista parcial de receptores LXR capaz de inducir la expresión de apolipoproteína E (principal responsable de la eliminación del péptido *β*-amiloide del cerebro), que a diferencia de otros agonistas, no afecta a los niveles de colesterol y triglicéridos. Desafortunadamente, su baja solubilidad e incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica limita su desarrollo clínico. En el Capítulo 1 nos planteamos la preparación de un polímero terapéutico de DMHCA mediante conjugación a un copolímero de bloque PEG-dendrímero de la familia GATG a través de enlaces éster de elevada biodegradabilidad *in vivo*. Se evaluará la capacidad del polímero terapéutico anfifílico de formar micelas de tamaño nanométrico, su estabilidad y, en colaboración con el grupo del profesor Martín A. Bruno (Universidad Católica de Cuyo, Argentina), su habilidad para atravesar la barrera hematoencefálica y actividad *in vitro* e *in vivo*.

2. **Capítulo 2:** las micelas PIC han emergido como interesantes sistemas de DD de fácil preparación en medio acuoso por interacción electrostática entre polímeros y/o biopolímeros de carga opuesta. Se han descrito micelas PIC a partir de polímeros sintéticos, proteínas, péptidos y ácidos nucleicos, entre otros. Sin embargo, los ejemplos de micelas PIC que incorporan polisacáridos son escasos y ninguna de ellas es estable a concentraciones salinas fisiológicas, probablemente debido a la gran rigidez asociada a polisacáridos cargados. Nuestro grupo ha descrito que las micelas PIC que incorporan dendrímeros presentan una estabilidad frente a la fuerza iónica muy superior a la de las preparadas a partir de polímeros lineales (hasta 3 M *vs.* 150 mM NaCl), un efecto que se ha asociado a la naturaleza globular de los dendrímeros. En este capítulo pretendemos aprovechar este efecto para desarrollar micelas PIC estables a partir de polisacáridos de peso molecular variable, utilizando copolímeros de bloque PEG-dendrímero de la familia GATG. Junto a la estabilidad de estas micelas, se describirá la encapsulación y liberación de fármacos (utilizando como modelo un fármaco anticancerígeno fluorescente como la doxorrubicina), así como su internalización celular y citotoxicidad en función del peso molecular del polisacárido.

3. **Capítulo 3:** las micelas PIC tienen una estructura *core*-corona. Los polímeros y bloques cargados que participan en su formación se encuentran confinados en el *core*, rodeados por una corona de un polímero hidrofílico neutro, típicamente PEG. Como resultado de estos procesos de ensamblado, el tamaño típico de las micelas PIC descritas en bibliografía se encuentra en el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

rango 30-150 nm. La posibilidad de extender el tamaño por encima de este límite ampliaría sus aplicaciones a otros campos, como el desarrollo de implantes, nanoreactores o modelos de protocélulas. En este capítulo nos hemos planteado como objetivo la regulación del tamaño de micelas PIC entre 30 nm y 1 μm. Se describirá la preparación de micelas a partir de un copolímero PEG-dendrímero cargado de la familia GATG y un péptido de carga opuesta, y se estudiará el efecto que tiene la sustitución de un porcentaje variable de copolímero PEG-dendrímero por un dendrímero no PEGuilado de idéntica carga y multivalencia sobre el tamaño de las micelas. De acuerdo con el modelo *core*-corona antes mencionado, que se evaluará por microscopía confocal, se estudiará mediante DLS y cryo-TEM cómo la reducción del porcentaje de PEG afecta sobre el tamaño. Finalmente, en colaboración con el grupo del Dr. Jordi Esquena (IQAC-CSIC, Barcelona), las micelas resultantes se analizarán mediante SLS, lo que permitirá la determinación de su número de agregación y confirmar por tanto el modelo de agregación e hipótesis de partida.

4. **Capítulo 4:** la alta afinidad y selectividad de Affidendrons, bioconjugados multivalentes descritos por nuestro grupo, que incorporan varias copias de las pequeñas proteínas de afinidad denominadas Affitinas sobre estructuras dendríticas, nos ha llevado a plantearnos como objetivo la síntesis, caracterización y evaluación de la actividad *in vitro* de Aptadendrímeros, conjugados que incorporan aptámeros sobre la superficie dendrítica. Al igual que las Affitinas, los aptámeros se utilizan de forma habitual como biomoléculas de reconocimiento, pero a diferencia de éstas, presentan una estructura de ácidos nucleicos. Los Aptadendrímeros se sintetizarán mediante una reacción SPAAC (*Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition*) entre los grupos azida de un dendrímero de la familia GATG y un grupo DBCO (*dibenzocyclooctyne*) previamente incorporado sobre el aptámero G-*quadruplex* AT11. En colaboración con el grupo de la profesora Carla Cruz (Universidade da Beira Interior, Portugal), se evaluará la complejación de un fármaco antitumoral a Aptadendrímeros, así como su capacidad de internalización celular y citotoxicidad.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 1

Liver X receptor activation with an intranasal polymer therapeutic prevents cognitive decline without altering lipid levels

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La ciencia no conoce de países porque el conocimiento le pertenece a la humanidad, y es la antorcha que ilumina al mundo.

Louis Pasteur

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Liver X Receptor Activation with an Intranasal Polymer Therapeutic Prevents Cognitive Decline without Altering Lipid Levels

Adapted from:

María Eugenia Navas Guimaraes,[a,†] Roi Lopez-Blanco,[b,†] Juan Correa,[b] Marcos Fernandez-Villamarin,[b] María Beatriz Bistué,[c] Pamela Martion-Adami,[c] Laura Morelli,[d] Vijay Kumar,[e] Michael F. Wempe,[e] A. C. Cuello,[f] Eduardo Fernandez-Megia[b] and Martin A. Bruno[a]

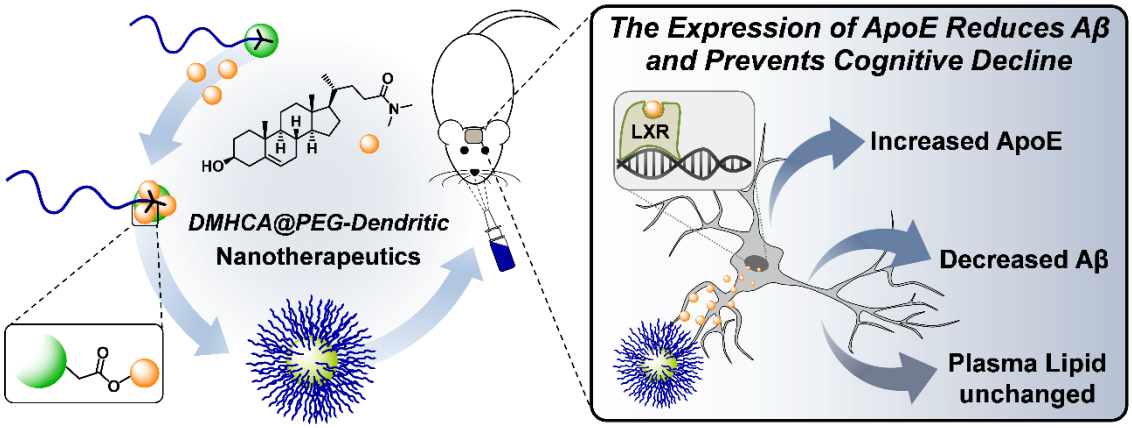
ACS Nano **2021**, *15*, 4678-4687.

[†] These authors contributed equally.
[a] Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica de Cuyo, 5400 San Juan, Argentina; National Council of Scientific and Technical Research (CONICET), C1425FQB Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
[b] Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS) and Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.
[c] Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica de Cuyo, 5400 San Juan, Argentina.
[d] Laboratory of Brain Aging and Neurodegeneration, Fundación Instituto Leloir, C1405BWE Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
[e] School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Colorado, Aurora, Colorado 80045, United States.
[f] Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec H3G 1Y6, Canada.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. CAPÍTULO 1. Liver X receptor activation with an intranasal polymer therapeutic prevents cognitive decline without altering lipid levels



The progressive accumulation of amyloid-beta (Aβ) in specific areas of the brain is a common prelude to lateonset of Alzheimer's disease (AD). Although activation of liver X receptors (LXR) with agonists decreases Aβ levels and ameliorates contextual memory deficit, concomitant hypercholesterolemia/hypertriglyceridemia limits their clinical application. DMHCA (*N*,*N*-dimethyl-3β-hydroxycholenamide) is an LXR partial agonist that, despite inducing the expression of apolipoprotein E (main responsible of Aβ drainage from the brain) without increasing cholesterol/triglyceride levels, shows nil activity *in vivo* because of a low solubility and inability to cross the blood brain barrier. Herein, we describe a polymer therapeutic for the delivery of DMHCA. The covalent incorporation of DMHCA into a PEG-dendritic scaffold via carboxylate esters produces an amphiphilic copolymer that efficiently self-assembles into nanometric micelles that exert a biological effect in primary cultures of the central nervous system (CNS) and experimental animals using the intranasal route. After CNS biodistribution and effective doses of DMHCA micelles were determined in nontransgenic mice, a transgenic AD-like mouse model of cerebral amyloidosis was treated with the micelles for 21 days. The benefits of the treatment included prevention of memory deterioration and a significant reduction of hippocampal Aβ oligomers without affecting plasma lipid levels. These results represent a proof of principle for further clinical developments of DMHCA delivery systems.

3.1. Introduction

The progressive accumulation of amyloid-beta (Aβ) in specific areas of the brain is a common prelude to lateonset of Alzheimer's disease (AD).[1] The amyloidcascade hypothesis has been for more than 25 years the central dogma for the development of AD.[2,3] This hypothesis states than imbalance between the production and clearance of Aβ in the brain of affected individuals is responsible for neurodegeneration and dementia. Monomeric Aβ progressively aggregates into Aβ oligomers and finally into amyloid fibrils, found in AD plaques previously considered to be the cause of cognitive deficits. Since the amounts of Aβ fibrillar plaques do not correlate with cognitive decline,[4,5] researchers have focused on the study of both soluble and membrane-associated Aβ oligomers to identify the Aβ form responsible for neurotoxicity. In this regard, strong evidence suggests that instead of monomer or Aβ

fibrils, diffusible A*β* oligomers are largely suspected to be responsible for development and progression of cognitive deterioration characteristic of AD, causing direct injury to neurons, enhancing neuroinflammation, astrocytosis, gliosis, and eventually neuronal loss.[2,6,7] As a result, the age-related impairment of A*β* homeostatic mechanisms has been postulated as a critical determinant of disease risk with even modest reductions in clearance of soluble A*β* resulting in elevated levels of A*β* oligomers and ultimately their progressive and chronic deposition within the brain. This process occurs while individuals are still cognitively normal. Thus, early intervention aimed to eliminating toxic A*β* oligomers in the brain offer a promising preventive therapeutic strategy not only to halt the development and progression of AD but also as a promising target for causal treatment of the disease.

The main contribution to A*β* drainage from the brain comes from apolipoprotein E (ApoE),[8,9] the strongest genetic risk factor of AD,[10] which modulates A*β* removal to the systemic circulation by its transport across the blood brain barrier (BBB).[11,12] The interaction between ApoE and A*β* is conditioned by the correct lipidation of ApoE, which is induced by the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1).[13,14] When amyloid precursor protein (APP) Tg mice are crossed onto an ABCA1$^{-/-}$ background, decreased ApoE lipidation and increased amyloid deposition are observed,[13,15,16] whereas increasing ABCA1 favors ApoE lipidation and reduces amyloid deposition.[14] Both ApoE and ABCA1 are modulated by cerebral expression of liver X receptors (LXRs) and mainly produced in the central nervous system (CNS) by astrocytes.[17]

Several studies have explored the potential utility of LXRs agonists in AD therapy.[13,14,17,18] *In vivo* studies using AD-like transgenic mouse models have revealed that LXRs agonists provoke an upregulation of ApoE and ABCA1 expression, a marked reduction in A*β* levels, enhanced brain cholesterol turnover, and reversed contextual memory deficits.[19-21] However, a major concern with LXRs agonists is that they not only drive up transcription of ApoE and ABCA1 but also upregulate genes associated with fatty acid synthesis. As a result, the therapeutic application of LXRs agonists has been restricted due to undesirable side effects, promoting lipogenesis and triglyceride accretion through the activation of sterol-response element binding protein 1c (SREBP-1c) expression.[22]

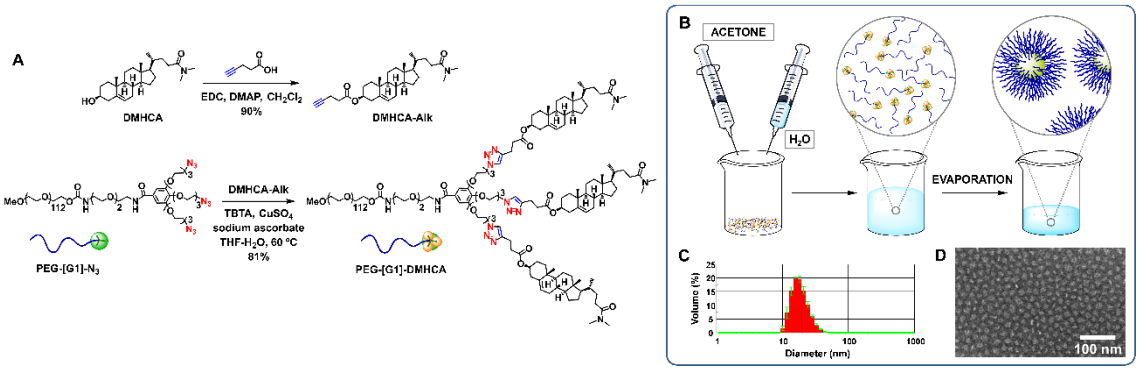


Figure 3.1. Synthesis of PEG-[G1]-DMHCA (**A**). Preparation of micelles (**B**). DLS histogram (**C**) and TEM image (**D**) of micelles.

DMHCA (*N*,*N*-dimethyl-3*β*-hydroxycholenamide, Figure 3.1) is a gene-selective LXR modulator that mediates potent transcriptional activation of ABCA1 and ApoE gene expression, while minimally affecting SREBP-1c.[22,23] Thus, it represents an excellent

therapeutic candidate for AD, circumventing the side effects of alternative LXRs agonists. Still, DMHCA's very low solubility and inability to cross the BBB limits its application *in vivo*.[24] To overcome these shortcomings and achieve enough delivery to target areas of the brain, herein we describe the covalent incorporation of DMHCA into a micellar polymer therapeutic, exploiting its unique hydroxyl group as chemical handle. Functionalization of a PEG-dendritic scaffold[25] [PEG is poly(ethylene glycol), a linear, hydrophilic polymer, characterized by low toxicity and immunogenicity and widely used for biomedical applications][26] with DMHCA has afforded an amphiphilic copolymer with precise stoichiometry that efficiently self-assembles into nanometric micelles (Figure 3.1) for intranasal administration.

3.2. Results and Discussion

Figure 3.1 shows PEG-[G1]-DMHCA, a conjugate incorporating a PEG_{5k} chain, a GATG (gallic acid-triethylene glycol)[27-29] dendritic block of first generation, and three pendant DMHCA molecules connected via carboxylate esters. These linkages were selected because of their known biodegradability *in vivo* by pH and the action of esterases and thus frequent use in the design of prodrugs.[30-32] In addition, esters show a good compromise between biodegradability and synthetic manipulation. GATG dendrimers have been developed in our laboratory as a platform for biomedical applications.[27-29] They are composed of a repeating unit incorporating a gallic acid core and hydrophilic triethylene glycol arms carrying terminal azides.[33]

The synthetic strategy toward PEG-[G1]-DMHCA has relied on an initial esterification of DMHCA with 4-pentynoic acid to afford DMHCA-Alk (EDC, DMAP, 90%), an alkynated derivative that was then connected via Cu(I)-catalyzed azide−alkyne cycloaddition (CuAAC)[34] to PEG-[G1]-N_3, a dendritic copolymer carrying three terminal azides, available in gram quantities in just one step[35] (Figure 3.1). A proper selection of the reaction conditions and the presence of catalytic tris(benzyltriazolylmethyl) amine (TBTA) were determining factors to efficiently lead CuAAC to completion [$CuSO_4$, ascorbate, TBTA, THF/H_2O (4:1), 60 ºC; see Table S3.1). PEG-[G1]-DMHCA was obtained in very good yield (81%) and chemically characterized with convincing evidence by ^{1}H NMR (disappearance of the methylene protons adjacent to the azide at 3.40 ppm, appearance of new triazol protons at 7.51 ppm), ^{13}C NMR (new triazol at 122.2 and 127.9 ppm), IR spectroscopy (loss of the intense azide band at 2100 cm^{-1}), and MALDI-TOF MS (a series of 44 Da spaced peaks with M_p and M_w in agreement with expected values) as described in Supporting Information (SI). In addition, characteristic new signals in the ^{1}H NMR [5.35 (alkene) and 3.00−2.93 ppm (*N*,*N*-dimethylamide)] and ^{13}C NMR spectra [173.6 ppm (amide) and 139.5 ppm (alkene)] confirmed the incorporation of DMHCA.

Micellar assembles of PEG-[G1]-DMHCA were obtained by an evaporation method in acetone/H_2O (1:1). Dynamic light scattering (DLS) measurements confirmed a mean diameter of about 22 ± 1 nm in agreement with transmission electron microscopy (TEM) images (Figures 3.1 and S3.2). These micelles containing a high 20% DMHCA drug loading were stable in solution for at least 1 week without variation in size or ester hydrolysis being observed (Figure S3.6). They could be freeze-dried and successfully resuspended in PBS (Figure S3.3), both relevant properties for storage and handling. Finally, to proceed with an *in vitro*/*in vivo* evaluation, a biotinylated version of the

micelles was obtained from Biotin-PEG-[G1]-DMHCA, a copolymer carrying biotin at the distal end of the PEG block prepared following a similar strategy from BocHNPEG-[G1]-N_3 (a copolymer analogous to PEG-[G1]-N_3 that incorporates a terminal protected amino group)[36] (Scheme S3.1 and Figure S3.4).

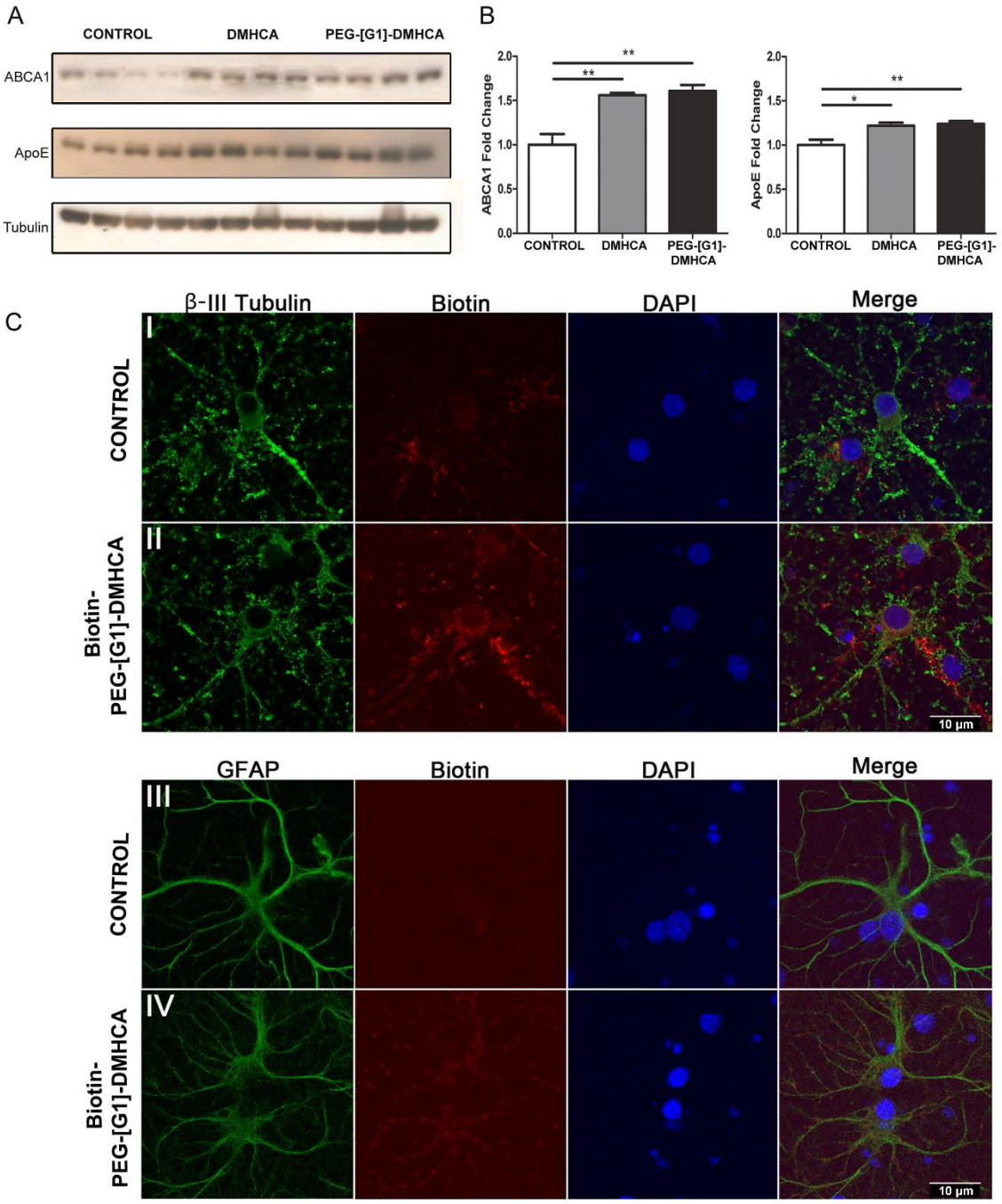


Figure 3.2. Biological effect of free DMHCA versus PEG-[G1]-DMHCA micelles versus PEG-[G1]-CO_2H (control) over ABCA1 and ApoE levels tested on cerebral cortical cocultures treated for 24 h (**A**,**B**). Statics analysis were performed using GraphPad Prism 6. All probability values were two-tailed; a level of 5% was considered significant. Data are reported as the mean ± SEM. Confocal microscopy (**C**) of displaying neuronal (panel II; *β*III-tubulin, green) and astrocytes (panel IV; GFAP, green) binding Biotin-PEG-[G1]-DMHCA (red) compared with controls (panels I and III, respectively). Nuclei stained in blue (DAPI). Scale bar, 10 µm.

To determine the therapeutic efficacy of PEG-[G1]-DMHCA, we compared the effect of DMHCA versus PEG-[G1]-DMHCA micelles on the ABCA1 and ApoE cell expression (PEG-[G1]-CO_2H, the block copolymer resulting after hydrolysis of DMCHA was used as control). After 14 days *in vitro*, rat cortical neuronal and glial cocultured cells (8×10^5 cells per well) were treated for 24 h with 10 μM free or micellar DMHCA. Levels of ABCA1 and ApoE were resolved by Western blots (Figure 3.2A). As depicted in Figure 3.2B, there were statistically significant increases in both target proteins in free DMHCA treated cells versus control (*t* test $p \leq 0.01$** and $p \leq 0.05$*, respectively) and DMHCA micelles treated cells versus control (*t* test $p \leq 0.01$** for both markers). The most striking finding is that both DMHCA and PEG-[G1]-DMHCA micelles upregulated target protein expression with respect to control with no statistical differences between them, confirming that PEG-[G1]-DMHCA micelles exert *in vitro* selective biological effects on ABCA1 and ApoE through LXRs activation.

Then, the target specificity of PEG-[G1]-DMHCA was evaluated by confocal imaging using the biotinylated version of the micelles. Neurons and astrocytes were incubated with Biotin-PEG-[G1]-DMHCA micelles (10 μM DMHCA) for 2 h. The distribution of Biotin-PEG-[G1]-DMHCA was examined, staining biotin with streptavidin-Alexa Fluor 594 (red) and nuclei with DAPI (blue). Neurons were marked with an anti-βIII-tubulin and a secondary antibody labeled with Alexa Fluor 488 (green). Biotin-PEG-[G1]-DMHCA displayed a strong signal and colocalized with neurons compared with control cells (Figure 3.2C, panels I and II). Similarly, astrocytes labeled with anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) and a secondary antibody-Alexa Fluor 488 (green) overlapped with Biotin-PEG-[G1]-DMHCA (red) (Figure 3.2C, panel III and control in panel IV). Overall, confocal imaging for primary cell culture displayed fluorescence intensity for both, neurons and astrocytes.

Having demonstrated the colocalization of PEG-[G1]-DMHCA with cells of the CNS *in vitro*, the *in vivo* administration of micelles was evaluated in mice. Drug delivery to the brain for the treatment of a wide variety of diseases has been traditionally hampered by the BBB. In recent years, the intranasal administration has come to light as an effective nose-to-brain passage that circumvents the BBB. The olfactory epithelium provides a direct pathway for the noninvasive, rapid, and comfortable delivery of therapeutic agents and drug delivery systems, including dendrimer nanoplatforms, to the CNS.[37-39] Administration doses of 0.2, 5, and 10 mg DMHCA/kg body weight/day (equivalent to 1, 25, and 50 mg of DMHCA micelles/kg body weight/day) were tested by intranasal administration. Mice received 5 μL per nostril of a solution of Biotin-PEG-[G1]-DMHCA micelles and after 4, 12, and 24 h of administration, cerebral cortex and hippocampus were analyzed (Figure 3.3). At 24 h post intranasal administration, confocal images (20×) delivered an overlapped green signal from Biotin-PEG-[G1]-DMHCA (stained with streptavidin-Alexa Fluor 488) and an astrocytes red signal from GFAP (marked with anti-GFAP followed by a secondary antibody-Alexa Fluor 594) in treated mice versus controls both at 5 and 10 mg of DMHCA/kg body weight/day (Figure 3.3A,B). At higher magnification (40×), in some images of the hippocampus, Biotin-PEG-[G1]-DMHCA also overlapped with DAPI (blue), indicating accumulation in the nuclei, where LXRs are expressed (Figure 3.3B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

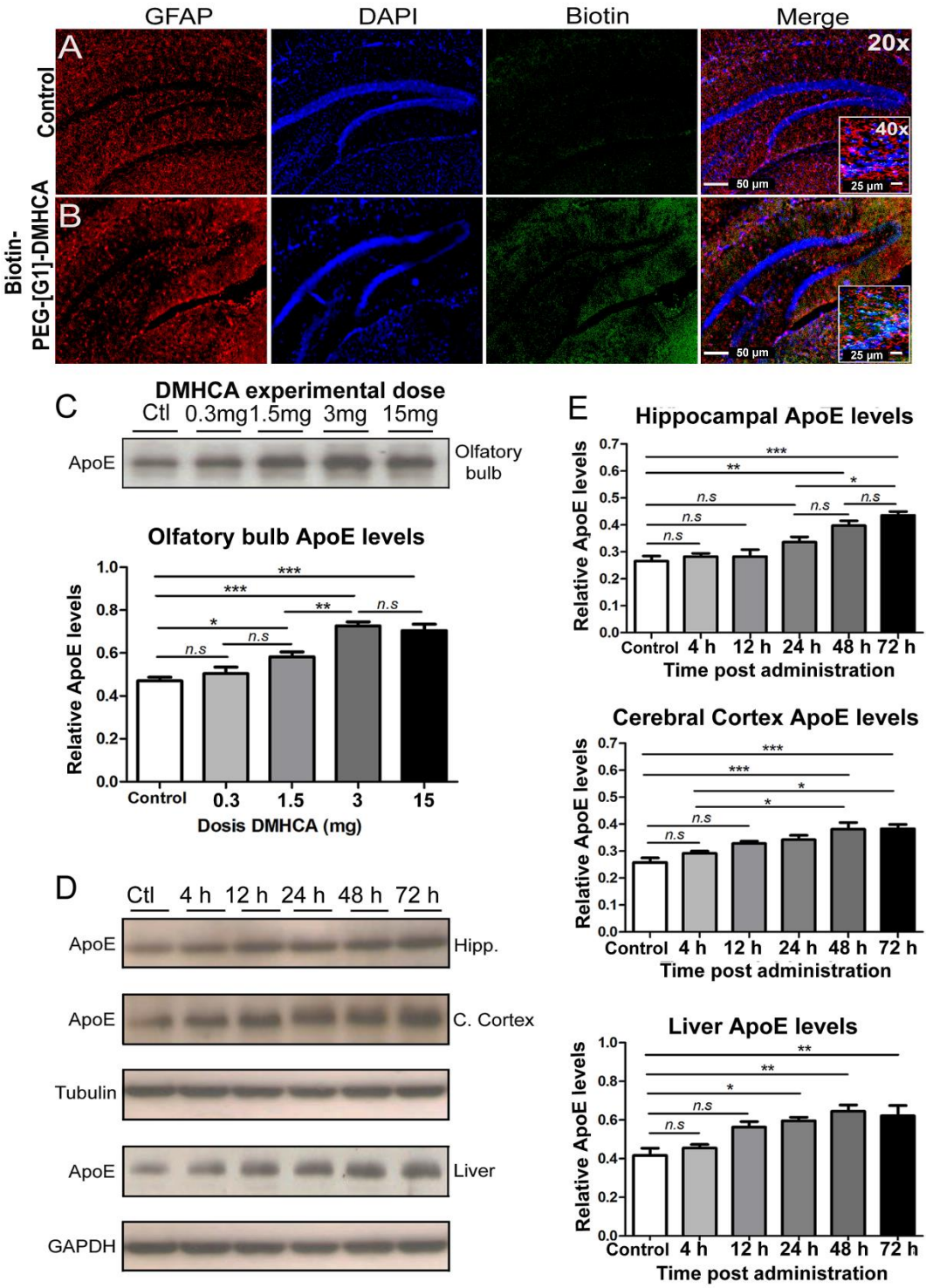


Figure 3.3. Biotin-PEG-[G1]-DMHCA intranasally administered reaches the hippocampus after 24 h. In the images, the colocalization of the used markers (red for GFAP/blue for DAPI, nuclei/green for Biotin) can be observed at 20× and 40× (scale bars 50 and 25 µm, respectively) (**A**,**B**). Effective intranasal dose analysis in mice: olfactory bulb levels of ApoE evaluated after 24 h by Western Blot (**C**). Relative levels of ApoE in homogenates of hippocampus, cerebral cortex, and liver; normalizing with values of *β*III-tubulin for hippocampus and cerebral cortex, and GAPDH for liver (**D**,**E**). Statics analysis was performed using Graph-Pad Prism 6. All probability values were two-tailed; a level of 5% was considered significant. Data are reported as the mean ± SEM.

In previously reported studies of DMHCA, experimental doses in mice ranged from 8 to 80 mg/kg body weight/day for systemic or oral administration, without penetration through the BBB.[22,23,40] We explored a range of four different doses of DMHCA, 0.3, 1.5, 3, and 15 mg/kg body weight/day, equivalent to 1.5, 7.5, 15, and 75 mg of PEG-[G1]-DMHCA/kg body weight/day. Animals were divided in five groups (n = 4 per group) and received a single intranasal dose with increasing concentrations of DMHCA micelles (10 μL total volume, 5 μL/nostril). After 24 h, mice were deeply anaesthetized and brains were rapidly removed. As depicted in Figure 3.3C, olfactory bulb levels of ApoE resolved by Western blots revealed that mice receiving 3 mg of DMHCA displayed increased relative ApoE levels compared to controls ($p \leq 0.001$, ***) and the 0.3 mg ($p \leq 0.001$, ***) and 1.5 mg ($p \leq 0.01$, **) groups. However, no significant differences were observed between the 3 and 15 mg groups. Altogether, we concluded that 3 mg of DMHCA/kg body weight/day displayed an effective dose−response, triggering upregulation of ApoE levels. As expected, the intranasal treatment of free DMHCA at the same concentrations did not affect the levels of ApoE.

To check the effectiveness of the selected pharmacological dose of DMHCA micelles (3 mg DMHCA/kg body weight/day) at different times post intranasal administration, experimental mice were divided into six groups (n = 5 per group), as follows: group A (control), saline; group B, one dose administered at time 0 and sacrificed 4 h later; group C, one dose at time 0 and sacrificed after 12 h, group D, one dose at time 0 and sacrificed after 24 h; group E, two doses at time 0 and 24 h, sacrificed at 48 h post first administration; and group F, three doses at time 0, 24, and 48 h, sacrificed at 72 h post first administration. As shown in Figure 3.3D, relative ApoE levels were determined by Western blots in hippocampus, cerebral cortex, and liver. Quantification in Figure 3.3E shows a significant increase in ApoE levels at 48 h post initial administration in hippocampus and cerebral cortex. An increase in ApoE levels ($p \leq 0.05$,*) at 24 h post initiation of administration is also observed in liver likely due to the high LXRs hepatic expression.

Next, we investigated the potential *in vivo* pharmacological effects of PEG-[G1]-DMHCA micelles on associated memory impairment and Aβ burden in our well-characterized AD-like amyloid pathology transgenic (Tg) mice.[41] Three month old mice were divided into two groups. A control group received daily 10 μL (5 μL/nostril) intranasal administration of PEG-[G1]-CO_2H (copolymer lacking DMHCA; 15 mg/kg body weight/day) for 21 consecutive days. The experimental group followed the same protocol and received 15 mg/kg body weight/day of DMHCA micelles (equivalent to 3 mg DMHCA/kg body weight/day). At the end of the treatment, we investigated whether chronic intranasal treatment with PEG-[G1]-DMHCA could prevent object recognition memory deficits characteristic of our Tg mice at this age [novel object recognition test (NOR)]. Gratifyingly, PEG-[G1]-DMHCA treated mice performed significantly better on the object recognition task than control mice ($p < 0.05$,*) and similar to nontransgenic age-matched littermates (Figure 3.4A). Figure 3.4B illustrates the immunoreactive Aβ burden in the right cerebral cortex and hippocampus of PEG-[G1]-CO_2H versus PEG-[G1]-DMHCA treated mice. The study revealed a significant reduction ($p \leq 0.05$,*) of Aβ positive neurons following PEG-[G1]-DMHCA treatment compared to control (Figure 3.4C).

USC DE COMPOSTELA

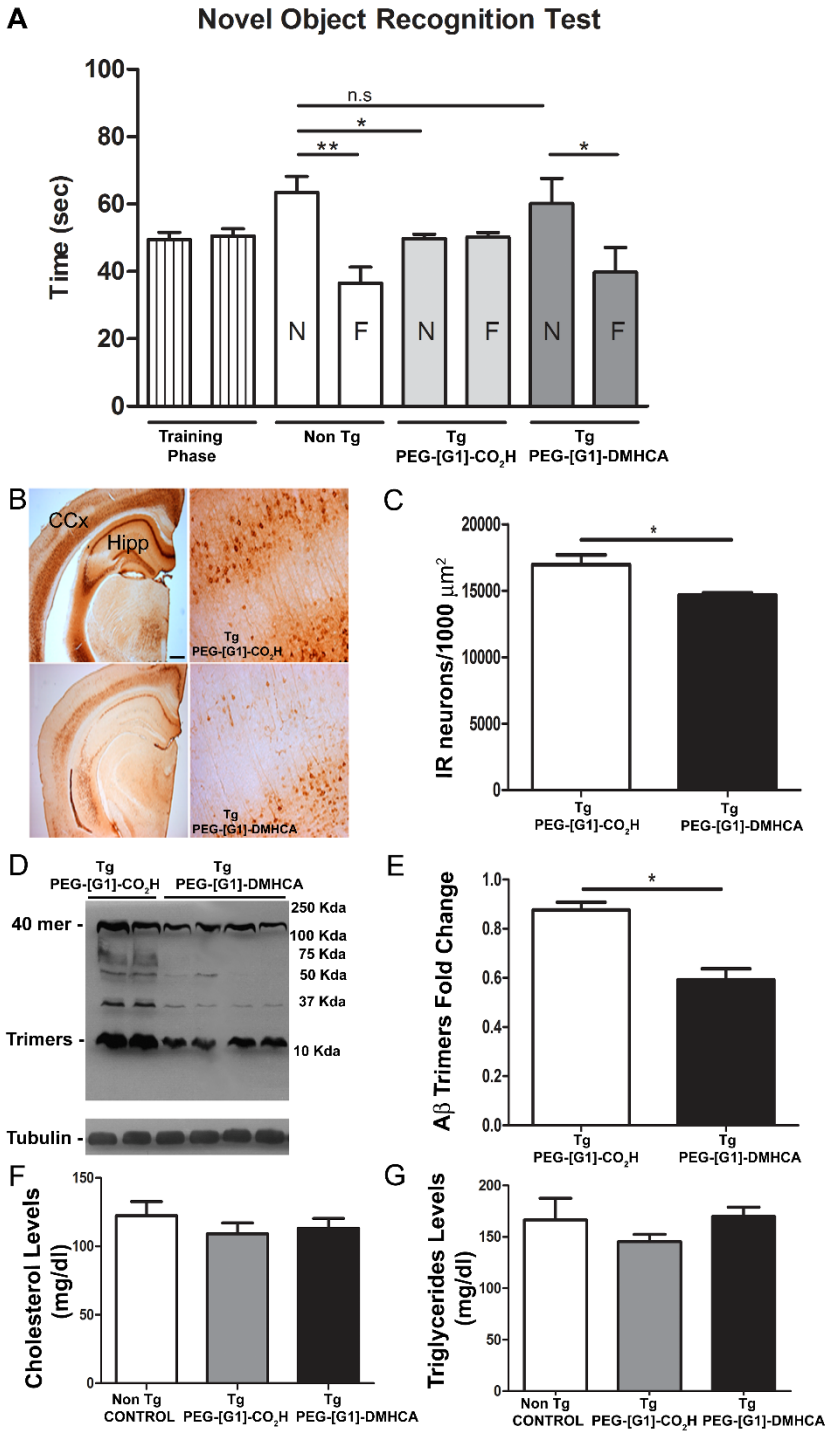


Figure 3.4. (**A**) Novel object recognition test: memory retention was tested 24 h after training. Data are mean ± SEM exploratory preferences during training (left columns) or test (white and gray columns; F, familiar; N, novel) trials (n = 8 per group). (**B**) Immunoreactive Aβ burden in the cerebral cortex (CCx) and hippocampus (Hipp) of PEG-[G1]-CO_2H versus PEG-[G1]-DMHCA treated mice. (C) Positive immunoreactive neurons were quantified using the Image Pro Plus software. (**D**) Hippocampal homogenates were resolved by Western blots using the 6E10 antibody; a particular reduction of the 12 kDa band, referred as Aβ trimers ($p \leq 0.05$,*, independent t test) was observed (**E**). Lipid plasma profile shows not statistically significant differences (independent t test) in the levels of cholesterol (**F**) and triglycerides (**G**) among groups. Statics analysis were performed using Graph-Pad Prism 6. All probability values were two-tailed; a level of 5% was considered significant. Data are reported as the mean ± SEM.

Left hippocampal homogenates were resolved by Western blots using the 6E10 antibody (Figure 3.4D). The analysis revealed several immunoreactive bands in Tg/PEG-[G1]-CO_2H animals between 12 and 120 kDa, mainly oligomeric forms of Aβ not appearing in hippocampal Tg/PEG-[G1]-DMHCA homogenates. Clearly, the micellar DMHCA treatment results in the clearance of most of the hippocampal 6E10 immunoreactive bands with a particular reduction of the 12 kDa band, referred to as Aβ trimers ($p \leq 0.05$,*; Figure 3.4E). Lastly, considering that significant efforts are currently directed toward developing LXRs ligands that lack an undesired upregulation of hepatic lipogenesis, the lipid plasma profile was studied, revealing no statistically significant differences in the plasma levels of cholesterol and triglycerides among groups (Figure 3.4F,G).

Finally, the potential cytotoxicity of the intranasal treatment with DMHCA micelles was evaluated in mice using a caspase 3/7 assay. Apoptosis is the process of programmed cell death that occurs in all living organisms. Detecting apoptosis is key to determine mechanisms of cell toxicity. In mammalian cells, apoptosis is accompanied by an increased production of caspases, enzymes responsible for the activation of signaling pathways and the proteolytic dismantling of key processes ultimately leading to cell death. To study the potential cytotoxic effects *in vivo* of PEG-[G1]-DMHCA micelles, we have investigated the specific activation of two effector caspases, caspase-3 and 7, which are downstream of the initiator events of the apoptotic cascade (see the SI). The analysis of homogenates of the olfactory bulb, hippocampus, cerebral cortex and liver of mice treated with PEG-[G1]-DMHCA micelles at different time-points (up to 72 h) indicates that the treatment does not mediate *in vivo* cell toxicity through an apoptotic mechanism at any of the experimental doses (Figure S3.7). The cytotoxic effect of the long-term PEG-[G1]-DMHCA treatment was also studied in 21 days-treated transgenic mice (Figure S3.8). Our studies do not reveal any statistical differences in caspase 3/7 activity between tissues [brain (olfactory bulb, hippocampus, and cerebral cortex), liver, lungs, and heart] of non Tg and Tg mice treated with PEG-[G1]-CO_2H (control) or PEG-[G1]-DMHCA micelles. Overall, our results indicate that the long-term intranasal treatment of PEG-[G1]-DMHCA micelles at the experimental dose (3 mg/kg body weight/day) does not trigger caspase-related cell toxicity mechanisms in our mice model.

3.3. Conclusions

The age-related impairment of Aβ homeostatic mechanisms has been postulated as a critical determinant of disease risk in AD with even modest reductions in the clearance of soluble Aβ resulting in elevated levels of toxic oligomers, and ultimately their progressive and chronic deposition within the brain. DMHCA represents an LXR partial agonist that despite inducing the expression of ApoE (mainly responsible of Aβ drainage from the brain) shows nil activity *in vivo* because of low solubility/inability to cross the BBB. Our DMHCA polymer therapeutic approach of intranasally administered dendritic micelles at very early stages of the pathology effectively prevents cognitive deficits assessed by the NOR test and reduces Aβ deposition without undesirable side effects, leaving the plasma levels of cholesterol and triglycerides unaffected. We believe these studies render suitable proof of principle for further successful clinical applications of DMHCA delivery systems.

3.4. Experimental section

Synthesis of DMHCA-Alk

DMHCA (100 mg, 0.25 mmol), DMAP (6.1 mg, 49.8 μmol), and EDC·HCl (62 mg, 0.32 mmol) were added to a solution of 4-pentynoic acid (29 mg, 0.30 mmol) in CH_2Cl_2 (0.5 mL) under Ar. After 20 h of stirring at room temperature, the solvent was evaporated and the mixture was diluted with CH_2Cl_2 (15 mL) and washed with 0.5 M HCl (2 × 10 mL) and brine (15 mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$) and concentrated to give a crude product that was purified by automated MPLC (gradient from hexane to EtOAc, silica, 15 min) to afford DMHCA-Alk (109 mg, 90%) as a white crystalline solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.37 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.71−4.56 (m, 1H), 3.00 (s, 3H), 2.93 (s, 3H), 2.57−2.44 (m, 4H), 2.41−2.14 (m, 4H), 2.05−0.88 (m, 28H), 0.68 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 173.8, 171.3, 139.7, 122.8, 82.7, 74.5, 69.1, 56.8, 56.0, 50.1, 42.5, 39.8, 38.2, 37.5, 37.1, 36.7, 35.7, 35.5, 33.8, 32.0, 31.4, 30.5, 28.3, 27.9, 24.4, 21.2, 19.4, 18.7, 14.6, 12.0. IR (ATR): 3321, 2933, 2851, 1733, 1625 cm^{-1}. ESI-MS (*m/z*): 482.3632. Calcd for $[M + H]^+$, $C_{31}H_{47}NO_3$: 482.3634.

Synthesis of PEG-[G1]-DMHCA

DMHCA-Alk (49 mg, 0.10 mmol) was added to a solution of PEG-[G1]-N_3 (100 mg, 17 μmol) in a mixture of THF (0.41 mL) and H_2O (26 μL). Then, TBTA (2.7 mg, 5.10 μmol), $CuSO_4$ (12.8 μL, 2.55 μmol, 0.2 M, 5 mol % per azide), and sodium ascorbate (64.0 μL, 12.80 μmol, 0.2 M, 25 mol % per azide) were added. After 12 h of stirring at 60 °C, a second portion of sodium ascorbate (64.0 μL, 12.80 μmol, 0.2 M, 25 mol % per azide) was added. After additional 24 h of stirring at 60 °C, the reaction mixture was partitioned between CH_2Cl_2 (15 mL) and 0.1 M EDTA pH 7 (15 mL). The organic layer was washed again with 0.1 M EDTA pH 7 (2 × 15 mL) and brine (15 mL). Then, it was dried ($MgSO_4$), evaporated, and purified by precipitation (CH_2Cl_2/Et_2O) to afford PEG-[G1]-DMHCA (100 mg, 81%) as a white solid. ^{1}H NMR (750 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.51 (s, 3H), 7.09 (s, 2H), 5.35 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H), 4.63−4.54 (m, 3H), 4.52−4.42 (m, 6H), 4.26−4.07 (m, 8H), 3.90−3.50 (m, ~484H), 3.40−3.31 (m, 7H), 3.04−2.96 (m, 15H), 2.93 (s, 9H), 2.72−2.64 (m, 6H), 2.35 (ddd, *J* = 15.6, 11.0, 5.1 Hz, 3H), 2.28 (d, *J* = 8.2 Hz, 6H), 2.20 (ddd, *J* = 14.8, 10.7, 5.6 Hz, 3H), 2.02−1.92 (m, 6H), 1.91−1.75 (m, 12H), 1.61−1.40 (m, 20H), 1.36−0.90 (m, 43H), 0.67 (s, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 173.6, 172.1, 166.9, 156.4, 152.3, 146.2, 139.5, 129.0, 127.9, 122.6, 122.2, 107.0, 74.1, 72.3, 71.9, 70.8, 70.2, 69.5, 68.8, 63.9, 59.0, 56.6, 55.9, 50.1, 49.9, 42.3, 39.6, 38.0, 37.3, 36.9, 36.5, 35.6, 35.4, 34.0, 31.8, 31.2, 30.3, 28.1, 27.7, 24.2, 21.0, 19.3, 18.5, 11.8. IR (ATR): 3523, 2868, 1730, 1640, 1104 cm^{-1}. MALDI-TOF MS (HABA, linear mode, *m/z*): Calcd, M_p 7251 ($[M + H]^+$), M_n 7278; Found, M_p 7258 ($[M + H]^+$), M_n 7243, M_w 7272.

Preparation of DMHCA Micelles

PEG-[G1]-DMHCA was dissolved in a mixture of acetone/H_2O (1:1, 0.5 mg/mL) and stirred at room temperature for 48 h until acetone was completely evaporated. The resulting micelles (1 mg/mL) were freeze-dried. Biotin-PEG-[G1]-DMHCA micelles with a 10% biotin loading were prepared following the same procedure as above from a mixture of PEG-[G1]-DMHCA and Biotin-PEG-[G1]-DMHCA in a molar ratio 9:1. DLS histograms and correlation functions of the micelles as prepared and after

USC DE COMPOSTELA

resuspension in 10 mM PB, pH 7.4, 150 mM NaCl (1 mg/mL) are shown in Figure S3.2-S3.4.

^{1}H NMR analysis of the micelles revealed at a glance that there is a core−corona structure (Figure S3.5). Only resonances for the flexible PEG chains at the hydrophilic corona are visible, whereas nuclei from DMHCA and the dendritic block are absent from the spectrum as a result of their restricted mobility at the compact core. Interestingly, no ester hydrolysis is observed during the preparation/storage of the micelles as revealed by the ^{1}H NMR of a lyophilized sample of micelles after being redissolved in $CDCl_3$ (Figure S3.6).

Primary Neuronal/Glial Cultures

Primary cortical cells (neurons cocultured with glia) were obtained from embryonic rats using a standard procedure. Briefly, 8−10 embryos E15−16 were extracted from the uterus of pregnant Wistar rats and cerebral cortices were isolated in HBSS buffer (Thermo Scientific). The tissue was incubated with 2 mL of 0.25% trypsin-EDTA (Thermo Scientific) for 15 min at 37 °C and then washed twice with DMEM/F12−10% FBS. The medium was replaced by Neurobasal (Thermo Scientific) and cortices were homogenized by pipetting up and down. After that, cells were incubated for 10 min at room temperature and then centrifuged at 200×g for 5 min. The medium was discarded and replaced with 2 mL of neuronal medium (Neurobasal, 2 mM L-glutamine, 2% B27 (Thermo Scientific), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin). Cells were resuspended, and viability was assessed with Trypan blue dye. Then, cells were plated in previously poly-L-lysine coated 12 mm-diameter coverslips for immunofluorescence experiments (1.5×10^5 cells per coverslip) or 6-multiwell plates for Western blot experiments (8×10^5 cells per well) and maintained in a 37 °C humidified incubator with 5% CO_2 until DIV (days *in vitro*) 14.

In vitro Biological Effects

The primary cell culture was plated at 8×10^5 cells per well in 6-well plates. Immediately, PEG-[G1]-CO_2H (control), free DMHCA, or PEG-[G1]-DMHCA micelles were added to the conditioned medium of DIV14 cells to a final concentration of 10 µM DMHCA. Cultures were then incubated in a 37 °C humidified incubator with 5% CO_2 for 24 h. After incubation, the conditioned medium was aspirated and cells (neurons and glia) were washed in cold PBS and lysed in RIPA buffer containing protease inhibitors (SigmaFast protease inhibitor, St. Louis, MO).

Cell Uptake Experiment and Fluorescence Imaging In vitro

Biotin-PEG-[G1]-DMHCA micelles were added to the conditioned medium of DIV14 cells to a final concentration of 10 µM of DMHCA, and cultures were then incubated in a 37 °C humidified incubator with 5% CO_2 for 2 h. Then, the conditioned medium was aspirated, and cultures were washed with cold PBS and fixed in 4% PFA. Cells were incubated with primary antibodies anti-βIII-tubulin (1:1000, mouse, Promega) or antiglial fibrillary acidic protein (GFAP 1:1000, rabbit, Dako) overnight at 4 °C, followed by incubation with secondary antibodies labeled with Alexa Fluor 488 (green) or streptavidin-Alexa Fluor 594 (red). Coverslips were mounted with Mounting Medium with DAPI (blue) and images were obtained with a confocal Zeiss LSM 510

Meta microscope with a 40× oil-immersion lens and analyzed with LSM5 image browser software.

Confocal Fluorescence Imaging

Mice received a single intranasal dose of Biotin-PEG-[G1]-DMHCA micelles (0.6 mg in 10 μL PBS), and 24 h later their brains were perfused-fixed. Then, 30 μm thick sections containing the hippocampus and cerebral cortex regions were prepared, and double immunostaining was performed to identify astrocytes and Biotin-PEG-[G1]-DMHCA. DAPI was added to stain nuclei (blue). Astrocytes were identified with rabbit antiglial fibrillary acidic protein (GFAP 1:1000, rabbit, Dako) followed by incubation with secondary antibodies labeled with Alexa Fluor 594 (red). Biotin-PEG-[G1]-DMHCA was identified using streptavidin-Alexa Fluor 488 (green). In all cases, sections were preincubated, blocked with the corresponding normal serum secondary antibody and coverslips were mounted with Gelvatol. The colocalization of Biotin-PEG-[G1]-DMHCA and astrocytes marker images were obtained with a confocal Zeiss LSM 510 Meta microscope with a 40× oil-immersion lens and analyzed with LSM5 image browser software.

Animals, Intranasal Delivery Dose−Response, and Treatment Experiments

Three-month-old mice (n = 4−5/condition) were weighed and assigned to treatment groups. Mice received daily intranasal delivery of control (PEG-[G1]-CO_2H or saline) or PEG-[G1]-DMHCA micelles in PBS. The intranasal delivery was performed according to the protocol described by Hanson *et al.*[42] First, mice were subjected to simulated delivery for 1 week before treatments to reduce the stress due to the procedure.

For intranasal delivery, mice were hand-restrained, placed in a supine position, and given two 5 μL drops of PEG-[G1]-DMHCA micelles, or a control solution, into both nostrils consecutively. Mice were given an extra 5 μL treatment drop if the subject forcibly ejected or sneezed out the solution. Mice were held supine for 5−10 s after delivery to ensure that all fluid was inhaled. These volumes have shown to deliver drugs mostly to the brain without passage to the pulmonary regions. For dose−response experiments, mice received a range of 0.01 to 0.5 mg DMHCA per animal contained into micelles (equivalent to 0.3−15 mg DMHCA/kg body weight/day).

For treatment experiments, McGill-Thy1-APP transgenic (Tg) mice were three months old when they started the treatment and were sacrificed 21 days after. Young, preplaque three-month-old Tg mice received 15 mg/kg body weight/day of PEG-[G1]-CO_2H (Tg-control) or 15 mg/kg body weight/day of PEG-[G1]-DMHCA micelles by intranasal administration for a 3 week period (non Tg control, n = 5 received intranasal administration of PBS; Tg/PEG-[G1]-CO_2H, n = 5; Tg/PEG-[G1]-DMHCA micelles, n = 5). The animals were housed in groups of up to four in individually ventilated cages under standard conditions (22 °C, 12 h light−dark cycle) receiving food and water ad libitum. All procedures were approved by the Animal Care Committee of the Catholic University of Cuyo, Argentine and followed the guidelines of the Argentinean Council on Animal Care.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Perfusion and Tissue Preparation Technique

Experimental mice were deeply anesthetized with equithesin (pentobarbital-based, 2.5 mL/kg, i.p.) and perfused through the heart with ice-cold saline solution (pH 7.4) for 1 min. The brains were then quickly removed and divided into right and left hemispheres on ice. The cortex, hippocampus, and olfactory bulb were dissected from the left hemisphere, snap-frozen in dry ice, and stored at −80 °C for biochemical analysis. The same treatment was applied to the liver. The right hemisphere was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PBS, pH 7.4) for 24 h at 4 °C. The tissue was then cut into 30 µm thick sections with a freezing sledge microtome (SM 2000R, Leica) at −20 °C and free-floating sections were collected in PBS and processed for immunofluorescence.

Plasma Lipid Parameters

Blood was withdrawn intracardially and EDTA-plasma was prepared within 20 min. Plasma TG (Wiener lab, Argentine) and total cholesterol (Wiener lab, Argentine) concentrations were measured enzymatically.

Novel Object Recognition Test

The NOR (Novel Object Recognition) was performed according to established protocols.[43] Briefly, three-month-old mice, Tg and non Tg subjected to treatment, were habituated first to an empty open field box of 50 cm × 50 cm × 30 cm (for 10 min). After 24 h of the habituation session, mice were exposed to two identical nontoxic "familiar" objects (culture bottles filled with sand, T25). Between each test, the open field was cleaned with 70% ethanol to eliminate olfactory signals. After a retention interval of 4 h, animals were again exposed to the field where two objects were located, one familiar and one novel (insert cube, red). The definition of exploring that was used consists of detecting that the mouse was sniffing, climbing or touching the object or was at a distance of at least 3 cm from the object, while facing it or facing it. Each session lasted 10 min, and during this time mice were allowed to interact freely with the objects and the amount of exploration time of each object was recorded with the HVS Image software. The objects were randomized and counterbalanced through the animals. Animals that spent less than 7 s exploring objects during the 10 min training session were excluded from the analysis.

3.5. Supporting information

Materials

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich or Fluka unless otherwise noted. All solvents were HPLC grade, purchased from Scharlab, Sigma-Aldrich or Acros Organics. Et_3N was dried under 4Å molecular sieves. DMF and CH_2Cl_2 were dried using a SPS800 solvent purification system from MBRAUN. H_2O of Milli-Q grade was obtained from a Millipore water purification system. PEG-[G1]-N_3,[35,44] BocHN-PEG-[G1]-N_3,[36] and control treatment PEG-[G1]-CO_2H[45,46] with PEG_{5k} were prepared following previously reported procedures. DMEM media, antibiotic-antimycotic (AA), fetal bovine serum (FBS), trypsin/EDTA solution, and methanol-free formaldehyde (10%) were purchased from Life Technologies. Poly-L-lysine-treated glass coverslips were purchased from Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ). Rabbit anti-ApoE

antibody, Rabbit anti-ABCA1 and Mounting Medium with DAPI were purchased from Abcam and goat anti-rabbit Fc antibody from Biorad. Anti-biotin (Jackson Immuno Research) and Anti-GFAP from Dako.

Instrumentation

Column Chromatography. Automated column chromatography was performed on a MPLC Teledyne ISCO CombiFlash RF 200 psi with RediSep Rf normal-phase 12 g silica columns.

Ultrafiltration. Purifications by ultrafiltration were performed on Millipore Amicon stirred cells using Amicon YM3 regenerated cellulose membranes (MWCO 3 kDa) under 5 psi N_2 pressure.

NMR Spectroscopy. NMR spectra were recorded on Varian Inova 400 MHz, Bruker DRX 500 MHz and Bruker NEO 750 MHz spectrometers. Chemical shifts are reported in ppm (δ units) downfield from the HOD solvent peak (D_2O) or internal tetramethylsilane ($CDCl_3$). All spectra were processed using Mestre Nova 9.0.0 software (Mestrelab Research).

Infrared Spectroscopy. FT-IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum Two equipped with a UATR accessory.

Mass Spectrometry. ESI-MS mass spectra were collected on a Bruker Microtof spectrometer. MALDI analysis were performed in a 4800 MALDI-TOF/TOF analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PEG-[G1]-DMHCA was dissolved in 50 μL of $CHCl_3$. Then, different dilutions (sample: matrix) were made: 1 μL of polymer solution was mixed with 20 μL (1:20 dilution) or 40 μL (1:40 dilution) of a 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid (HABA) solution (0.05 M in dioxane) and analyzed by MALDI-TOF. 1 μL aliquots were deposited using the dried-droplet method onto a 384 Opti-TOF MALDI plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). MS spectra were acquired in linear mode (20 kV source) with a Nd:YAG, (355 nm) laser, and averaging 1000 laser shots.

Dynamic Light Scattering (DLS). DLS measurements were carried out on a Malvern Nano ZS (Malvern Instruments, U.K.) operating at 633 nm with a 173º scattering angle, at 25 ºC. Hydrodynamic diameters of micelles (1 mg/mL) were measured at 25 ºC in H_2O or 10 mM PB, pH 7.4, 150 mM NaCl. Mean diameters were obtained from the volume particle size distribution provided by Malvern Zetasizer Software.

Transmission Electron Microscopy (TEM). TEM measurements were performed on a JEOL JEM-1011 operated at 100 kV electron microscope equipped with a camera MegaView G2. A drop of a solution of micelles (0.1 mg/mL) was settled on a PELCO® TEM carbon type-B film copper grid (Ted Pella, Inc.) and allowed to dry at room temperature for 12 h. Negative staining was performed by using a droplet of 2% uranyl acetate following standard procedures. The size of the micelles was determined with ImageJ software (version 1.51j8) measuring the line intensity profile across the assemble. An average diameter of 17±2 nm was obtained by measuring the size of 25 micelles.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Synthesis of DMHCA

CH_2Cl_2 (50 mL) was purged at 0 °C with dimethylamine (gas) for 5 min with slow flow rate. Then, 3β-hydroxy-Δ^5-cholenic acid (500 mg, 1.33 mmol), DCC (329.3 mg, 1.60 mmol) and DMAP (16.3 mg, 0.13 mmol) were added under N_2. The temperature was raised to room temperature and the reaction mixture was stirred for 48 h. Then, the solvent was evaporated and EtOAc (100 mL) was added. The resulting mixture was filtered and sequentially washed with sat $NaHCO_3$ (50 mL), sat NH_4Cl (50 mL) and brine (50 mL), dried (Na_2SO_4) and evaporated. The residue was purified by column chromatography (gradient from hexane/EtOAc 1:3 to 1:4, silica) to give DMHCA (400 mg, 75%) with identical NMR data to that previously reported.[47]

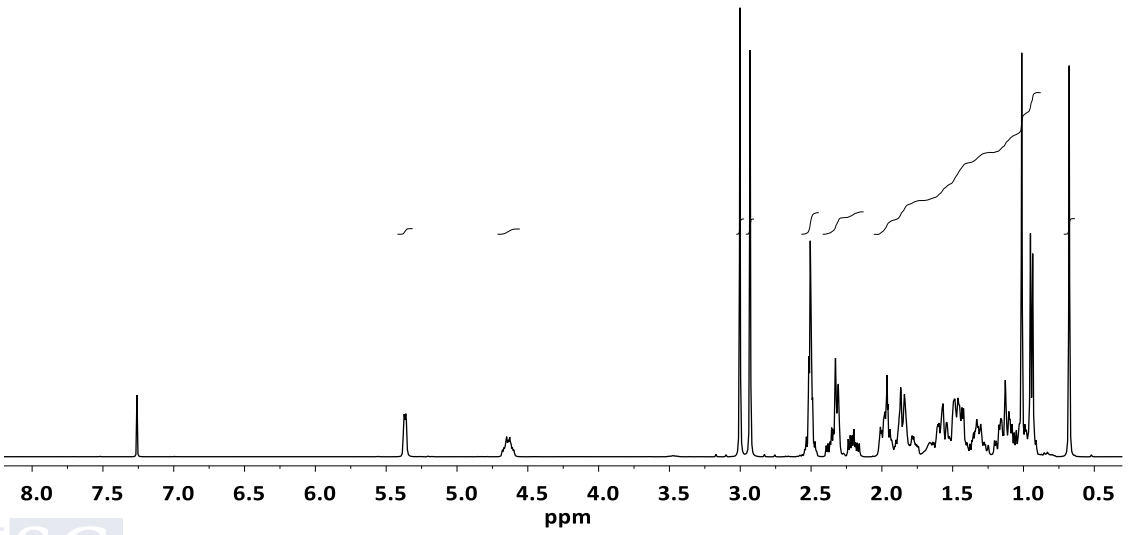
Table S3.1

Table S3.1. Optimization of CuAAC coupling conditions (6 equiv DMHCA-Alk, 5 mol% $CuSO_4$ per azide, THF:H_2O, 4:1).

TBTA (mol% per N_3)	[N_3] (M)	T (°C)	t (h)	Conversion (%)*
-	0.05	rt**	24	0
0.10	0.05	rt**	168	43
0.10	0.05	60	120	93
0.10	0.10	60	36	100

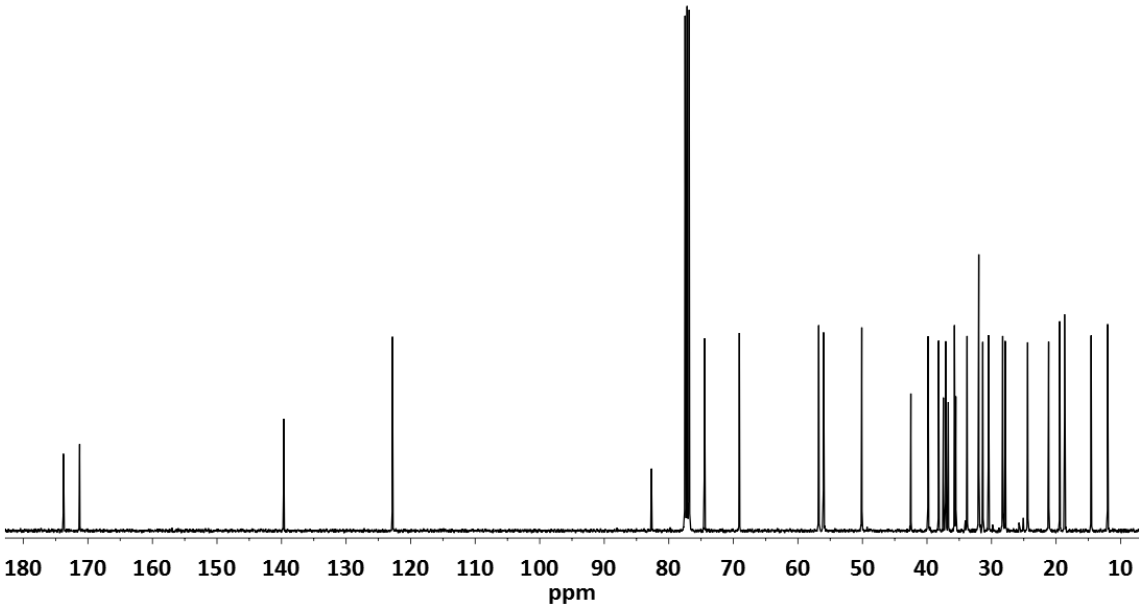
* Conversion by ^{1}H NMR.
** Room temperature.

Characterization of DMHCA-Alk and PEG-[G1]-DMHCA

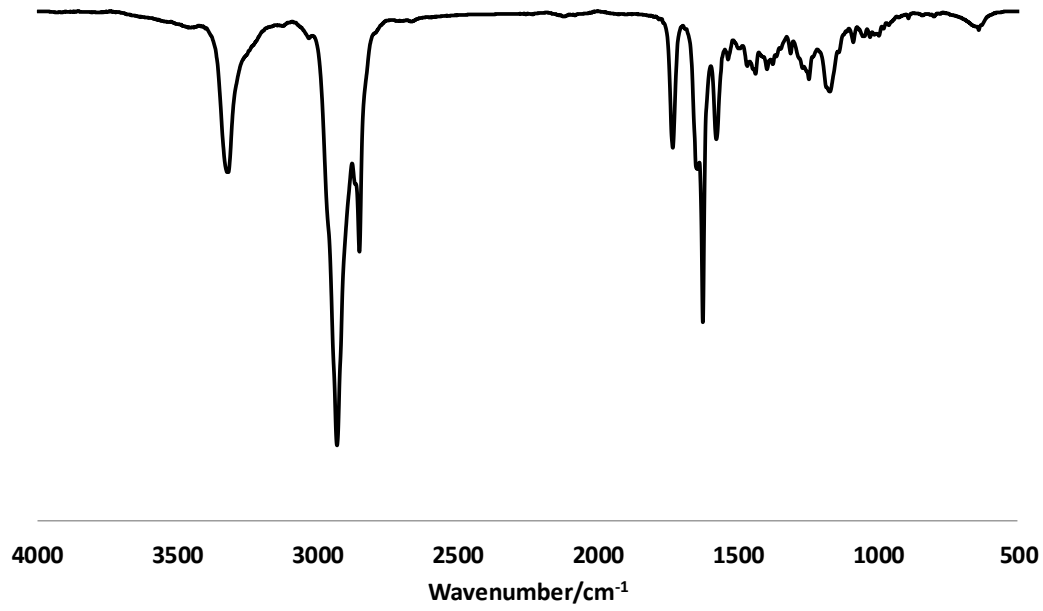


^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$, 400 MHz) of DMHCA-Alk.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

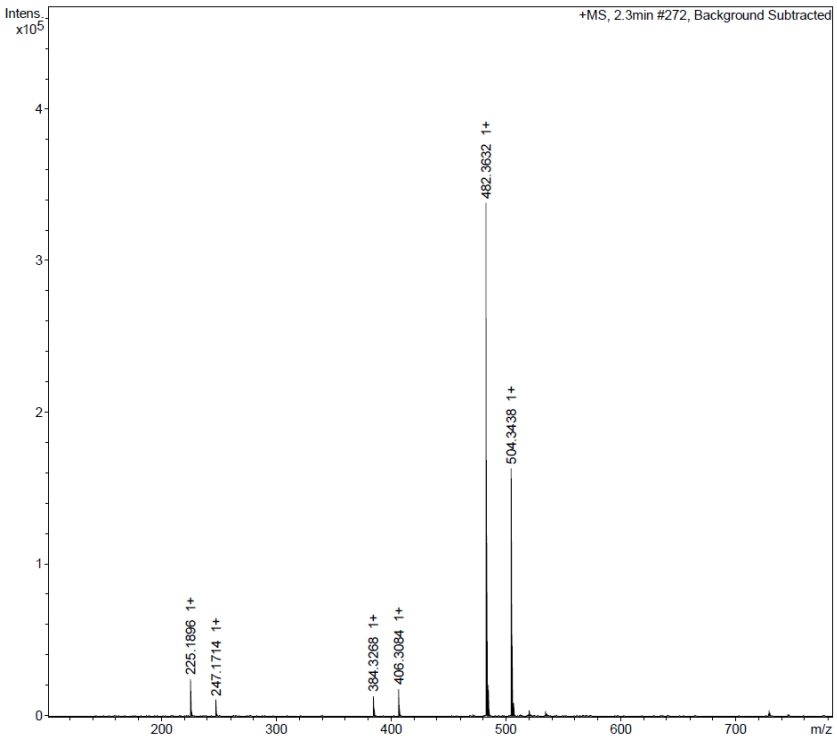


^{13}C NMR spectrum ($CDCl_3$, 100 MHz) of DMHCA-Alk.

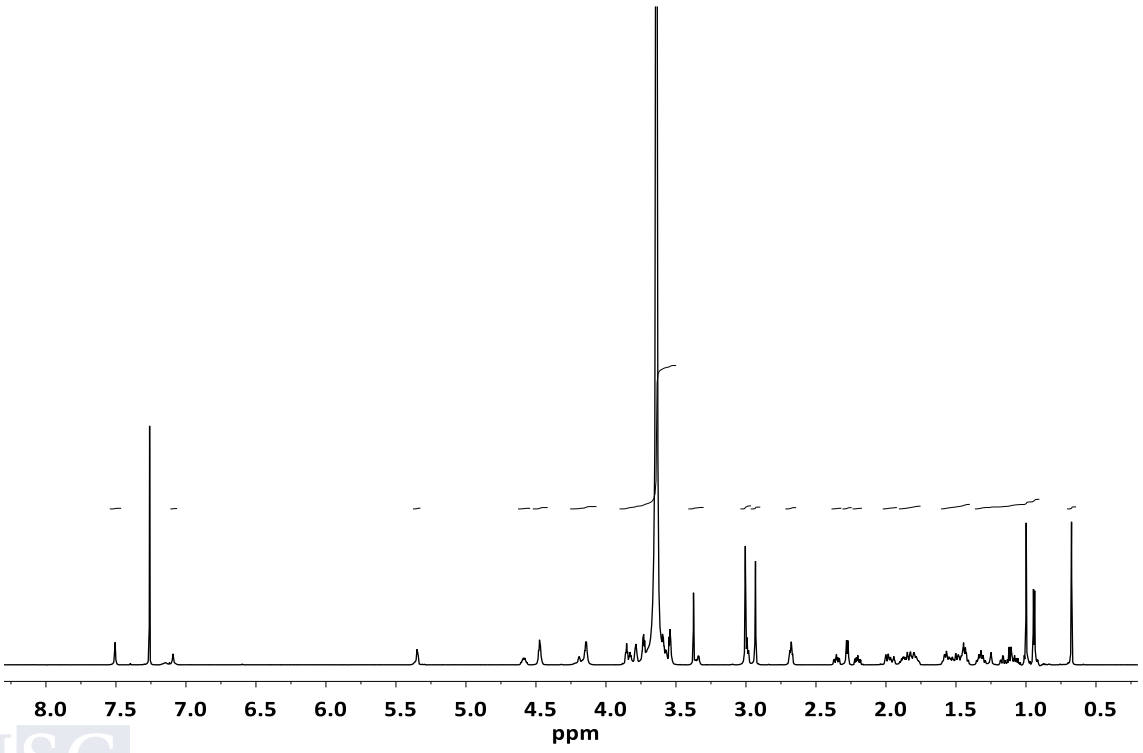


IR spectrum of DMHCA-Alk.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

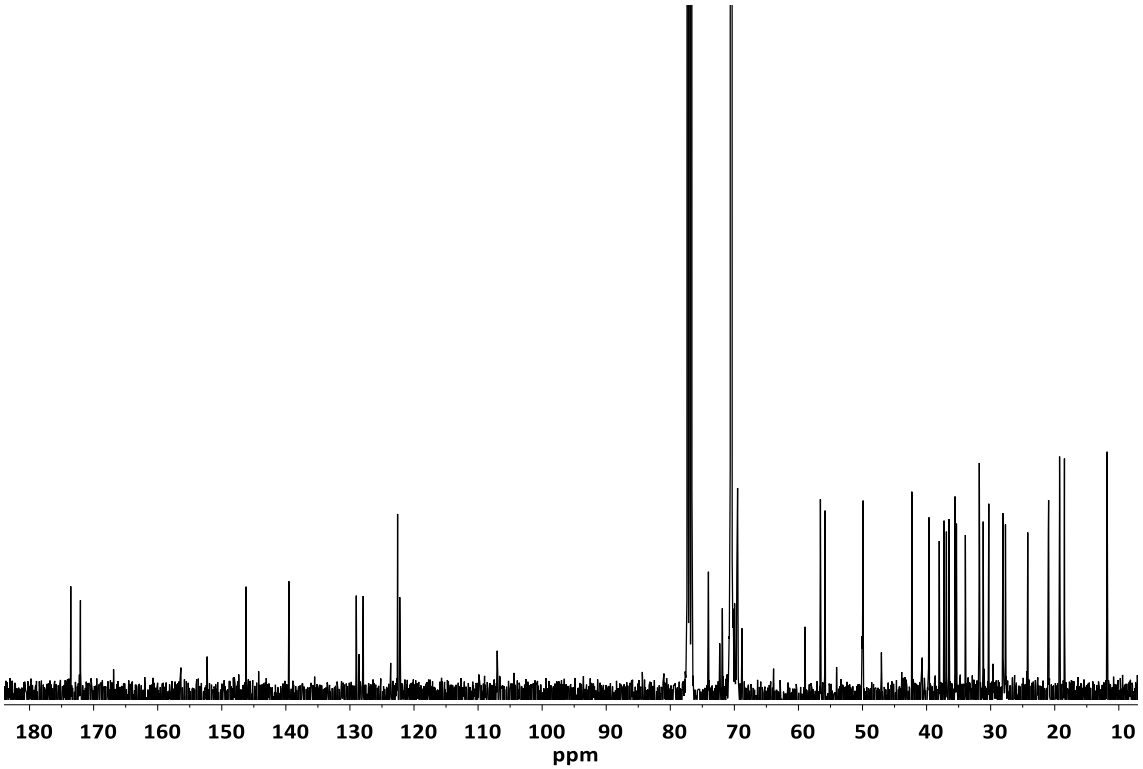


ESI-MS of DMHCA-Alk.

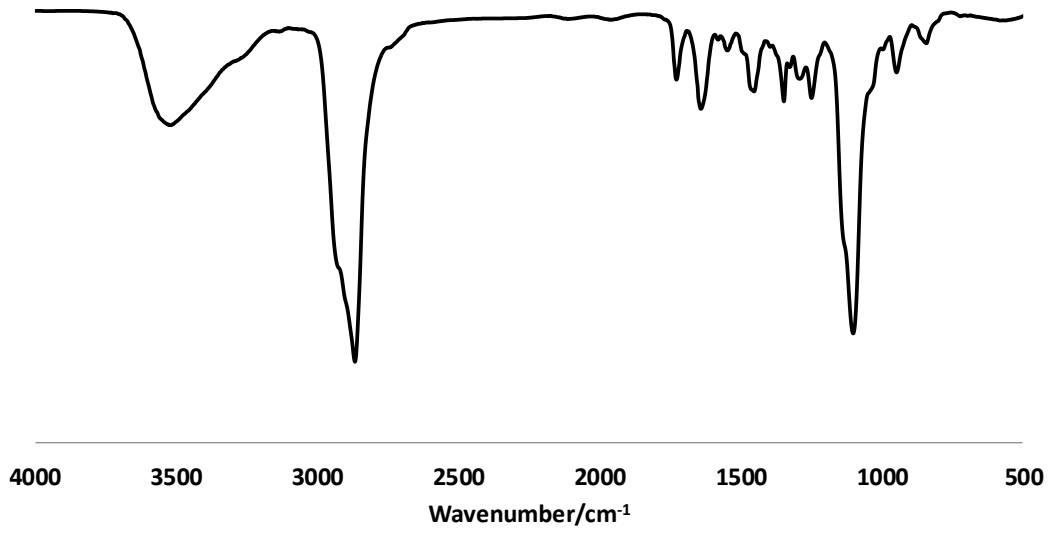


^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$, 750 MHz) of PEG-[G1]-DMHCA.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

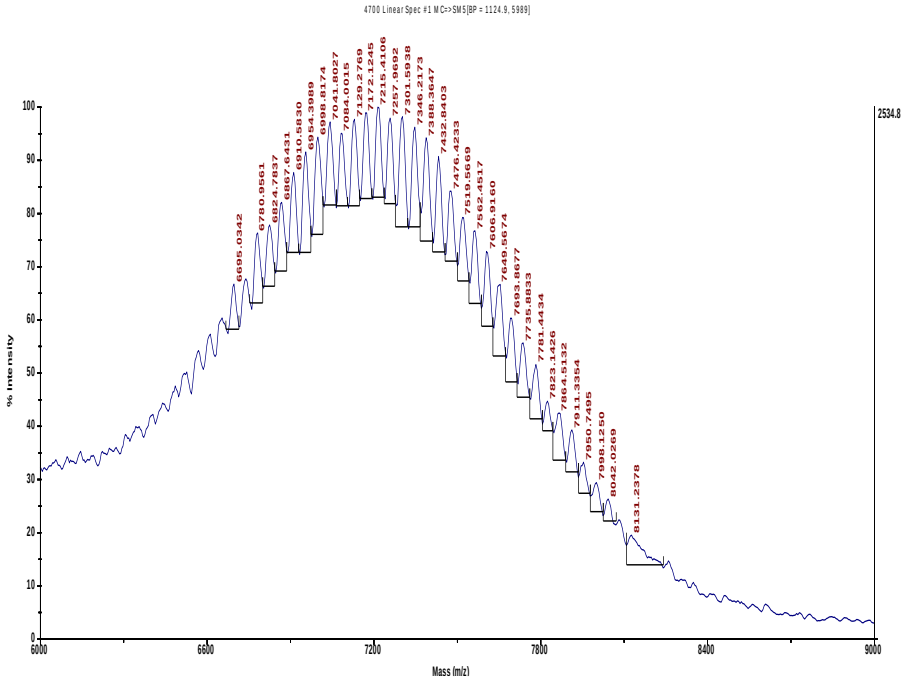


^{13}C NMR spectrum ($CDCl_3$, 100 MHz) of PEG-[G1]-DMHCA.



IR spectrum of PEG-[G1]-DMHCA.

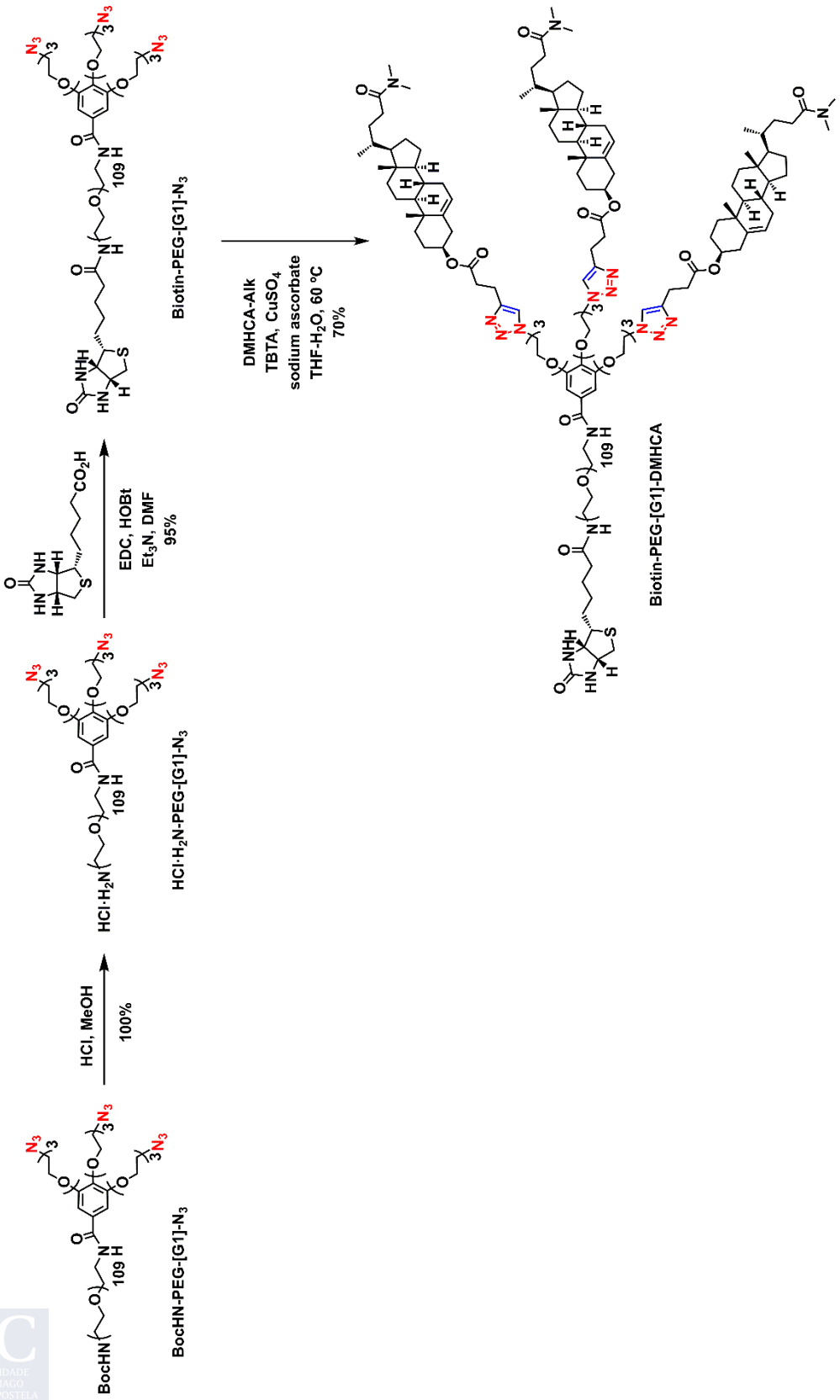
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



MALDI-TOF MS of PEG-[G1]-DMHCA.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

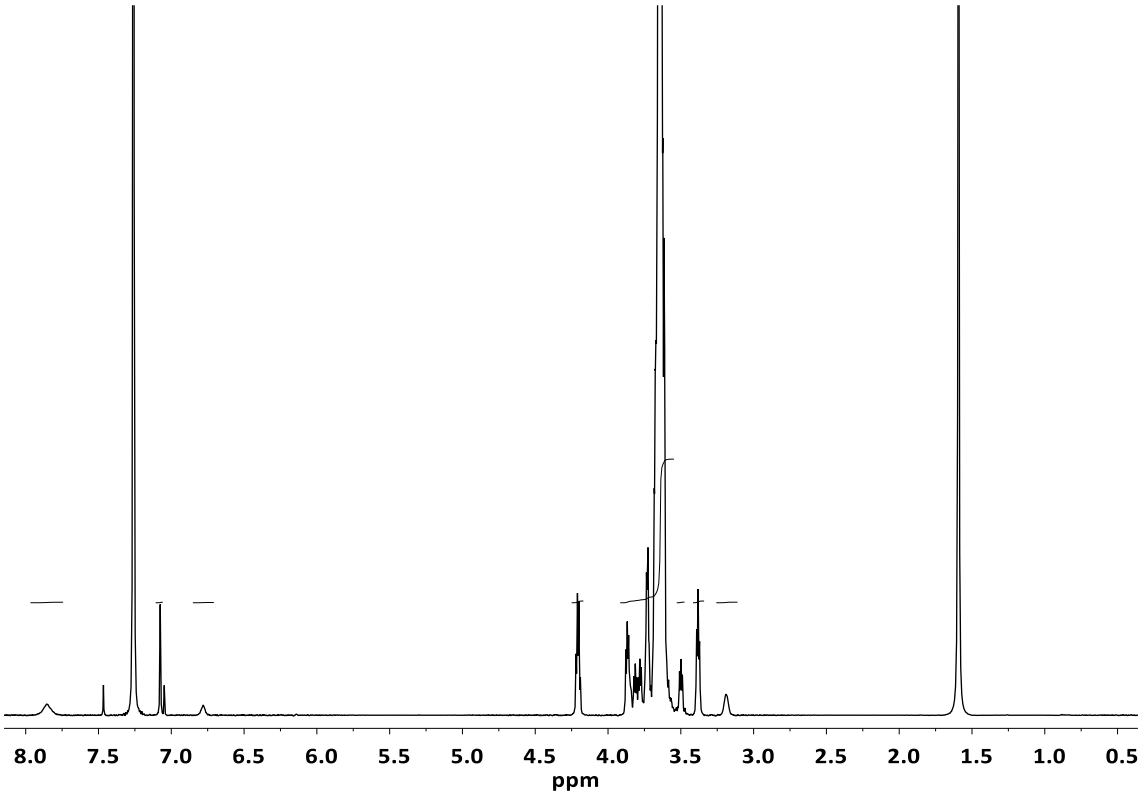
Synthesis and Characterization of Biotin-PEG-[G1]-DMHCA



Scheme S3.1. Synthesis of Biotin-PEG-[G1]-DMHCA.

HCl·H_2N-PEG-[G1]-N_3

BocHN-PEG-[G1]-N_3 (98 mg, 18 μmol) was dissolved in a mixture of MeOH (0.75 mL) and HCl (0.25 mL, 2.53 mmol, 37%). After 90 min of stirring at room temperature, the reaction mixture was evaporated to afford HCl·H_2NPEG-[G1]-N_3 (99 mg, 100%) as a white solid. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.85 (br s, 2H), 7.08 (s, 2H), 6.78 (br s, 1H), 4.25-4.17 (m, 6H), 3.92-3.55 (m, ~462H), 3.50 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.42-3.34 (m, 6H), 3.19 (br s, 2H).

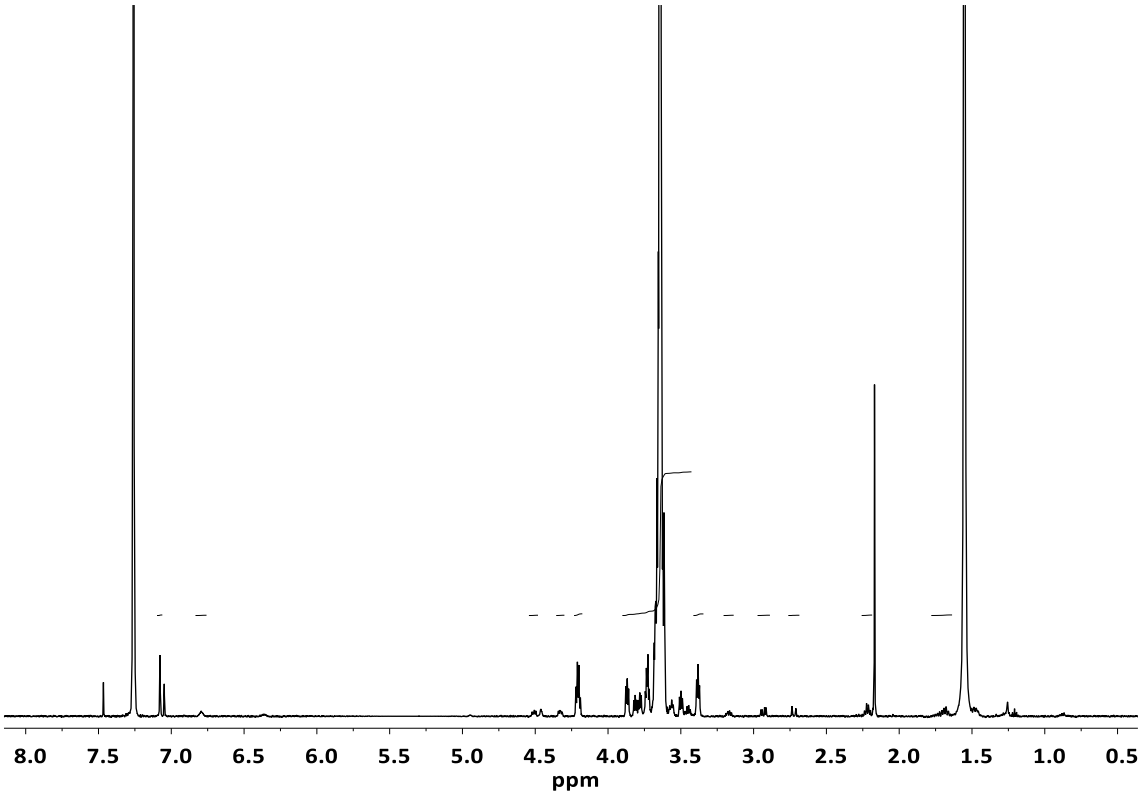


^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$, 500 MHz) of HCl·H_2N-PEG-[G1]-N_3.

Biotin-PEG-[G1]-N_3

Biotin (3.2 mg, 13.10 μmol), HOBt (1.8 mg, 13.10 μmol) and EDC·HCl (2.6 mg, 13.10 μmol) were added to a solution of HCl·H_2N-PEG-[G1]-N_3 (30.0 mg, 4.36 μmol) and Et_3N (4 μL, 26.19 μmol) in DMF (2.2 mL) under Ar. After 16 h of stirring at room temperature, the reaction mixture was purified by ultrafiltration (YM3) washing with H_2O (10 mL), 0.1 M $NaHCO_3$ (2 × 10 mL) and H_2O (4 × 10 mL) to give Biotin-PEG-[G1]-N_3 as a white solid after freeze-drying (29.4 mg, 95%). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.08 (s, 2H), 6.79 (br s, 1H), 4.54-4.48 (m, 1H), 4.35-4.30 (m, 1H), 4.24-4.17 (m, 6H), 3.90-3.43 (m, ~462H), 3.41-3.34 (m, 6H), 3.21-3.14 (m, 1H), 2.93 (dd, *J* = 12.7, 5.0 Hz, 1H), 2.72 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 2.26-2.19 (m, 2H), 1.78-1.63 (m, 1H).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

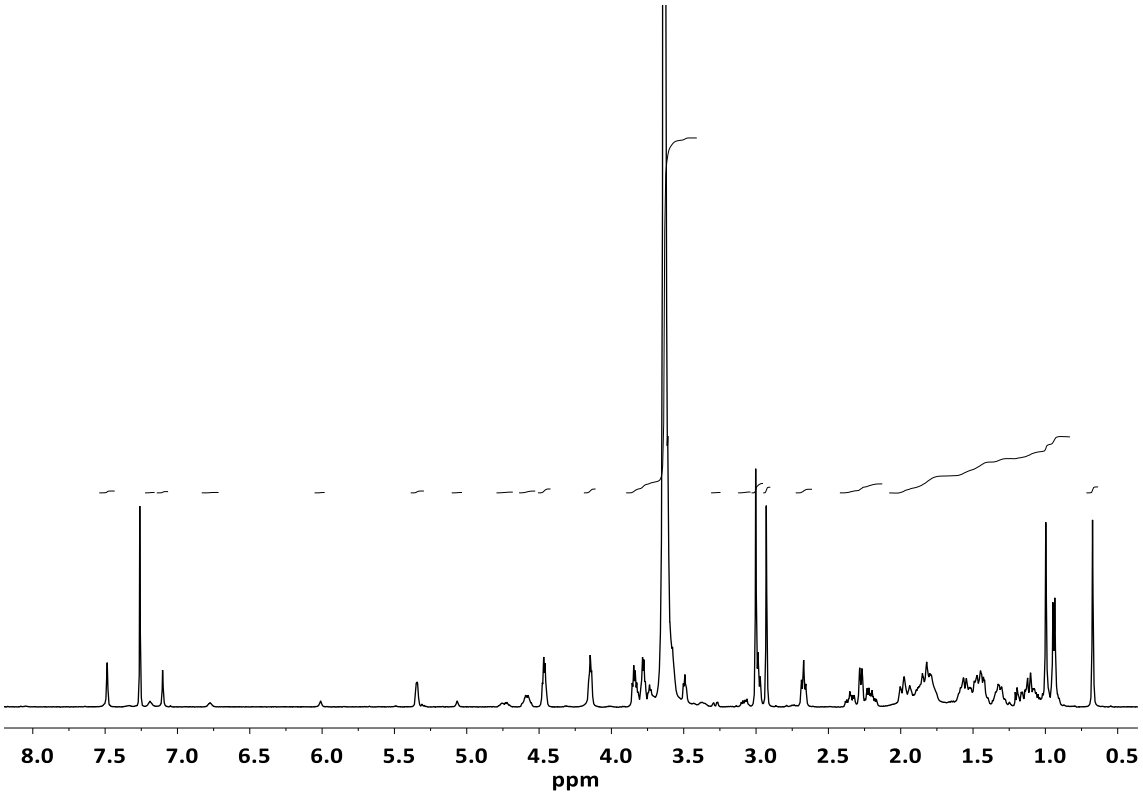


^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$, 500 MHz) of Biotin-PEG-[G1]-N_3.

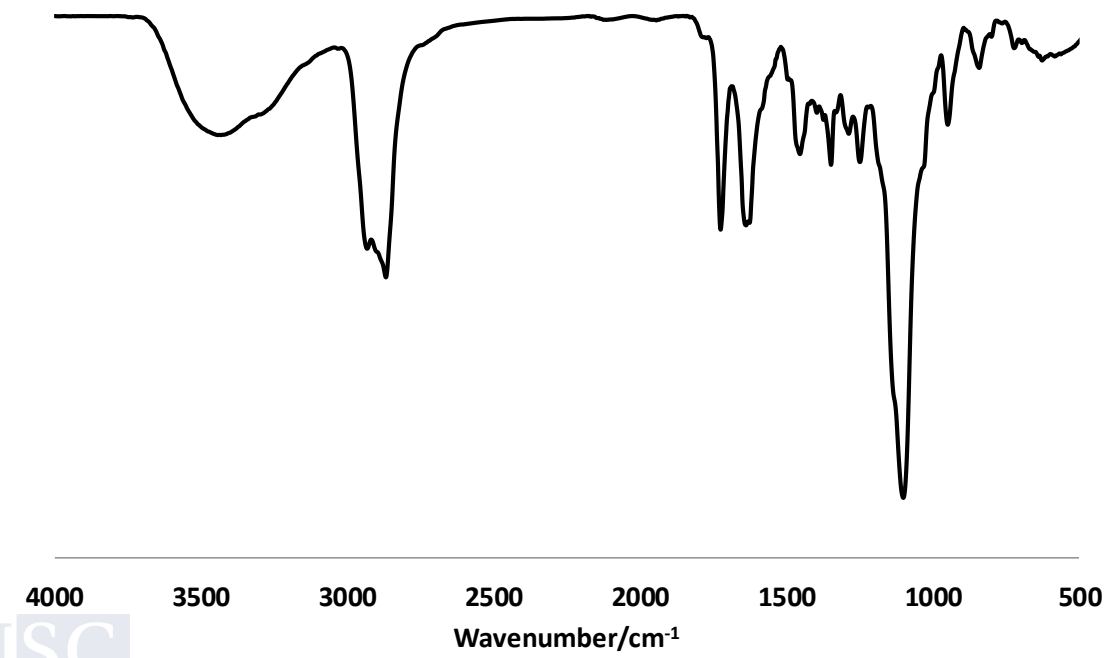
Biotin-PEG-[G1]-DHMCA

DMHCA-Alk (16.4 mg, 34.05 μmol) was added to a solution of Biotin-PEG-[G1]-N_3 (20.9 mg, 3.78 μmol) in a mixture of THF (90 μL) and H_2O (4.2 μL). Then, TBTA (0.6 mg, 1.13 μmol), $CuSO_4$ (2.8 μL, 0.57 μmol, 0.2 M, 5 mol% per azide), and sodium ascorbate (15.0 μL, 2.83 μmol, 0.2 M, 25 mol% per azide) were added. After 12 h of stirring at 60 ºC, a second portion of sodium ascorbate (15.0 μL, 2.83 μmol, 0.2 M, 25 mol% per azide) and *t*-BuOH (20 μL) were added. After additional 24 h of stirring at 60 ºC, the reaction mixture was purified by ultrafiltration (YM3) washing with acetone:H_2O (1:1, 10 mL), acetone:0.1 M EDTA pH 7 (1:1, 5 × 10 mL), and acetone:H_2O (1:1, 5 × 10 mL) to give Biotin-PEG-[G1]-DMHCA as a white solid after freeze-drying (17.8 mg, 70%). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.49 (s, 3H), 7.19 (br s, 1H), 7.10 (s, 2H), 6.78 (br s, 1H), 6.01 (br s, 1H), 5.34 (s, 3H), 5.06 (br s, 1H), 4.80-4.69 (m, 1H), 4.64-4.53 (m, 3H), 4.52-4.41 (m, 7H), 4.22-4.08 (m, 6H), 3.89-3.41 (m, ~462H), 3.28 (dd, *J* = 13.4, 3.2 Hz, 1H), 3.08 (dd, *J* = 6.1, 3.5 Hz, 2H), 3.03-2.95 (m, 16H), 2.93 (s, 9H), 2.67 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H), 2.41-2.13 (m, 14H), 2.08-0.84 (m, 90H), 0.67 (s, 9H). IR (ATR): 3437, 2867, 1727, 1642, 1639, 1103 cm^{-1}.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$, 500 MHz) of Biotin-PEG-[G1]-DMHCA.



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

IR spectrum of Biotin-PEG-[G1]-DMHCA.

Assignment of Signals in IR Spectra

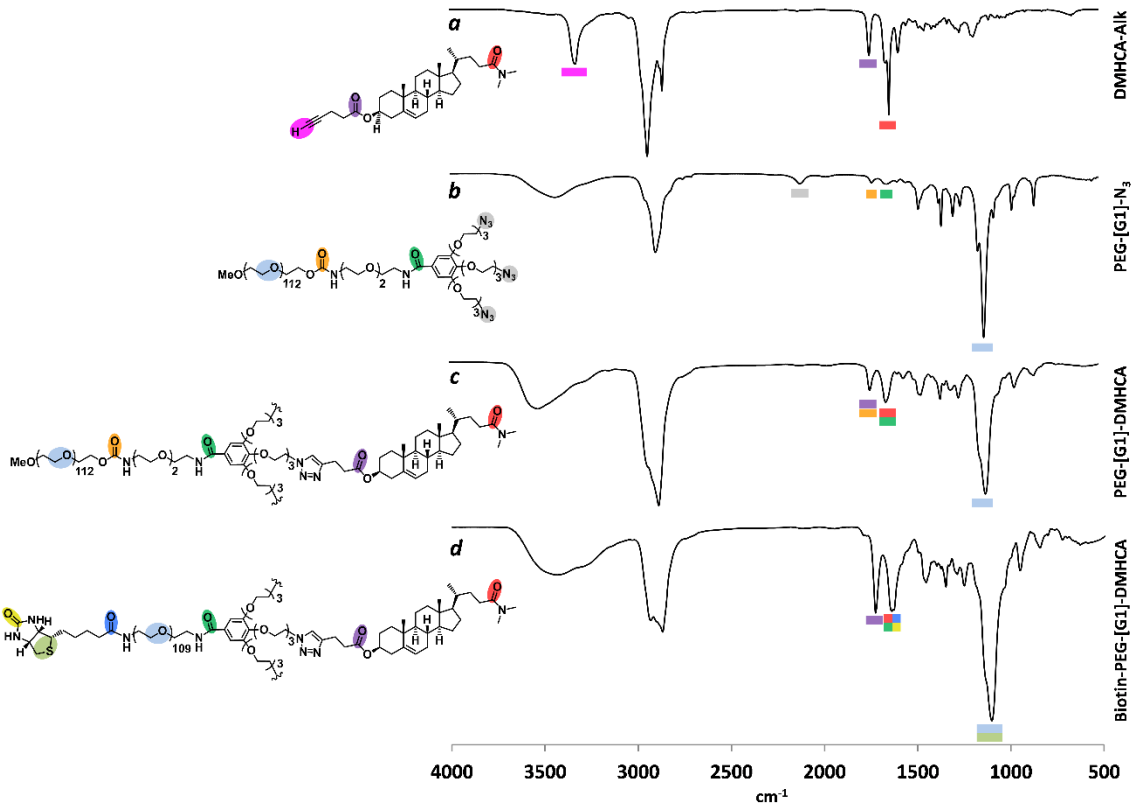


Figure S3.1. IR spectra of DMHCA-Alk (**a**), PEG-[G1]-N_3 (**b**), PEG-[G1]-DMHCA (**c**) and Biotin-PEG-[G1]-DMHCA (**d**).

DLS of PEG-[G1]-DMHCA and Biotin-PEG-[G1]-DMHCA Micelles

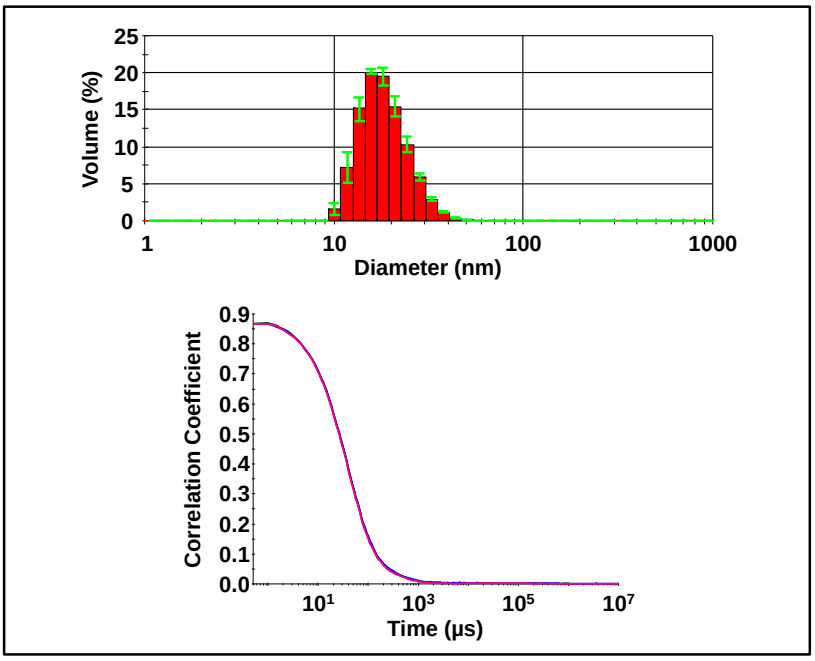


Figure S3.2. DLS histogram and correlation function of PEG-[G1]-DMHCA micelles upon formation (H_2O, 25 °C).

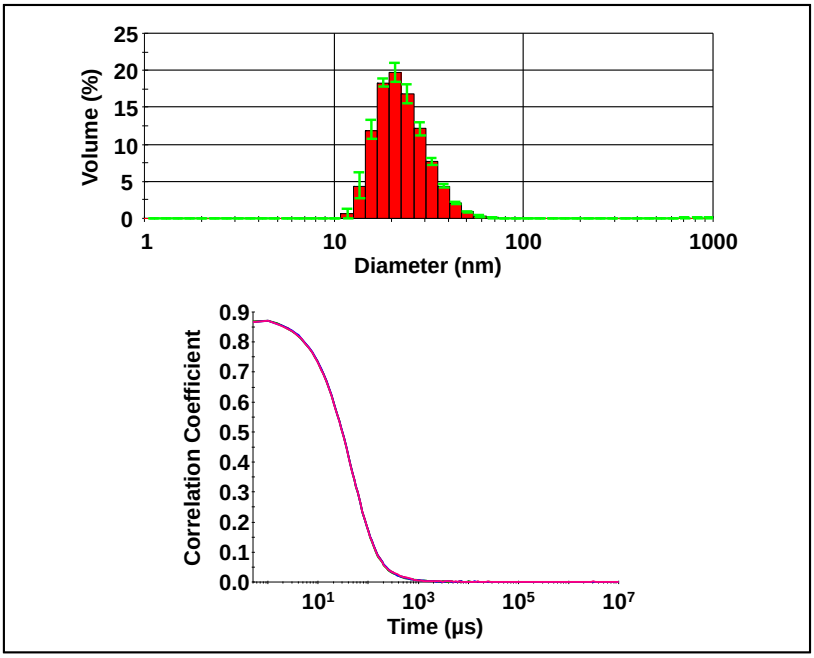


Figure S3.3. DLS histogram and correlation function of PEG-[G1]-DMHCA micelles after freeze-drying and resuspension (10 mM PB, pH 7.4, 150 mM NaCl; 25 °C).

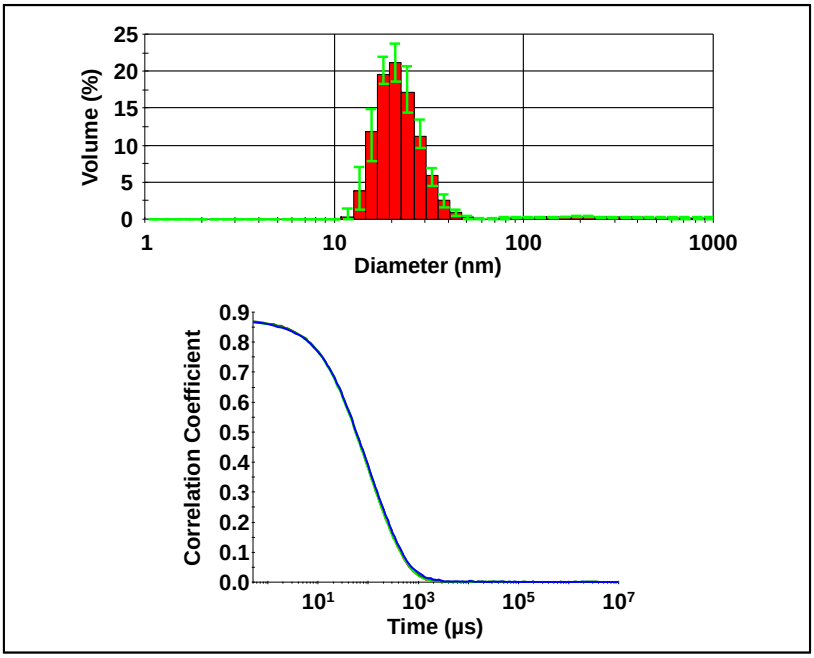


Figure S3.4. DLS histogram and correlation function of Biotin-PEG-[G1]-DMHCA micelles upon formation (H_2O, 25 °C).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{1}H NMR Spectrum of PEG-[G1]-DMHCA Micelles

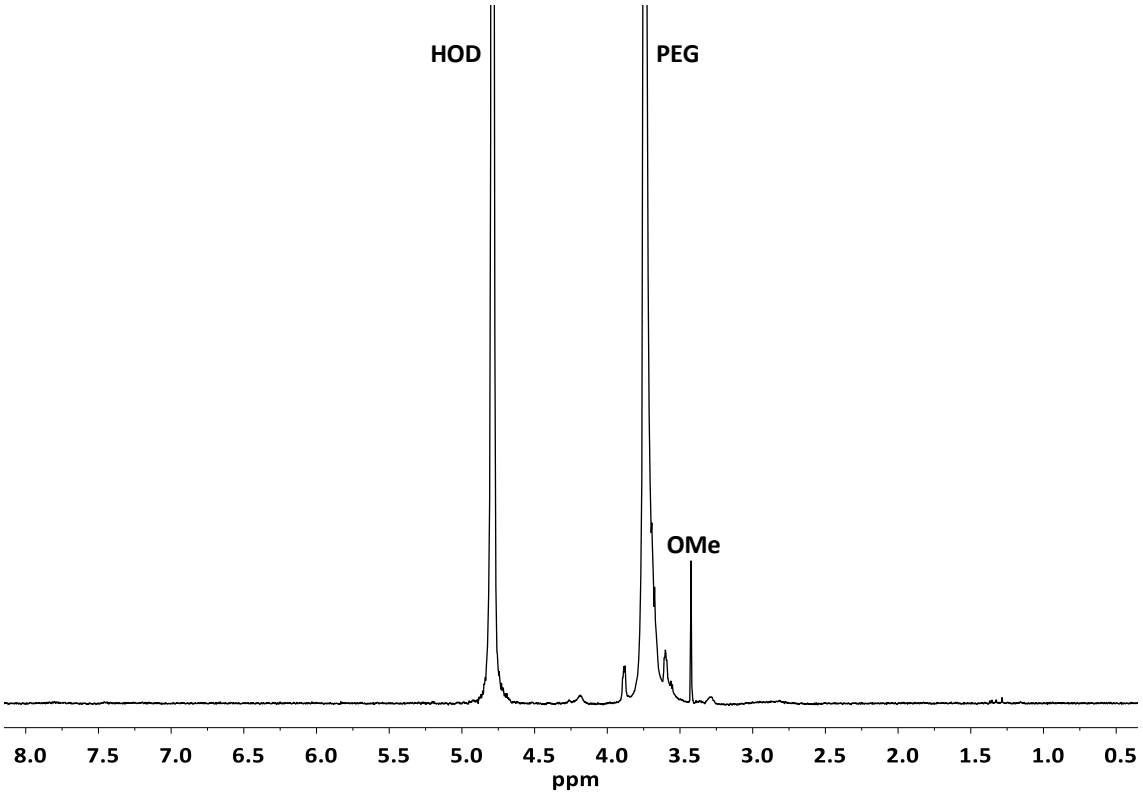


Figure S3.5. ^{1}H NMR spectrum (D_2O, 500 MHz, 1 mg/mL) of PEG-[G1]-DMHCA micelles after freeze-drying and resuspension in D_2O.

Integrity of the Ester Bond in PEG-[G1]-DMHCA Micelles by ^{1}H NMR

The NMR chemical shift of ^{1}H in alpha to oxygen atoms is very sensitive to the chemical environment. This has been exploited to study the integrity of the ester bond linking DMHCA to the dendritic block inside the micelles during their preparation, storage and lyophilization.

The ^{1}H in alpha to the hydroxyl group in DMHCA appears as a multiplet at 3.57-3.42 ppm in $CDCl_3$ (highlighted in green in Figure S3.6). However, after ester formation, this signal shifts to lower field: 4.71-4.56 ppm for DMHCA-Alk and 4.63-4.54 ppm for PEG-[G1]-DMHCA (highlighted in blue in Figure S3.6). The fact that micelles, that have been in aqueous solution for several days after preparation and then lyophilized (to remove H_2O), do not show any signal at 3.57-3.42 ppm when dissolved in $CDCl_3$, confirms the absence of free (hydrolyzed) DMHCA and so, the integrity of the ester bond during the preparation-lyophilization process.

Note that micelles disassemble to PEG-[G1]-DMHCA copolymers when dissolved in $CDCl_3$.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

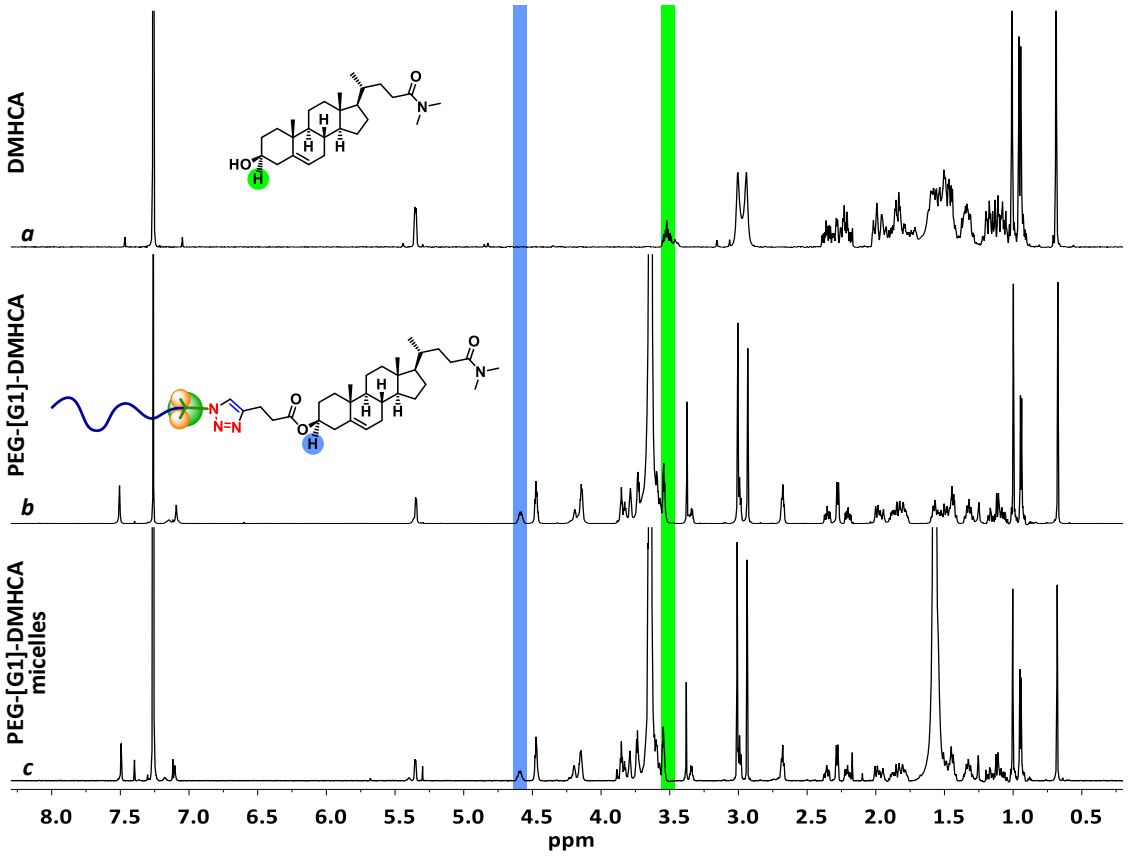


Figure S3.6. ^{1}H NMR spectra ($CDCl_3$) of DMHCA (500 MHz, **a**) and PEG-[G1]-DMHCA copolymer (750 MHz, **b**). ^{1}H NMR spectrum of PEG-[G1]-DMHCA micelles after freeze-drying and dissolving in $CDCl_3$ (750 MHz, **c**).

Western Blotting

Samples from the left hemisphere of wild type mice at 3 months of age were sonicated in 250 µL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.1% deoxycholic acid, 2 µg/mL of aprotinin, 2 µg/mL of leupeptin, 100 µg/mL PMSF, pH 7.4). Samples were centrifuged at 13000 rpm for 45 min at 4 °C and protein content of the supernatants was determined using the Dc-protein assay, (BioRad, USA). 50-150 µg of total protein were loaded on a 10-20% acrylamide gel and transferred to a PVDF membrane. The membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5% skim milk and then incubated overnight at 4 °C with the primary antibody (rabbit polyclonal anti-ApoE, working dilution 1:1000, Abcam; rabbit polyclonal anti-ABCA1, working dilution 1:500, Abcam; mouse monoclonal 6E10, working dilution 1:1000, Millipore). After washing in TBS-T buffer, the membranes were incubated with goat anti-rabbit or antimouse peroxidase-conjugated secondary antibody (working dilution 1:5000, BioRad, USA) for 1 h at room temperature. βIII-tubulin (working dilution: 1:12000, Abcam) or GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, working dilution: 1:5000, Abcam) were used as loading controls. Signal intensity was quantified by densitometry (Image Studio Lite). Groups were obtained simultaneously and normalized to βIII-tubulin (neuronal specific) immunoreactivity. All experiments were performed in triplicate.

Immunohistochemistry

Free floating immunohistochemical staining was performed as previously described.[48] Mouse monoclonal primary antibodies used were: McSA1 (from MediMabs, Montreal, Canada, working dilution: 1:1500), which recognizes the first 12 amino acid of the amyloid beta sequence. For mouse monoclonal primary antibodies, sections were incubated with a secondary goat-anti-mouse IgG (working dilution 1:1000; BioRad, USA). Staining were then developed with 0.06% DAB (Cell Marque, USA).

Digital images were acquired on Imaging microscope (Olympus), equipped with a Camera HRc (Olympus), using Image Pro Plus software for quantification (MediaCybernetics).

In vivo Cytotoxicity

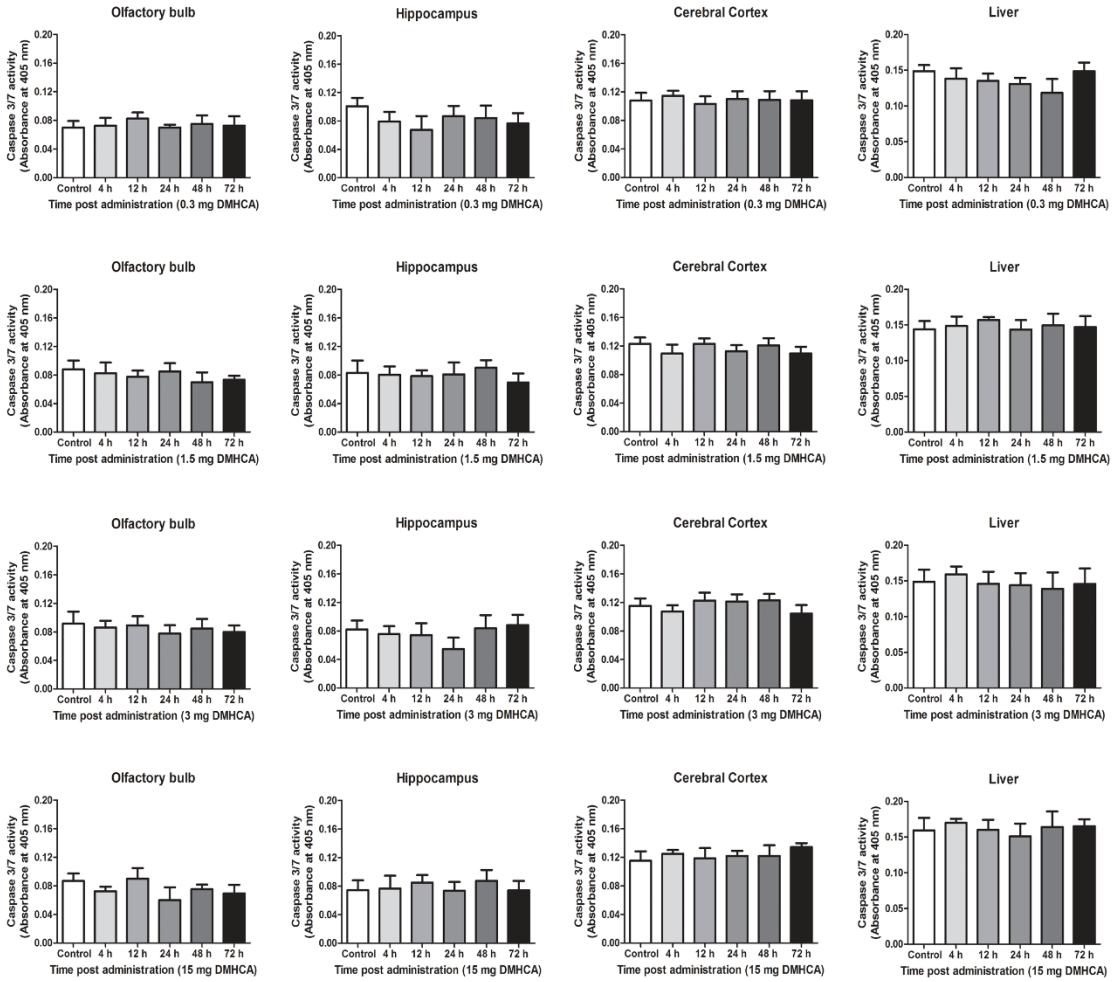


Figure S3.7. No *in vivo* cell toxicity was shown at different time-points (4, 12, 24, 48 and 72 h) by caspase 3/7 activity after intranasal dose administration in mice (0.3, 1.5, 3 and 15 mg DMHCA/kg body weight/day, equivalent to 1.5, 7.5, 15 and 75 mg of PEG-[G1]-DMHCA/kg body weight/day). Relative caspase 3/7 activity in homogenates of olfactory bulb, hippocampus, cerebral cortex and liver. Statics analysis were performed using Graph-Pad Prism 6. All probability values were two-tailed; a level of 5% was considered significant. Data are reported as the mean ± SEM.

USC DE COMPOSTELA

The potential *in vivo* cytotoxicity of the intranasal experimental doses of PEG-[G1]-DMHCA micelles was evaluated in mice at different time-points (Figure S3.7) and in 21 days treated transgenic mice (Figure S3.8) using a colorimetric caspase 3/7 cytotoxicity assay kit (Abcam, ab39401). This assay is based on the formation of the chromophore pnitroaniline (p-NA) by cleavage from the labeled substrate DEVD-pNA. The p-NA can be quantified using a spectrophotometer, reading the absorbance at 405 nm. Homogenates from different tissues were processed following the manufacturer recommendation. Briefly, homogenates (50 µg/well), reaction buffer and DEVD-p-NA substrate were added to the wells and incubated for 90 min at 37 ºC. Plates were analyzed in a microplate reader at 405 nm. Each sample was analyzed by triplicate.

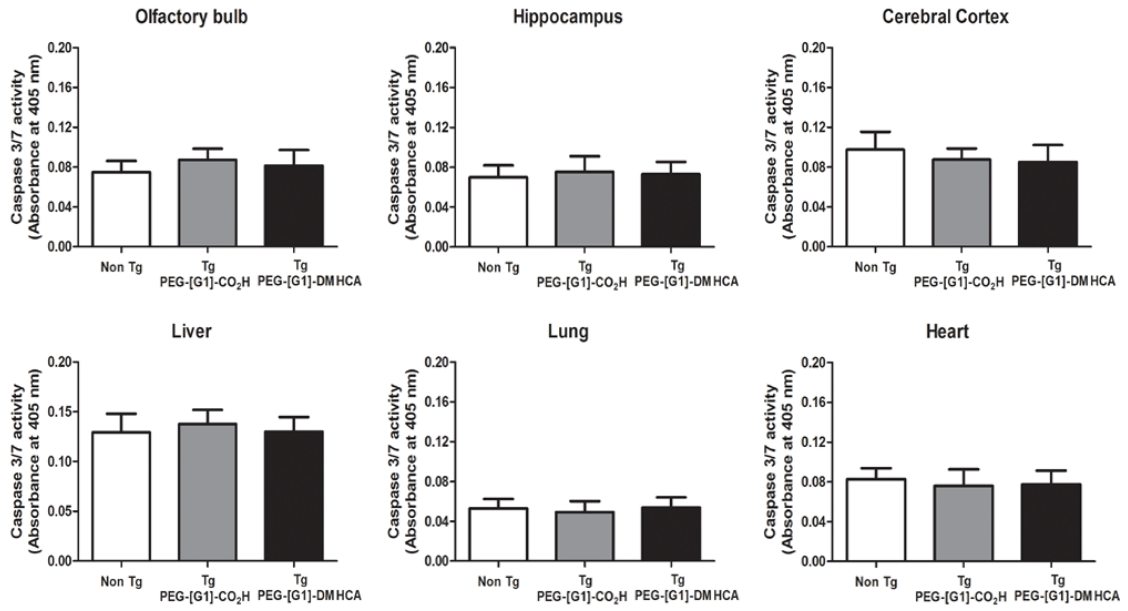


Figure S3.8. Absence of cytotoxicity induced by PEG-[G1]-DMHCA micelles after long-term (21 days) intranasal treatment. Homogenates (brain, liver, lungs and heart) from experimental non-transgenic (non Tg), and transgenic (Tg) mice treated with PEG-[G1]-CO_2H (control) and PEG-[G1]-DMHCA (experimental) were analyzed. Not significant statistical differences in caspase 3/7 activity were observed among tissues from the three experiment groups. Statics analysis were performed using Graph-Pad Prism 6. All probability values were two-tailed; a level of 5% was considered significant. Data are reported as the mean ± SEM.

Data Analysis

All data were analyzed using the Graph-Pad Prism 6 software. Comparison was done by unpaired Student's T-test. Significance was set at $p < 0.05$. Data are presented as mean ± S.E.M.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.6. References

[1] Schmechel, D. E.; Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Crain, B. J.; Hulette, C. M.; Joo, S. H.; Pericak-Vance, M. A.; Goldgaber, D.; Roses, A. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 9649–9653.
[2] Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science* **2002**, *297*, 353–356.
[3] Selkoe, D. J.; Hardy, J. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 595–608.
[4] Nelson, P. T.; Alafuzoff, I.; Bigio, E. H.; Bouras, C.; Braak, H.; Cairns, N. J.; Castellani, R. J.; Crain, B. J.; Davies, P.; Del Tredici, K.; Duyckaerts, C.; Frosch, M. P.; Haroutunian, V.; Hof, P. R.; Hulette, C. M.; Hyman, B. T.; Iwatsubo, T.; Jellinger, K. A.; Jicha, G. A.; Kovari, E.; *et al. J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2012**, *71*, 362–381.
[5] DeTure, M. A.; Dickson, D. W. *Mol. Neurodegener.* **2019**, *14*, 14–32.
[6] Haass, C.; Selkoe, D. J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 101–112.
[7] Ferreira, S. T.; Lourenco, M. V.; Oliveira, M. M.; De Felice, F. G. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*, 191–207.
[8] Guenette, S. Y. *Trends Mol. Med.* **2003**, *9*, 279–280.
[9] Miners, J. S.; Baig, S.; Palmer, J.; Palmer, L. E.; Kehoe, P. G.; Love, S. *Brain Pathol.* **2008**, *18*, 240–252.
[10] Raber, J.; Huang, Y.; Ashford, J. W. *Neurobiol. Aging* 2004, *25*, 641–650.
[11] Schmidt, V.; Carlo, A. S.; Willnow, T. E. *WIREs Syst. Biol. Med.* **2014**, *6*, 255–270.
[12] Yang, D. S.; Small, D. H.; Seydel, U.; Smith, J. D.; Hallmayer, J.; Gandy, S. E.; Martins, R. N. *Neuroscience* **1999**, *90*, 1217–1226.
[13] Koldamova, R. P.; Lefterov, I. M.; Staufenbiel, M.; Wolfe, D.; Huang, S.; Glorioso, J. C.; Walter, M.; Roth, M. G.; Lazo, J. S. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4079–4088.
[14] Wahrle, S. E.; Jiang, H.; Parsadanian, M.; Kim, J.; Li, A.; Knoten, A.; Jain, S.; Hirsch-Reinshagen, V.; Wellington, C. L.; Bales, K. R.; Paul, S. M.; Holtzman, D. M. J. *Clin. Invest.* **2008**, *118*, 671–682.
[15] Hirsch-Reinshagen, V.; Maia, L. F.; Burgess, B. L.; Blain, J. F.; Naus, K. E.; McIsaac, S. A.; Parkinson, P. F.; Chan, J. Y.; Tansley, G. H.; Hayden, M. R.; Poirier, J.; Van Nostrand, W.; Wellington, C. L. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 43243–43256.
[16] Wahrle, S. E.; Jiang, H.; Parsadanian, M.; Hartman, R. E.; Bales, K. R.; Paul, S. M.; Holtzman, D. M. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 43236–43242.
[17] Zelcer, N.; Tontonoz, P. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 607–614.
[18] Fowler, A. J.; Sheu, M. Y.; Schmuth, M.; Kao, J.; Fluhr, J. W.; Rhein, L.; Collins, J. L.; Willson, T. M.; Mangelsdorf, D. J.; Elias, P. M.; Feingold, K. R. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, *120*, 246–255.
[19] Donkin, J. J.; Stukas, S.; Hirsch-Reinshagen, V.; Namjoshi, D.; Wilkinson, A.; May, S.; Chan, J.; Fan, J.; Collins, J.; Wellington, C. L. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 34144–34154.
[20] Morales, J. R.; Ballesteros, I.; Deniz, J. M.; Hurtado, O.; Vivancos, J.; Nombela, F.; Lizasoain, I.; Castrillo, A.; Moro, M. A. *Circulation* **2008**, *118*, 1450–1459.
[21] Suon, S.; Zhao, J.; Villarreal, S. A.; Anumula, N.; Liu, M.; Carangia, L. M.; Renger, J. J.; Zerbinatti, C. V. *Mol. Neurodegener.* **2010**, *5*, 44–57.
[22] Kratzer, A.; Buchebner, M.; Pfeifer, T.; Becker, T. M.; Uray, G.; Miyazaki, M.; Miyazaki-Anzai, S.; Ebner, B.; Chandak, P. G.; Kadam, R. S.; Calayir, E.; Rathke, N.; Ahammer, H.; Radovic, B.; Trauner, M.; Hoefler, G.; Kompella, U. B.; Fauler, G.; Levi, M.; Levak-Frank, S.; *et al. J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 312–326.
[23] Quinet, E. M.; Savio, D. A.; Halpern, A. R.; Chen, L.; Miller, C. P.; Nambi, P. *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 1929–1942.

USC DE COMPOSTELA

[24] Pfeifer, T.; Buchebner, M.; Chandak, P. G.; Patankar, J.; Kratzer, A.; Obrowsky, S.; Rechberger, G. N.; Kadam, R. S.; Kompella, U. B.; Kostner, G. M.; Kratky, D.; Levak-Frank, S. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2011**, *12*, 285−292.
[25] Sousa-Herves, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *New J. Chem.* **2012**, 36, 205−210.
[26] Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288−6308.
[27] Amaral, S. P.; Tawara, M. H.; Fernandez-Villamarin, M.; Borrajo, E.; Martinez-Costas, J.; Vidal, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 5273−5277.
[28] Vukojicic, P.; Behar, G.; Tawara, M. H.; Fernandez-Villamarin, M.; Pecorari, F.; Fernandez-Megia, E.; Mouratou, B. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 21391−21398.
[29] Lopez-Blanco, R.; Fernandez-Villamarin, M.; Jatunov, S.; Novoa-Carballal, R.; Fernandez-Megia, E. *Polym. Chem.* **2019**, *10*, 4709−4717.
[30] Leiro, V.; Garcia, J. P.; Tomas, H.; Pego, A. P. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 1182−1197.
[31] Redasani, V. K.; Bari, S. B. *Prodrug Design: Perspectives, Approaches and Applications in Medicinal Chemistry*; Academic Press: Boston, 2015.
[32] Jornada, D. H.; dos Santos Fernandes, G. F.; Chiba, D. E.; de Melo, T. R.; dos Santos, J. L.; Chung, M. C. *Molecules* **2016**, *21*, 42−72.
[33] Sousa-Herves, A.; Novoa-Carballal, R.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *AAPS J.* **2014**, *16*, 948−961.
[34] Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596−2599.
[35] Fernandez-Villamarin, M.; Sousa-Herves, A.; Correa, J.; Munoz, E. M.; Taboada, P.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *ChemNanoMat* **2016**, *2*, 437−446.
[36] Fernandez-Villamarin, M.; Sousa-Herves, A.; Porto, S.; Guldris, N.; Martínez-Costas, J.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 2528−2537.
[37] Mignani, S.; Shi, X.; Karpus, A.; Majoral, J.-P. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112905−112915.
[38] Alexander, A.; Agrawal, M.; Chougule, M. B.; Saraf, S.; Saraf, S. Nose-to-Brain Drug Delivery: An Alternative Approach for Effective Brain Drug Targeting. *Nanopharmaceuticals*; Shegokar, R., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2020; pp 175−200.
[39] Wang, Z.; Xiong, G.; Tsang, W. C.; Schätzlein, A. G.; Uchegbu, I. F. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2019**, *370*, 593−601.
[40] El-Darzi, N.; Astafev, A.; Mast, N.; Saadane, A.; Lam, M.; Pikuleva, I. A. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 827−838.
[41] Ferretti, M. T.; Partridge, V.; Leon, W. C.; Canneva, F.; Allard, S.; Arvanitis, D. N.; Vercauteren, F.; Houle, D.; Ducatenzeiler, A.; Klein, W. L.; Glabe, C. G.; Szyf, M.; Cuello, A. C. *Curr. Alzheimer Res.* **2011**, *8*, 4−23.
[42] Hanson, L. R.; Fine, J. M.; Svitak, A. L.; Faltesek, K. A. *J. Vis. Exp.* **2013**, *74*, 4440−4446.
[43] Lueptow, L. M. *J. Vis. Exp.* **2017**, *126*, 55718−55726.
[44] Fernandez-Megia, E.; Correa, J.; Riguera, R. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3104-3111.
[45] Sousa-Herves, A.; Sanchez Espinel, C.; Fahmi, A.; Gonzalez-Fernandez, A.; Fernandez-Megia, E. *Nanoscale* **2015**, *7*, 3933-3940.
[46] Sousa-Herves, A.; Fernandez-Megia, E.; Riguera, R. *Chem. Commun.* **2008**, *27*, 3136-3138.

[47] Karaki, F.; Ohgane, K.; Dodo, K.; Hashimoto, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5297-5309.
[48] Hu, L.; Wong, T. P.; Cote, S. L.; Bell, K. F.; Cuello, A. C. *Neuroscience* **2003**, *121*, 421-432.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 2

Polysaccharides meet dendrimers to fine-tune the stability and release properties of polyion complex micelles

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El nacimiento de la ciencia fue la muerte de la superstición.

Thomas Henry Huxley

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Polysaccharides Meet Dendrimers to Fine-Tune the Stability and Release Properties of Polyion Complex Micelles

Adapted from:

Roi Lopez-Blanco, Marcos Fernandez-Villamarin, Sorel Jatunov, Ramon Novoa-Carballal and Eduardo Fernandez-Megia

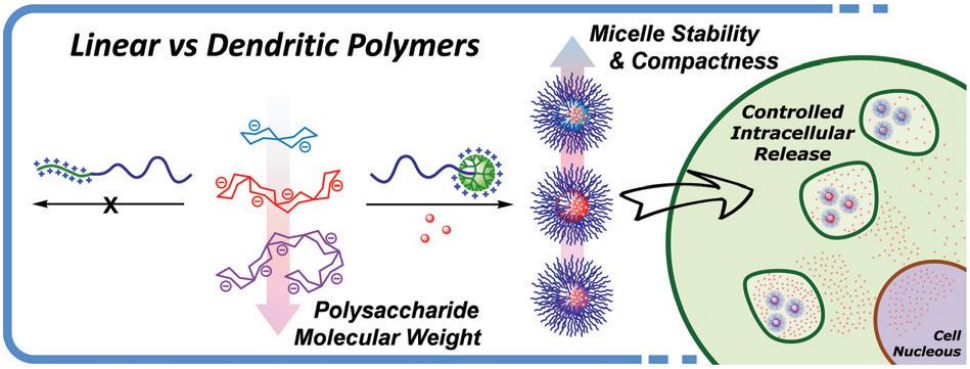
Polym. Chem. **2019**, *10*, 4709-4717.

Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS) and Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. CAPÍTULO 2. Polysaccharides meet dendrimers to fine-tune the stability and release properties of polyion complex micelles



Dendritic-polysaccharide polyion complex (PIC) micelles represent promising delivery systems where dendritic rigidity and polysaccharide stiffness synchronize to determine the stability and compactness of the micelles, their kinetics of intracellular drug release, and cytotoxicity. A screening using three charged polysaccharides (chitosan, alginate, and hyaluronic acid) with varying molecular weights (MWs) confirmed PEG-dendritic block copolymers as privileged structural components for the preparation of otherwise unfeasible PIC micelles from PEG-linear copolymers. The superior stability of dendritic PIC micelles is associated with the intrinsic rigidity and globular nature of dendrimers. Indeed, large differences in local dynamics between linear polymers and dendrimers have been described. Remarkably, lower polydispersity and longer-term micelle stability were revealed on reducing the polysaccharide MW, an effect not previously observed for PIC and associated with the high stiffness of charged polysaccharides. The polysaccharide MW-dependent properties of these micelles were analyzed in detail by encapsulating the fluorescent anticancer drug doxorubicin, which confirmed a higher compactness and slower intracellular drug release of micelles prepared from shorter polysaccharides. Overall, a control of the stability, release properties, and cytotoxicity of PIC micelles that is not attainable with linear polymers is feasible with dendrimers by selecting the MW of an oppositely charged polysaccharide.

4.1. Introduction

Since the emergence of drug delivery (DD) in the mid-1960s as an innovative technology for the controlled administration of drugs, several generations of DD systems (DDSs) have been described.[1] Among them, nanosized carriers are particularly effective at protecting the cargo, improving their pharmacokinetics and biodistribution.[2,3] Polyion complex (PIC) micelles – also referred to as block ionomer complex micelles (BICs) or complex coacervate core micelles (C3Ms) – fit into this category.[4-6] They are prepared from oppositely charged polymers at stoichiometric charge ratios. The presence of a neutral, hydrophilic block [usually poly(ethylene glycol) (PEG)] attached to one or both components allows confining the electrostatic interaction within the nanometric dimension of a micelle core, protected from the surrounding media by a hydrophilic corona of neutral blocks.[7,8] This characteristic architecture along with their charge neutrality ensures prolonged circulation times in the blood stream and passive accumulation into solid tumors by the enhanced

permeability and retention (EPR) effect.[9] The versatility of PIC has been demonstrated for the encapsulation and delivery of small drugs, proteins, antibodies, and nucleic acids.[7,10] Even so, the electrostatic interaction driving the formation of PIC micelles also compromises their stability towards ionic strength under physiological conditions. To overcome this limitation, we have recently proposed the use of charged dendrimers as a stabilizing strategy for PIC,[11-13] alternative to standard crosslinking or charge-reversal approaches.[14-17] Indeed, PIC micelles and vesicles prepared from dendrimers of the GATG (gallic acid–triethylene glycol)[18-22] family display unprecedented stability in serum and at ionic strengths higher than 3 M, the highest achieved for PIC.[11-13] This enhanced stabilization, associated with the intrinsic rigidity and globular nature of dendrimers, is already perceived at dendritic generations (G) as low as G2 with only 18 terminal charged groups. Large differences in local dynamics between linear polymers and dendrimers explain the superior stability of dendritic PIC micelles.[23]

Attracted by the increasing interest in polysaccharides as a renewable source of biomaterials for DD, tissue engineering and the food industry,[24-29] we have turned our attention to polysaccharide-based PIC micelles. Besides a great structural variety, polysaccharides benefit from a broad availability, biocompatibility, biodegradability, and very low toxicity. Chitosan (CS; cationic, mucoadhesive),[30-32] alginate (ALG; anionic, gelation properties),[33] and hyaluronic acid (HA; anionic, main component of the extracellular matrix and involved in cell signaling)[34] are recognized among the most promising naturally occurring polysaccharides (Figure 4.1). Owing to their high charge densities, CS, ALG and HA have found extensive application in the preparation of charged polyelectrolyte complexes, where colloidal stability is ensured at the expense of surface charge (using one component in excess).[35-37] In contrast, their application to neutral PIC micelles is surprisingly very scarce, with reports either describing unfeasible formation[38,39] or complete dissociation at physiological pH/ionic strength (pH 7.4, 150 mM).[39,40-44] As a result, innovative strategies towards stable polysaccharide-based PIC micelles are currently highly demanded.

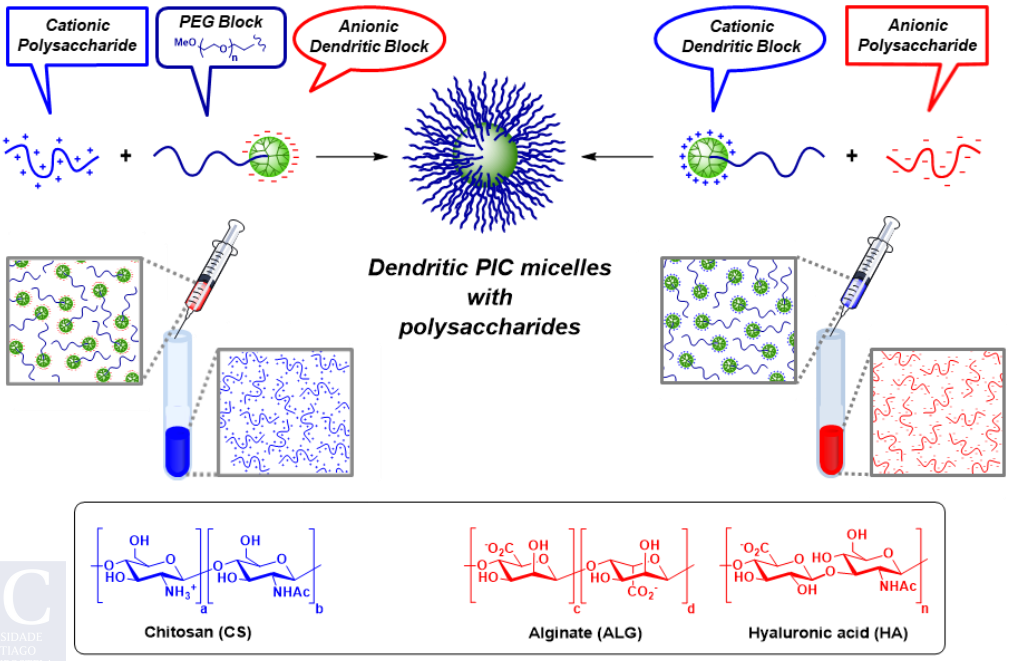


Figure 4.1. Preparation of dendritic-polysaccharide PIC micelles. Structures of chitosan (CS, in blue), alginate and hyaluronic acid (ALG and HA, in red).

Herein, we describe that PIC micelles incorporating CS, ALG, and HA can be readily obtained at physiological pH bringing into play PEG-dendritic (GATG) block copolymers (Figure 4.1).[45,46] The stability of the resulting dendritic-polysaccharide PIC micelles largely exceeds that of PIC from PEG-linear copolymers, displaying sizes and polydispersities (PDI) that remain unaltered even after days at 37 ºC in the presence of 150 mM NaCl. Curiously, prolonged micelle stability was revealed on reducing the polysaccharide molecular weight (MW), an effect not previously observed for PIC and associated with the high stiffness of charged polysaccharides. As shown below, the polysaccharide MW controls not only the stability and compactness of dendritic micelles, but also their kinetics of intracellular drug release and cytotoxicity in ways not attainable with PEG-linear copolymers.

4.2. Results and Discussion

The dendritic architecture and polysaccharide molecular weight determine the stability of PIC micelles

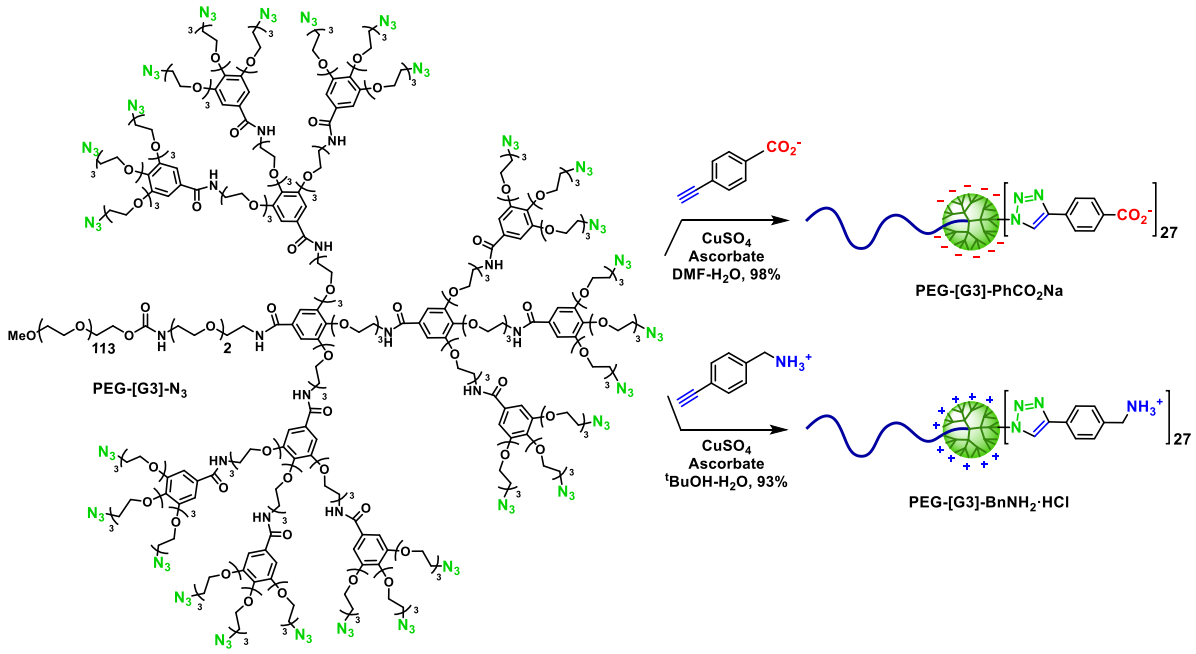
To assess the stabilization effect of dendrimers on the preparation of PIC micelles with charged polysaccharides, a screening with CS, ALG, and HA samples of varying MWs was planned (Table 4.1 and SI). As oppositely charged PEGdendritic block copolymers we selected PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ and PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl (Scheme 4.1 and Figure 4.2). Both copolymers incorporate a PEG chain of 5000 Da and a GATG dendritic block of G3 divergently grown.[46-48] Decoration of the 27 peripheral azides present in the precursor PEG-[G3]-N_3 with benzoate (carboxylate) and benzylamine (ammonium) groups, by means of a Cu(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC), afforded the desired charged block copolymers in excellent yields.[12]

Table 4.1. Structural parameters of the polysaccharide samples assessed in the formation of PIC micelles (DP is the degree of polymerization).

Polysaccharide[a]	MW (10^3 g/mol)	DP[b]
CS_{35}	6	35
CS_{172}	29	172
CS_{480}	70	480
ALG_{21}	4	21
ALG_{168}	32	168
ALG_{389}	74	389
ALG_{694}	132	694
ALG_{1040}	198	1040
ALG_{2140}	406	2140
HA_{71}	29	71
HA_{165}	66	165
HA_{497}	199	497

[a] CS degree of acetylation (DA) is 14.
[b] DP of HA refers to disaccharide unit.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Scheme 4.1. PEG-[G3]-PhCO$_2$Na and PEG-[G3]-BnNH$_2$·HCl used in the preparation of PIC micelles.

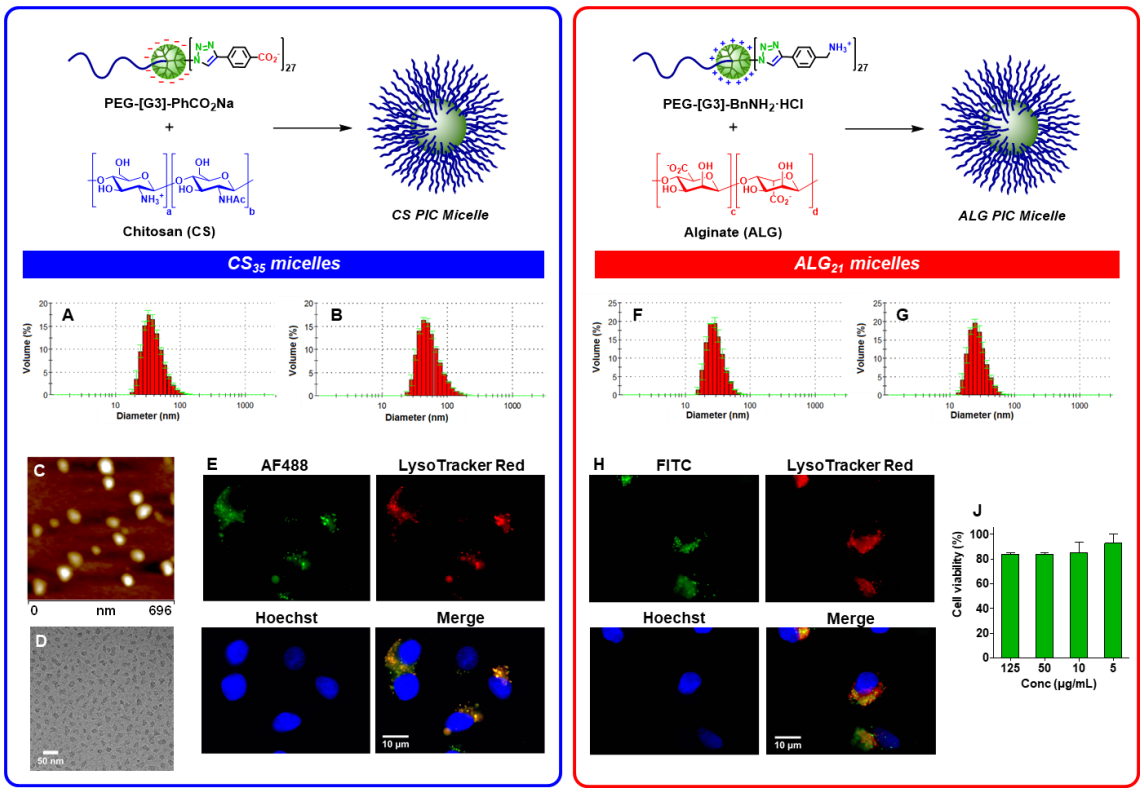


Figure 4.2. Top panel: Dendritic-polysaccharide PIC micelles. Bottom panels: Characterization of PEG-[G3]-PhCO$_2$Na/CS$_{35}$ micelles (left) and PEG-[G3]-BnNH$_2$/ALG$_{21}$ micelles (right). DLS histograms of micelles as prepared (10 mM PB pH 7.4, 25 °C) (**A**,**F**), and after the addition of 150 mM NaCl and heating for 24 h at 37 °C (**B**,**G**). AFM and TEM images of CS$_{35}$ micelles (**C**,**D**). Fluorescence images of A549 cells incubated for 4 h with AF488-labelled CS$_{35}$ micelles (**E**) and FITC-labelled ALG$_{21}$ micelles (**H**). Cell viability (MTT, 24 h) of A549 cells in the presence of ALG$_{21}$ micelles (**J**).

For the preparation of PIC micelles, solutions of the anionic (ALG, HA, or PEG-[G3]-$PhCO_2Na$) and cationic (CS or PEG-[G3]-$BnNH_2$) components were mixed at stoichiometric charge ratios in 10 mM PB pH 7.4 (Figures 4.1, 4.2 and SI). The resulting micelles were analyzed by dynamic light scattering (DLS histograms and correlation functions in Figure 4.2 and S4.1–S4.13). Hydrodynamic diameters and PDI in Table 4.2 confirm at a glance the stabilizing effect of PEG-dendritic block copolymers, as micelles in the 30–100 nm range were readily obtained at physiological pH. As a general trend, the largest DP polysaccharides (CS_{480}, ALG_{2140}, HA_{497}) did not afford discrete micelles, but massive aggregation along with uncomplexed polymers. Conversely, on reducing the DP, smaller micelles and lower PDI were typically observed. The integrity and relative stability of these micelles were analyzed in the presence of salt (150 mM NaCl) and then, under simulated physiological conditions, by heating at 37 °C for 24 h. All micelles responded with small changes in size and PDI, except those from CS_{172} and ALG_{1040} that were disrupted while heating (Table 4.2 and SI).

Table 4.2. Mean hydrodynamic diameter (nm) and polydispersity index (PDI) of PIC micelles: (**A**) upon formation in 10 mM PB pH 7.4 (25 °C), (**B**) 1 h after the addition of 150 mM NaCl (25 °C), and (**C**) after heating for 24 h at 37 °C in the presence of 150 mM NaCl (37 °C).

PIC Micelles	Diameter (PDI)		
	Upon formation (A)	**+150 mM NaCl (B)**	**+24 h, 37 °C (C)**
PEG-[G3]-$PhCO_2Na$/**CS_{35}**	40±1 (0.10±0.04)	44±1 (0.19±0.05)	56±1 (0.21±0.05)
PEG-[G3]-$PhCO_2Na$/**CS_{172}**	93±1 (0.06±0.01)	95±1 (0.05±0.01)	-
PEG-[G3]-$PhCO_2Na$/**CS_{480}**	-		
PEG-[G3]-$BnNH_2$/**ALG_{21}**	28±1 (0.06±0.01)	27±1 (0.07±0.02)	25±1 (0.12±0.03)
PEG-[G3]-$BnNH_2$/**ALG_{168}**	37±1 (0.10±0.01)	32±1 (0.12±0.02)	28±1 (0.16±0.02)
PEG-[G3]-$BnNH_2$/**ALG_{389}**	65±2 (0.18±0.01)	49±2 (0.15 ±0.01)	34±1 (0.16±0.01)
PEG-[G3]-$BnNH_2$/**ALG_{694}**	84±4 (0.23±0.01)	65±2 (0.18±0.01)	30±2 (0.25±0.01)
PEG-[G3]-$BnNH_2$/**ALG_{1040}**	106±3 (0.26±0.01)	90±6 (0.23±0.01)	-
PEG-[G3]-$BnNH_2$/**ALG_{2140}**	-		
PEG-PLL_{27}/**ALG_{21}**	34±1 (0.12±0.01)	34±1 (0.16±0.01)	40±1 (0.29±0.07)[a]
PEG-PLL_{27}/**ALG_{168}**	56±4 (0.26±0.03)	55±6 (0.29±0.04)	-
PEG-PLL_{27}/**ALG_{389}**	-		
PEG-PLL_{27}/**ALG_{694}**	-		
PEG-[G3]-$BnNH_2$/**HA_{71}**	27±1 (0.07±0.01)	26±1 (0.07±0.01)	29±1 (0.10±0.01)
PEG-[G3]-$BnNH_2$/**HA_{165}**	27±1 (0.08±0.01)	26±1 (0.09±0.01)	28±1 (0.12±0.02)
PEG-[G3]-$BnNH_2$/**HA_{497}**	-		

[a] Small aggregation observed by DLS (Figure S4.10).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

The higher micelle stability and lower PDI on reducing the polysaccharide DP, an effect not previously observed in PIC, is interpreted as resulting from the semirigid

character of charged polysaccharides[49-51] and their marked tendency to self-aggregate.[33,52,53] Although one could expect enhanced PIC stabilization for larger polysaccharides (stronger electrostatic contribution to the PIC core), their high stiffness ultimately results in a less efficient PIC condensation and eventually in larger PDI and lower stabilities. Confirmation of this was obtained when analyzing by DLS the long-term stability of the ALG series of micelles (ALG_{21}, ALG_{168}, ALG_{389}, ALG_{694}) at 37 ºC (10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl). A DP-dependent stability was revealed spanning from 1.5 days for ALG_{694}, to 4 days for ALG_{389}, and more than 2 weeks for the two shorter ALG. Interestingly, the smaller micelles obtained from the lower DP polysaccharides, an effect contrasting with the traditional negligible influence of DP on the size of PIC,[54] also confirm the tendency of high MW polysaccharides to afford less compacted, larger micelles.

Table 4.2 reveals that a control over the formation and stability of dendritic-polysaccharide PIC micelles is feasible by selecting the polysaccharide MW, with surprisingly low DP samples leading to the highest colloidal stability. Since small oligosaccharides are recognized with the highest biocompatibility and biodegradability,[31,33] this represents a competitive advantage of these micelles. Having confirmed the stabilizing effect of PEG-dendritic block copolymers over PIC micelles with polysaccharides, we were intrigued to test whether related micelles could be prepared from linear block copolymers. To this end, PIC formation was evaluated for the ALG series using $PEG\text{-}PLL_{27}$ (poly-L-lysine, DP 27) as a control cationic linear copolymer with an identical PEG block (5000 Da) and number of ammonium groups as PEG-[G3]-$BnNH_2$. Not surprisingly, only the ALG with the lowest DP afforded micelles that, nevertheless, aggregated at 37 ºC (Table 4.2 and Figures S4.10 and S4.11), confirming again the intrinsically rigid and globular dendritic architecture as a privileged structural element in the formation and stability of PIC micelles.

Characterization and cell internalization of dendritic-polysaccharide PIC micelles

To characterize in detail dendritic-polysaccharide PIC micelles, first we proceeded to determine the efficiency of the PIC assemble. For the ALG series, a 95 ± 1% efficiency was obtained (DP 21, 168, 389; SI) confirming the high fidelity of the dendritic PIC technology. Next, the stability of the micelles to freeze-drying was assessed. Gratifyingly, both CS_{35} and ALG_{21} micelles maintained their size and PDI after resuspension in the absence of any cryoprotectant (Figures S4.2 and S4.5), a property of relevance for applications in DD. Visualization of the micelles in the solid state by atomic force microscopy (AFM) and cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) revealed the presence of spherical structures with mean diameters in agreement with DLS measurements (Figure 4.2C,D).[55] Last but not least, their z-potential values close to zero (−0.78 mV for CS_{35} micelle, −1.38 mV for ALG_{21}, −1.92 mV for HA_{71}) are consistent with a high colloidal stability, core–corona structure (PEG palisade), and charge stoichiometry of the constituents (Figures S4.14–S4.16).

Micelles in the nanometric scale are recognized as advanced platforms for the development of DDSs.[56,57] To test the robustness of these PIC and their potential use in the area, their cytotoxicity and ability to internalize cells were studied in human adenocarcinoma alveolar basal epithelial (A549) cells in media supplemented with fetal bovine serum (FBS). As seen in Figure 4.2J, no significant effect on cell

proliferation (MTT) was shown for the micelles even at the highest concentrations analyzed, in agreement with their complete integrity in the extracellular media supplemented with FBS. Cellular uptake was studied by fluorescence microscopy using fluorescently labelled versions of the ALG_{21} and CS_{35} micelles [green dyes Alexa Fluor 488 (AF488) and fluorescein isothiocyanate (FITC), respectively (SI)]. Figure 4.2E,H show fluorescence images of the A549 cells treated for 4 h with micelles (green), which after cell uptake completely colocalize with LysoTracker Red (red), a well-known endosome/lysosome marker (SI). This final fate encouraged us to test the potential of these micelles for the intracellular release of low MW drugs.

The polysaccharide MW determines the compactness, intracellular drug release, and cytotoxicity of micelles

It was envisioned that micelles prepared from polysaccharides with decreasing DP, and so increasing stability profile, could emerge as interesting tools for fine-tuning the intracellular release of encapsulated drugs. To this end, we selected doxorubicin (DOX), a chemotherapeutic drug widely used for the treatment of various cancers, lymphomas and certain leukemias.[58] Due to its inherent high fluorescence, DOX was found to be excellent probe to assess the stability and compactness of the micelles as a function of polysaccharide DP. The three smaller ALG samples (DP 21, 168, 389) were considered for this study.

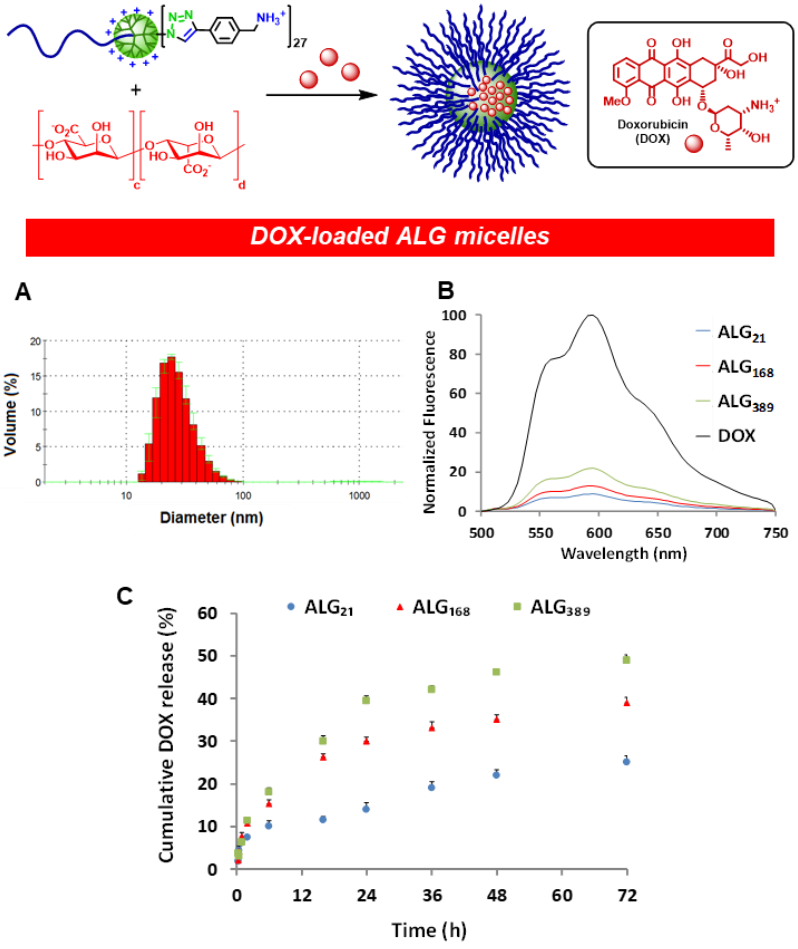


Figure 4.3. Top: Preparation of DOX-loaded ALG micelles. Bottom: DLS histogram of DOX-loaded ALG_{21} micelle (PBS, 37 °C) (**A**). Fluorescence quenching of DOX-loaded micelles compared to free DOX (**B**). DP-dependent release profile of DOX in acetate buffer, pH 5.0 (**C**).

The encapsulation of DOX was achieved by adding a solution of the drug to freshly prepared micelles, followed by dialysis against PBS (Figure 4.3). As seen in Figure 4.3A, DOX-loaded micelles were indistinguishable from blank micelles by DLS (size and PDI). Unoptimized encapsulation efficiencies (EE) of 56, 54 and 50% were obtained for ALG_{21}, ALG_{168}, and ALG_{389}, respectively [drug loadings (DL) of 17, 16, and 15% (SI)], which entitle a direct comparison of micelles in terms of intracellular drug release and cytotoxicity. A first insight into the different properties of the DOX-loaded micelles came from analysis of their fluorescence emission. As seen in Figure 4.3B, the fluorescence of DOX in the micelles displayed a significant quenching relative to a control solution of the free drug. This fluorescence attenuation, resulting from DOX molecules in close proximity at the micelle core,[59] was larger for the micelles incorporating shorter ALG chains (attenuation factor 11.1× for ALG_{21}, 7.7× for ALG_{168}, and 4.5× for ALG_{389}; see the SI), in agreement with their higher compactness. This information was reinforced when comparing the release rate of DOX from the three micelles at pH 5.0, conditions mimicking the acidic cellular compartments endosome (pH ~ 5–6) and lysosome (pH ~ 4–5). As shown in Figure 4.3C, almost 50% of the drug was released from the looser ALG_{389} micelle within the first 72 h, a figure that dropped to 39 and 25% for the more compact ALG_{168} and ALG_{21} micelles, respectively (SI). An analysis of the stability of the three DOX-loaded micelles in 90% FBS at 37 ºC, a relevant test for any DDS before going *in vivo*, afforded a similar outcome. Only 10 ± 1% of the encapsulated drug was released after 24 h of incubation from the ALG_{21} micelle, a value that increased to 15 ± 2% for ALG_{168} and 22 ± 3% for ALG_{389} (Table S4.1 and SI). Taken together, these results confirm the polysaccharide chain length as a major element for fine-tuning the compactness, stability, and release properties of dendritic PIC micelles. Additional experiments were performed to see whether these DP-dependent properties could be exploited at a cellular level to control the kinetics of intracellular drug release and cytotoxicity of the DOX-loaded micelles.

The toxicity of the DOX-loaded micelles and their ability to cross the cell membrane were investigated in the A549 cells in culture media supplemented with FBS. Flow cytometry data for cells treated for just 1 h with the ALG_{21}, ALG_{168}, and ALG_{389} micelles showed a shift to higher fluorescence intensities compared with the untreated cells (NT). The three micelles displayed very similar fluorescence intensities and percentages of positive cells (85–88% range, Figure 4.4A). Interestingly, the flow cytometry properties of the micelles were indistinguishable from those of free DOX (86% positive cells) despite their different internalization mechanisms. It is known that the small size and hydrophobicity of DOX facilitate its cell internalization by passive diffusion, followed by a fast accumulation into nuclei.[58]Actually, after just 1 h of incubation with the A549 cells, free DOX (red) was selectively detected in nuclei by fluorescence microscopy, as determined by complete colocalization with Hoechst (blue) (Figure 4.4B). In contrast, DOX in micelles was internalized by endocytosis as shown by colocalization with LysoTracker Green at the same time. Such a clean localization pattern confirms internalization of the intact PIC without disassembling in the extracellular media supplemented with FBS. Interestingly, at longer times, a DP-dependence in the kinetics of intracellular trafficking was observed for the micelles (Figure 4.4B). Thus, after 5 h of additional incubation, while DOX in the more stable and densely packed ALG_{21} and ALG_{168} micelles remained in endosome/lysosome (red and green colocalization), DOX in the ALG_{389} micelles was already observed in the cell nuclei (red and blue colocalization), a result confirming the higher sensitivity of this

micelle and the ability of the released DOX to migrate to the cell nuclei. Finally, the advantage of this control over intracellular release was taken for fine-tuning the *in vitro* cytotoxicity of the DOX-loaded micelles as a function of polysaccharide MW. Indeed, MTT experiments in the A549 cells revealed slightly higher toxicities for the micelles with larger ALG in agreement with their faster intracellular release of DOX (IC_{50} at 48 h: 3.55 μM for ALG_{21}, 1.75 μM for ALG_{168}, 1.17 μM for ALG_{389}; Figure 4.4C). Beyond these IC_{50} values, encapsulated DOX is expected to translate into improved pharmacokinetics and more efficient delivery to tumor sites. Several reports have described DDSs of DOX that, being less effective *in vitro* than the free drug, afforded substantially superior antitumor efficacy in animal models.[60,61] In this regard, *in vivo* experiments will be the focus of future work to fully assess the therapeutic activity of our findings.

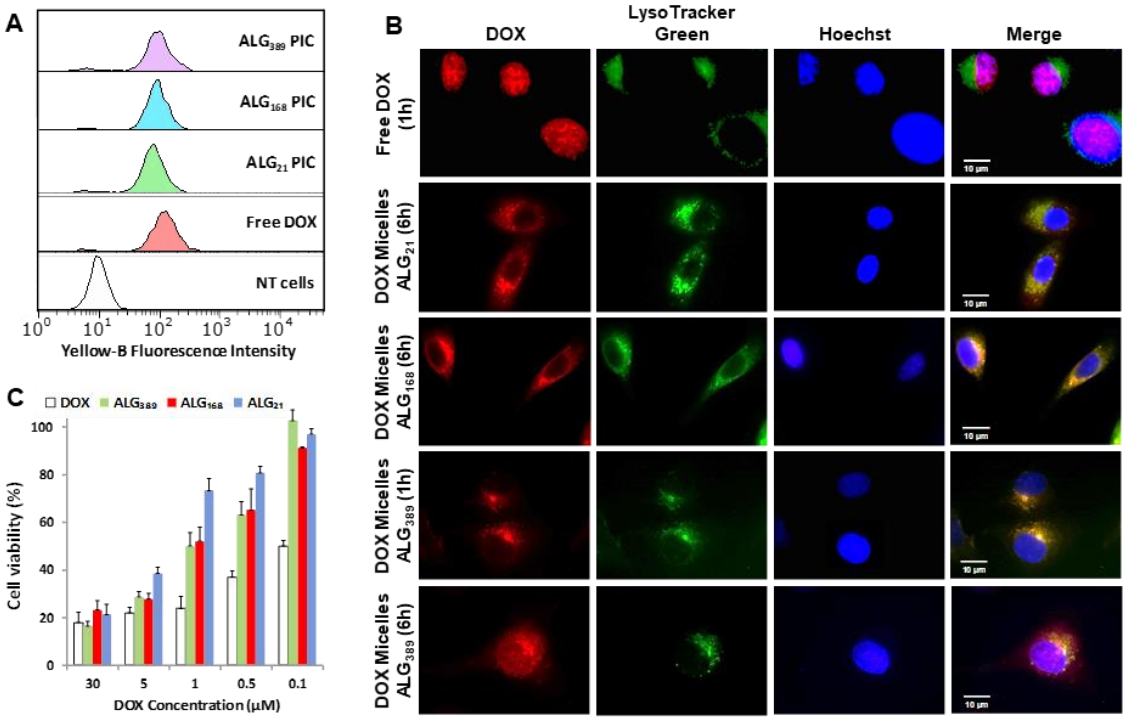


Figure 4.4. Toxicity and intracellular trafficking in A549 cells of DOX-loaded micelles from ALG_{21}, ALG_{168}, and ALG_{389}. Flow cytometry for cells treated for 1 h with DOX-loaded micelles and free DOX (NT: non-treated cells) (**A**). Fluorescence images of cells incubated with free DOX (1 h) and DOXloaded micelles (1 and 6 h) (**B**). Cell viability (MTT, 48 h) in the presence of DOX-loaded micelles and free DOX (**C**).

4.3. Conclusions

PEG-dendritic block copolymers entitle the preparation and long-term stabilization of otherwise unfeasible PIC micelles with charged polysaccharides (chitosan, alginate, hyaluronic acid). The intrinsic rigidity and globular nature of the dendritic block result in stabilities that largely exceed those of PIC from linear copolymers. Remarkably, lower PDI and prolonged micelle stabilities were revealed on reducing the polysaccharide MW, with DP as low as 21 leading to micelles with the highest stability, an effect not previously observed for PIC and associated with the high stiffness of charged polysaccharides. The MW-dependent properties of these micelles were further analyzed via encapsulation of the anticancer drug doxorubicin (DOX), which

being fluorescent was found to be an excellent probe to assess the higher compactness and slower intracellular drug release of the micelles incorporating shorter polysaccharide chains. Overall, dendritic-polysaccharide PIC micelles represent promising delivery systems where dendritic rigidity and polysaccharide stiffness synchronize to determine stability, release properties, and cytotoxicity.

4.4. Supporting information

Materials

PEG-[G3]-$PhCO_2Na$, AF488-PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ and PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl were prepared following procedures previously described by our group.[12] CS samples were denoted as CSx, where "x" represents the degree of polymerization (DP). A commercial CS sample (CS_{480}) was obtained from FMC BioPolymer as hydrochloride salt (Protasan Cl 113, batch number FP-110-02). The degree of acetylation (DA) of CS_{480} and two depolymerized samples (*vide infra*) was determined as 14% by ^{1}H NMR (10 mg/mL) in 2% DCl at 298 K (500 MHz) as previously described by our group.[62] ALG samples were denoted as ALGy, where "y" represents the DP. Samples ALG_{21}, ALG_{168}, ALG_{389}, ALG_{694}, ALG_{1040}, and ALG_{2140} were obtained from DANISCO; their average molecular weight (MW) and DP were provided by the supplier. HA samples were denoted as HAz, where "z" represents the DP. Samples HA_{71}, HA_{165} and HA_{497} were obtained from Lifecore (sodium hyaluronate); their average MW were provided by the supplier. Methoxy-poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine hydrochloride) copolymer (PEG-PLL_{27}) [PEG_{5000}, MW 9300 and DP 27 by ^{1}H NMR] was purchased from Alamanda polymers.

General Methods

Depolymerization of CS

CS samples with DP lower than commercial CS_{480} were obtained by nitrous acid depolymerization.[63,64] Briefly, CS_{480}·HCl (500 mg) was dissolved in H_2O (50 mL) under magnetic stirring at rt. Then, 1 M $NaNO_2$ (0.25 mL) was added dropwise and stirring was continued for 3 h, before 0.12 M NaOH was added dropwise until pH 10. The resulting suspension was centrifuged, washing several times with H_2O, to afford CS_{172} (354 mg) as a white foam after lyophilization. Following the same procedure from CS_{480}·HCl (150 mg) dissolved in H_2O (15 mL) and 1 M $NaNO_2$ (0.15 mL), CS_{35}·HCl (98 mg) was obtained as a white foam after stirring overnight, followed by ultrafiltration (Amicon YM1, 1 × H_2O, 2 × 0.1 M HCl, 3 × H_2O) and lyophilization.

Determination of the Molecular Weight of CS

The weight average molecular weight (MW) of CS was determined by SEC-MALLS. An Iso Pump G1310A (Hewlett Packard) was connected to two PSS Novema GPC columns (10 µm, 30 Å, 8 × 300 mm, and 10 µm, 3000 Å, 8 × 300 mm). A PSS SLD7000 MALLS detector (Brookhaven Instruments Corporation) operating at 660 nm and a G1362A refractive index detector (Agilent) were connected on line. A 0.15 M NH_4OAc/0.2 M AcOH buffer (pH 4.5) was used as eluent. Polymer solutions were filtered through 0.2 µm pore size membranes before injection. Polymer concentrations were in the range 0.1 to 5 g/L, depending on DP. Refractive index increment dn/dC values were taken from the literature.[65,66,67]

Atomic Force Microscopy (AFM)

PIC micelles prepared in 10 mM PB pH 7.4 were crosslinked by addition EDC (5 equiv per amino group, 100 mg/mL in H_2O). After stirring at rt overnight, reaction mixtures were dialyzed (MWCO 1 kDa) against H_2O (6 × 500 mL) to afford cross-linked PIC.

Samples for AFM imaging were prepared by depositing aqueous solutions of cross-linked PIC micelles (0.025-0.05 mg/mL) onto mica. AFM measurements were performed at an atomic force microscope Multimode Nanoscope V (Veeco) in tapping mode and processed using Vision 32, Nanoscope v7.20 and Nanoscope Analysis software. An average diameter of 53±7 nm for the CS_{35} micelles was determined by measuring the size of 25 micelles.

Cryo-Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM)

PIC micelles prepared in 10 mM PB pH 7.4 were crosslinked by addition EDC (5 equiv per amino group, 100 mg/mL in H_2O). After stirring at rt overnight, reaction mixtures were dialyzed (MWCO 1 kDa) against H_2O (6 × 500 mL) to afford cross-linked PIC.

For 2D cryo-imaging, 4 µL of PIC samples (0.5 mg/mL) were applied directly onto a glow-discharged 200-mesh Quantifoil® R 2/2 holey-carbon grid and rapidly plunged into liquid ethane with the help of a Vitrobot Mark III (FEI Inc., Eindhoven, The Netherlands). Sample analysis at liquid nitrogen temperature was carried out with a JEM-2200 FS/CR (JEOL Ltd.) transmission electron microscope, using an acceleration voltage of 200 KV and defocus ranging from -1.5 to -5.0 µm. Images were taken under low-dose conditions on a 4K×4K UltraScan 4000 CCD camera (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA). An in-column Omega energy filter was used in the microscope, with the energy slit width set at 30 eV, to improve the signal to noise ratio of the images. Size of PIC micelles was determined with ImageJ software (version 1.51j8) measuring the line intensity profile across the assemble. An average diameter of 24±4 nm for the CS_{35} micelles was determined by measuring the size of 25 micelles.

Determination of pH Values

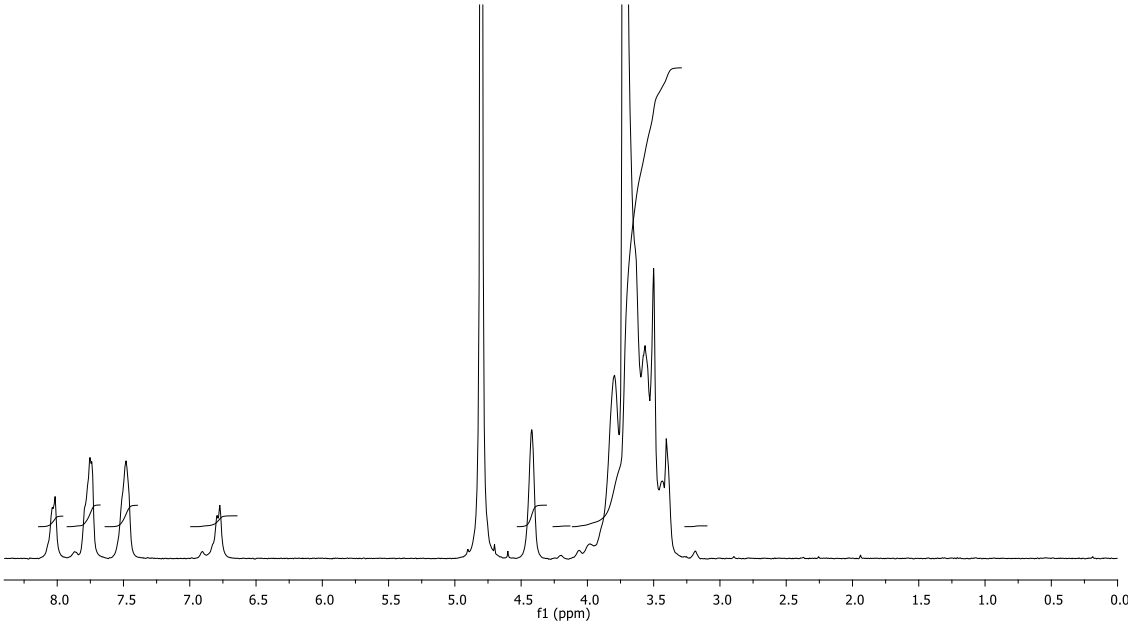
pH values were measured with a portable pH-meter (Crison PH25) connected to a glass electrode (Crison 52 09).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

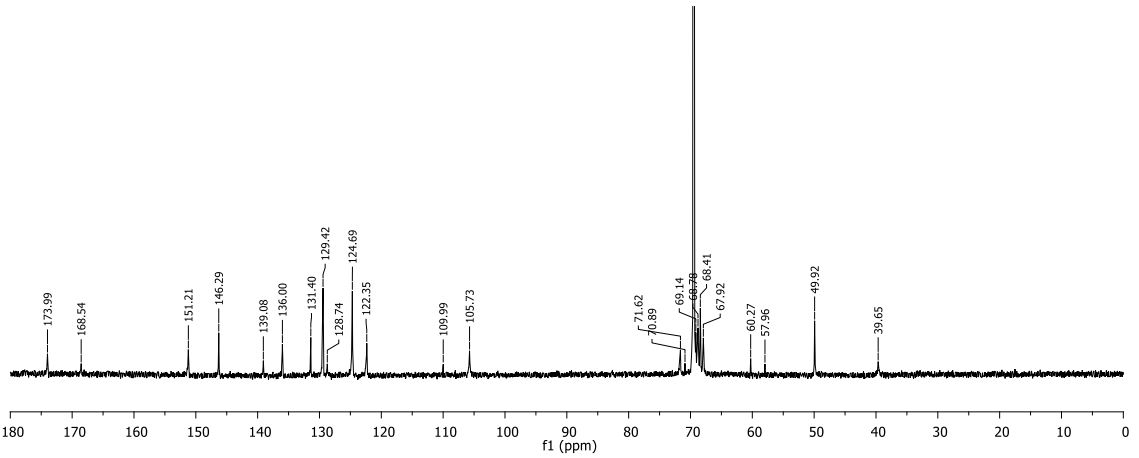
PEG-dendritic Block Copolymers

PEG-[G3]-PhCO$_2$Na

^{1}H NMR (500 MHz, D_2O) δ: 8.14-7.95 (m, 27H), 7.93-7.67 (m, 54H), 7.51 (br s, 54H), 7.01-6.65 (m, 26H), 4.44 (br s, 54H), 4.25-3.28 (m, ~879H), 3.18 (br s, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ: 174.1, 168.5, 151.2, 146.3, 139.1, 136.0, 131.4, 129.4, 128.7, 124.7, 122.3, 109.9, 105.7, 71.6, 70.9, 69.5, 69.1, 68.8, 68.4, 67.9, 60.3, 57.9, 49.9, 39.6. IR (KBr, cm^{-1}): 3422, 2872, 1589, 1541, 1421, 1115. MALDI-TOF MS (DHB, linear mode, *m/z*): M_p 16746, M_n 17157, M_w 17331. Calcd: M_p 16918 ([M+H$^+$]), M_n 16967.



^{1}H NMR spectrum (500 MHz, D_2O) of PEG-[G3]-PhCO$_2$Na.

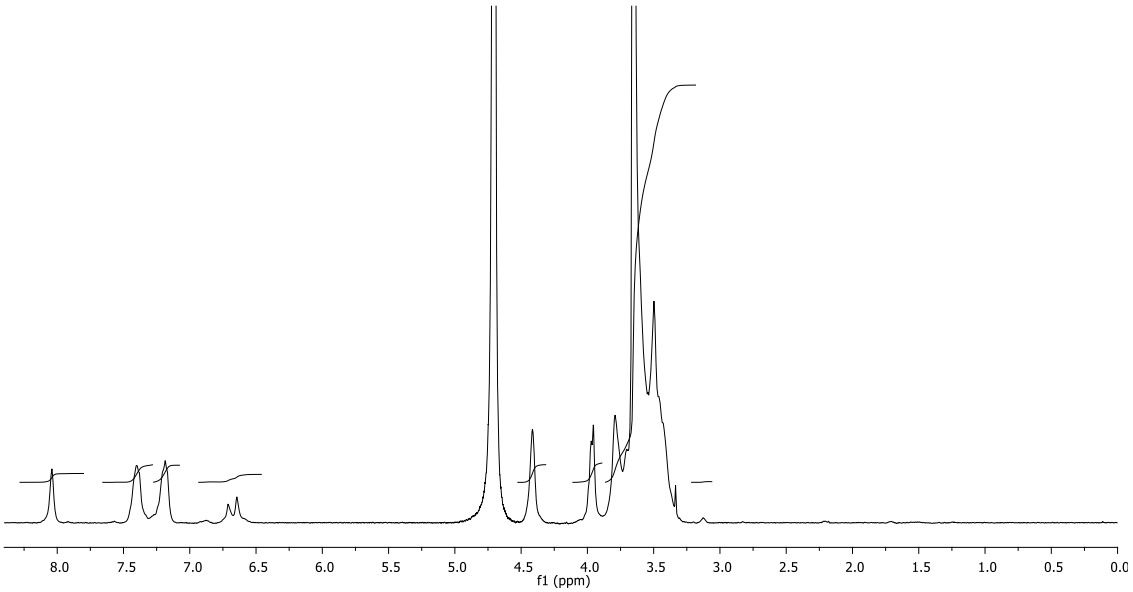


^{13}C NMR spectrum (100 MHz, D_2O) of PEG-[G3]-PhCO$_2$Na.

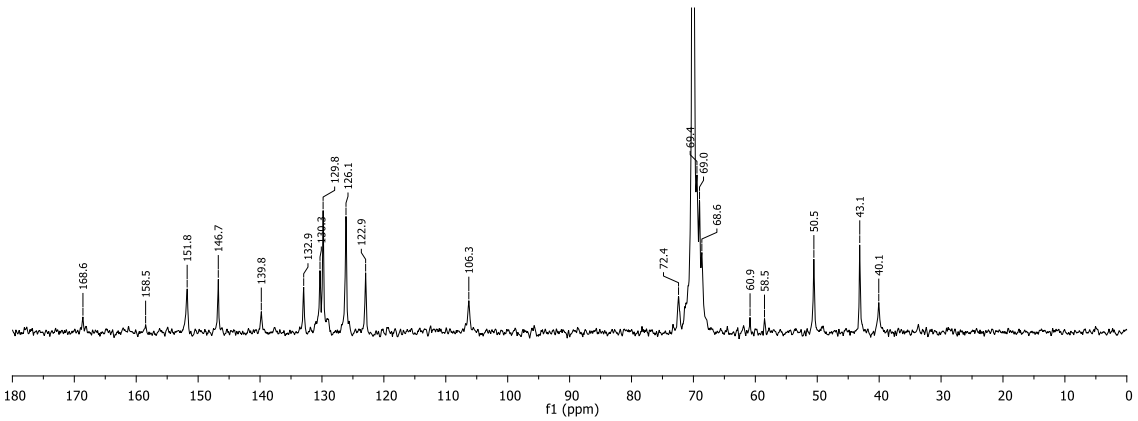
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

PEG-[G3]-BnNH$_2$·HCl

^{1}H NMR (500 MHz, D_2O) δ: 8.04 (br s, 27H), 7.40 (br s, 54H), 7.19 (br s, 54H), 6.94-6.46 (m, 26H), 4.41 (br s, 54H), 4.08-3.89 (m, 54H), 3.88-3.18 (m, ~879H), 3.12 (br s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, D_2O) δ: 168.6, 158.5, 151.8, 146.7, 139.8, 132.9, 130.3, 129.8, 126.1, 122.9, 106.3, 72.4, 70.1, 69.4, 69.0, 68.6, 60.9, 58.5, 50.5, 43.1, 40.1. IR (KBr, cm^{-1}): 3417, 2878, 1111. MALDI-TOF MS (DHB, linear mode, *m/z*): M_p 16049, M_n 15832, M_w 15892. Calcd: M_p 16513 ([M+H$^+$]), M_n 16564.



^{1}H NMR spectrum (500 MHz, D_2O) of PEG-[G3]-BnNH$_2$·HCl.



^{13}C NMR spectrum (126 MHz, D_2O) of PEG-[G3]-BnNH$_2$·HCl.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Preparation of PIC Micelles

Solutions of polysaccharides and block copolymers were aged at rt overnight before preparation of PIC.

CS-based Micelles

PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (2.81 mg/mL) was dissolved in 10 mM Na_2HPO_4/0.1 M NaOH (10% v/v) to give a solution of pH≈12. CS (0.5 mg/mL) was dissolved in 10 mM NaH_2PO_4 and the pH of the solution was adjusted to 3.1-3.3 by addition of 0.12 M HCl (approximately 50 µL HCl to 4 mL of CS solution). Both solutions of polymers were filtered through 0.45 µm nylon filters immediately before PIC formation. Micelles were prepared by mixing the above solutions in a 1:2 volume ratio (stoichiometric carboxylate to amine ratio, micelle concentration 1.28 mg/mL). The final pH of the PIC micelle solution was 7.2-7.4. Solutions were aged overnight at rt, under vigorous stirring before analysis.

ALG-based Micelles

PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl (1.47 mg/mL) was dissolved in 10 mM NaH_2PO_4. ALG (0.9 mg/mL) was dissolved in 10 mM Na_2HPO_4/0.1 M NaOH (12% v/v). Both solutions were filtered through 0.45 µm nylon filters immediately before PIC formation. Micelles were prepared by mixing these solutions in a 2:1 ratio (stoichiometric amine to carboxylate ratio, micelle concentration: 1.10 mg/mL). The final pH of the PIC micelle solution was 7.2-7.4. Solutions were aged for 3 h at rt, under vigorous stirring before analysis. Same experimental conditions were applied for the preparation of control linear PIC micelles from a solution of PEG-PLL_{27} in 10 mM NaH_2PO_4 (0.82 mg/mL).

HA-based Micelles

PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl (1.12 mg/mL) was dissolved in 10 mM NaH_2PO_4. HA (1.40 mg/mL) was dissolved in 10 mM Na_2HPO_4/0.1 M NaOH (12% v/v). Both solutions were filtered through 0.45 µm nylon filters immediately before PIC formation. Micelles were prepared by mixing these solutions in a 2:1 ratio (stoichiometric amine to carboxylate ratio, micelle concentration: 1.16 mg/mL). The final pH of the PIC micelle solution was 7.2-7.4. Solutions were aged for 3 h at rt, under vigorous stirring before analysis.

Fluorescently Labeled (Alexa Fluor 488) CS-based PIC Micelles

Alexa Fluor 488-labeled CS-PIC micelles were prepared from CS_{35} and a mixture of PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ and AF488-PEG-[G3]-$PhCO_2Na$[12] (9:1 molar ratio) following the above procedure for CS-PIC micelles.

Fluorescently Labeled (FITC) ALG-based PIC Micelles

PIC micelles from PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl and ALG_{21} were prepared as described above. Then, a solution of FITC (16 µL, 5 mol% per amine group, 1 mg/mL in PBS pH 7.4) was added to 1 mL of micelles. The resulting mixture was stirred at rt overnight. Unbounded FITC was removed by extensive dialysis (Spectra/Por® 6, MWCO 1 kDa) against PBS pH 7.4 to give FITC-labeled ALG-PIC micelles.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Formation Efficiency of PIC Micelles

The formation efficiency of PIC micelles was assessed by quantifying the amount of free PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl in solutions of micelles prepared as described above with ALG_{21}, ALG_{168}, and ALG_{389}. To this end, any free PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl in the solution of micelles (300 µL in 10 mM PB 7.4, 150 mM NaCl) was separated by ultracentrifugation (308000 RCF, 15 ºC, 1 h). A solution of PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl (300 µL in 10 mM PB 7.4, 150 mM NaCl, 0.98 mg/mL) was submitted to identical ultracentrifugation conditions as control to rule out precipitation of the block copolymer during the process. Afterwards, the concentration of free PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl in the micelles and control solution was determined by measuring their UV absorbance at 251 nm (NanoDrop 1000) and comparing to a calibration curve made from the absorbance of freshly prepared solutions of PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl of known concentrations. It was revealed that 100% of PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl control remains in solution after ultracentrifugation, confirming the validity of the method. When applied to the PIC micelle supernatants derived from ALG_{21}, ALG_{168}, and ALG_{389}, a 4.8, 5.6, and 5.1% (±1.0%) of free PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl were detected, respectively, which accounts for an efficiency of micelle formation *ca.* 94%.

Dynamic Light Scattering (DLS) and Stability of PIC Micelles

DLS measurements were performed on a Malvern Nano ZS (Malvern Instruments, U.K.), operating at 633 nm with a 173º scattering angle, at 25 or 37 ºC. DLS mean diameters were obtained from the volume particle size distribution provided by Malvern Zetasizer Software. DLS histograms were obtained from the volume and intensity particle size distributions.

PIC micelles prepared following the general procedures shown above were left at rt for 3 h (ALG, HA) or overnight (CS) before DLS measurements ("upon formation"; 10 mM PB, pH 7.4, 25 ºC). Then, to assess their stability towards ionic strength, micelles were supplemented with 150 mM NaCl and DLS recorded (at 25 ºC) after 1 h at rt. The stability of these micelles towards simulated physiological conditions (10 mM PB, pH 7.4, 150 mM NaCl) was analyzed after heating for at least 24 h at 37 ºC (DLS at 37 ºC).

Filtering of PIC micelles before DLS measurements was avoided to prevent removal of large aggregates that could obscure the analysis of micelle formation and stability.

CS PIC micelles

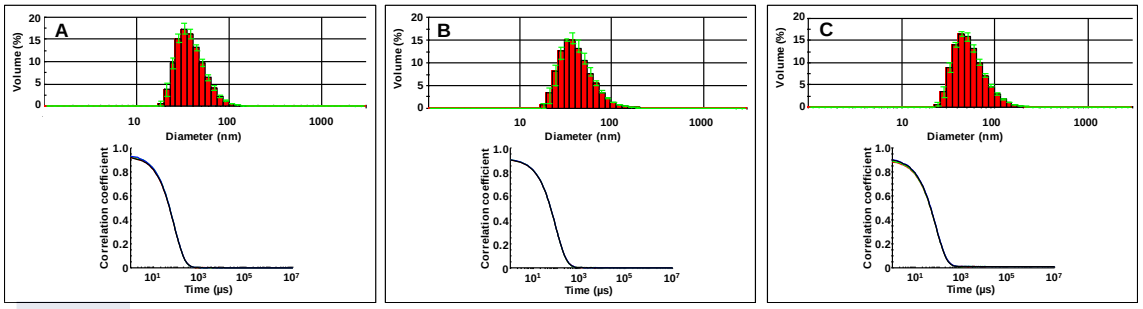


Figure S4.1. PIC micelles prepared from PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ and CS_{35} in 10 mM PB, pH 7.4, 25 ºC. DLS histograms and correlation functions (25 ºC) recorded upon formation (**A**) and 1 h after the addition of 150 mM NaCl (**B**). DLS histogram and correlation function (37 ºC) of the micelles in 150 mM NaCl after heating at 37 ºC for 24 h (**C**).

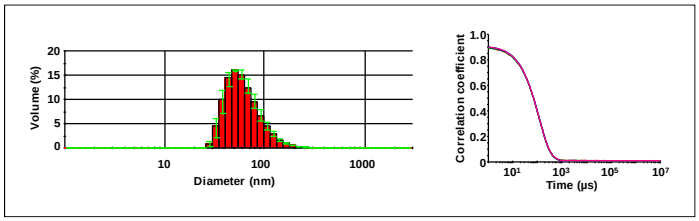


Figure S4.2. PIC micelles prepared from PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ and CS_{35} in 10 mM PB, pH 7.4, 25 °C. DLS histogram and correlation function (25 °C) recorded after freeze-drying and resuspension in H_2O.

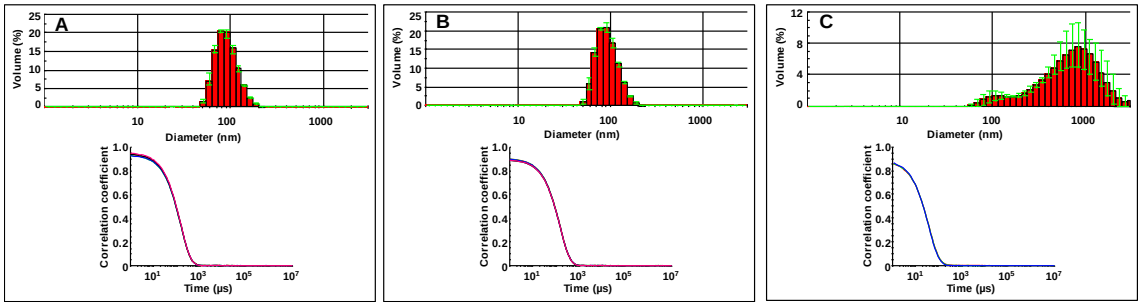


Figure S4.3. PIC micelles prepared from PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ and CS_{172} in 10 mM PB, pH 7.4, 25 °C. DLS histograms and correlation functions (25 °C) recorded upon formation (**A**) and 1 h after the addition of 150 mM NaCl (**B**). DLS histogram and correlation function (37 °C) of the micelles in 150 mM NaCl after heating at 37 °C for 24 h (**C**).

ALG PIC micelles

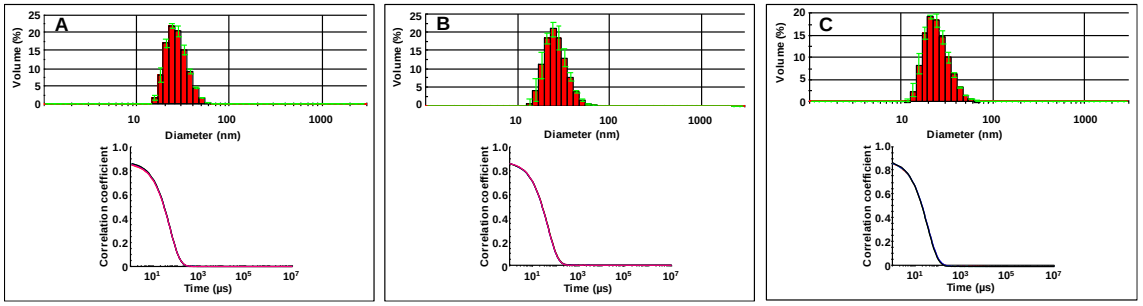


Figure S4.4. PIC micelles prepared from PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl and ALG_{21} in 10 mM PB, pH 7.4, 25 °C. DLS histograms and correlation functions (25 °C) recorded upon formation (**A**) and 1 h after the addition of 150 mM NaCl (**B**). DLS histogram and correlation function (37 °C) of the micelles in 150 mM NaCl after heating at 37 °C for 24 h (**C**).

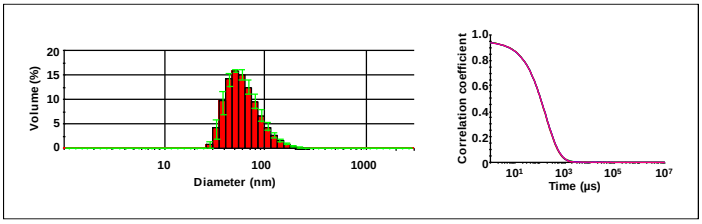


Figure S4.5. PIC micelles prepared from PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl and ALG_{21} in 10 mM PB, pH 7.4, 25 °C. DLS histogram and correlation function (25 °C) recorded after freeze-drying and resuspension in H_2O.

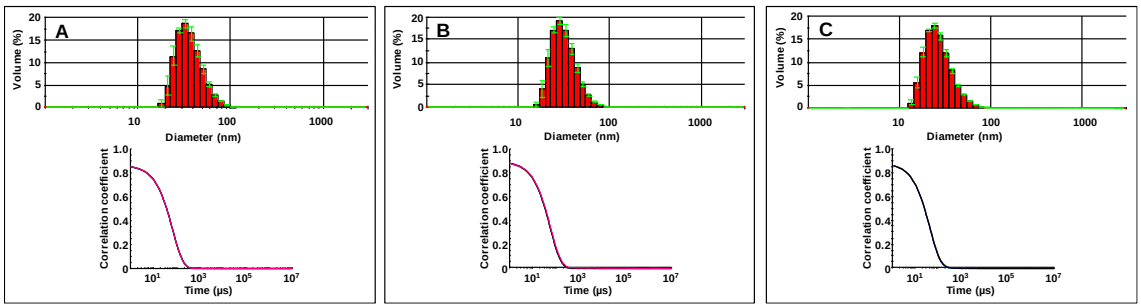


Figure S4.6. PIC micelles prepared from PEG-[G3]-BnNH$_2$·HCl and ALG$_{168}$ in 10 mM PB, pH 7.4, 25 °C. DLS histograms and correlation functions (25 °C) recorded upon formation (**A**) and 1 h after the addition of 150 mM NaCl (**B**). DLS histogram and correlation function (37 °C) of the micelles in 150 mM NaCl after heating at 37 °C for 24 h (**C**).

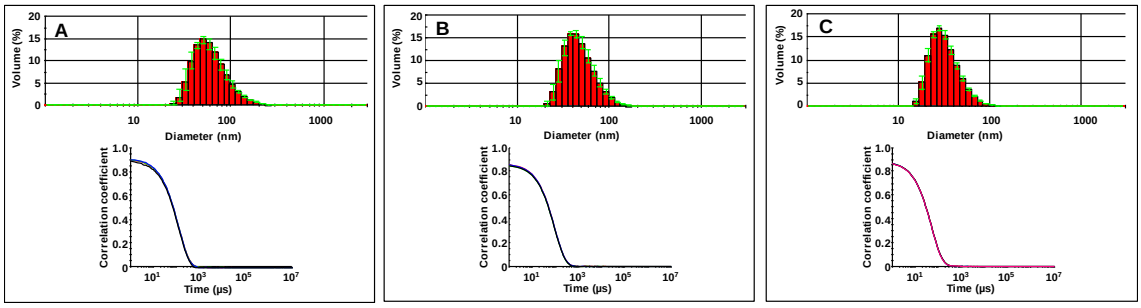


Figure S4.7. PIC micelles prepared from PEG-[G3]-BnNH$_2$·HCl and ALG$_{389}$ in 10 mM PB, pH 7.4, 25 °C. DLS histograms and correlation functions (25 °C) recorded upon formation (**A**) and 1 h after the addition of 150 mM NaCl (**B**). DLS histogram and correlation function (37 °C) of the micelles in 150 mM NaCl after heating at 37 °C for 24 h (**C**).

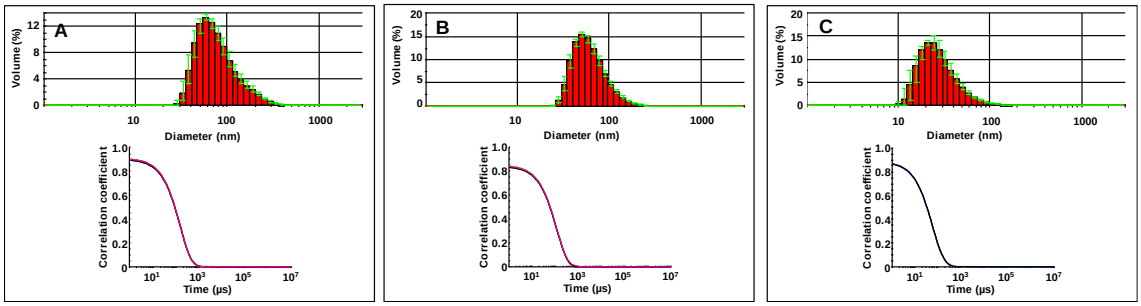


Figure S4.8. PIC micelles prepared from PEG-[G3]-BnNH$_2$·HCl and ALG$_{694}$ in 10 mM PB, pH 7.4, 25 °C. DLS histograms and correlation functions (25 °C) recorded upon formation (**A**) and 1 h after the addition of 150 mM NaCl (**B**). DLS histogram and correlation function (37 °C) of the micelles in 150 mM NaCl after heating at 37 °C for 24 h (**C**).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

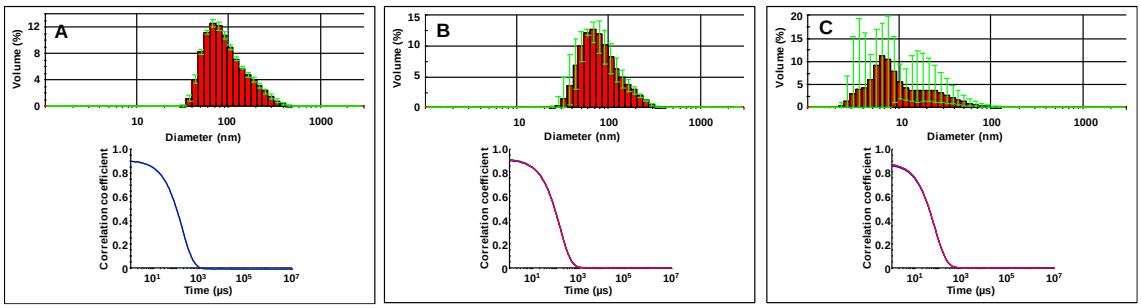


Figure S4.9. PIC micelles prepared from PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl and ALG_{1040} in 10 mM PB, pH 7.4, 25 °C. DLS histograms and correlation functions (25 °C) recorded upon formation (**A**) and 1 h after the addition of 150 mM NaCl (**B**). DLS histogram and correlation function (37 °C) of the micelles in 150 mM NaCl after heating at 37 °C for 24 h (**C**).

Control linear PEG-PLL_{27}/ALG PIC micelles

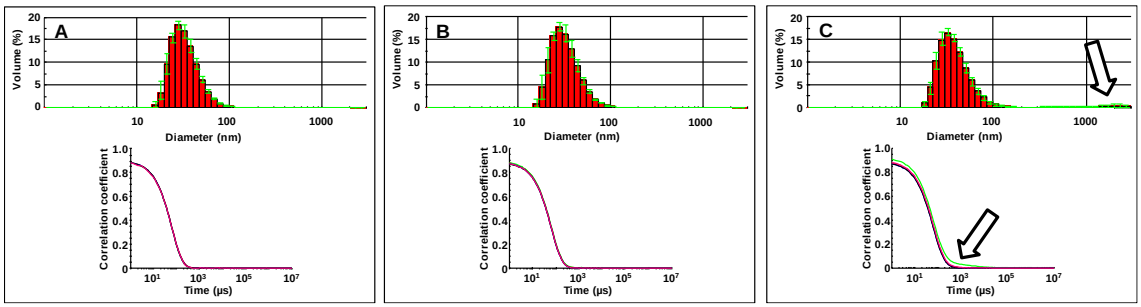


Figure S4.10. PIC micelles prepared from $PEG\text{-}PLL_{27}$ and ALG_{21} in 10 mM PB, pH 7.4, 25 °C. DLS histograms and correlation functions (25 °C) recorded upon formation (**A**) and 1 h after the addition of 150 mM NaCl (**B**). DLS histogram and correlation function (37 °C) of the micelles in 150 mM NaCl after heating at 37 °C for 24 h (**C**). Arrows denote incipient aggregation.

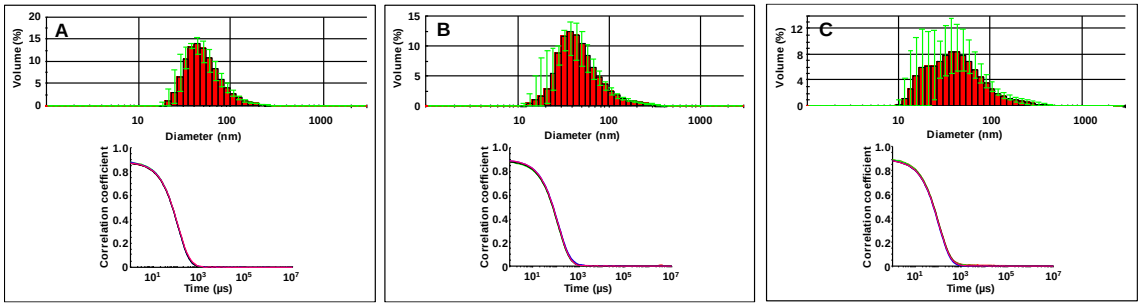


Figure S4.11. PIC micelles prepared from $PEG\text{-}PLL_{27}$ and ALG_{168} in 10 mM PB, pH 7.4, 25 °C. DLS histograms and correlation functions (25 °C) recorded upon formation (**A**) and 1 h after the addition of 150 mM NaCl (**B**). DLS histogram and correlation function (37 °C) of the micelles in 150 mM NaCl after heating at 37 °C for 30 min (**C**).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HA PIC micelles

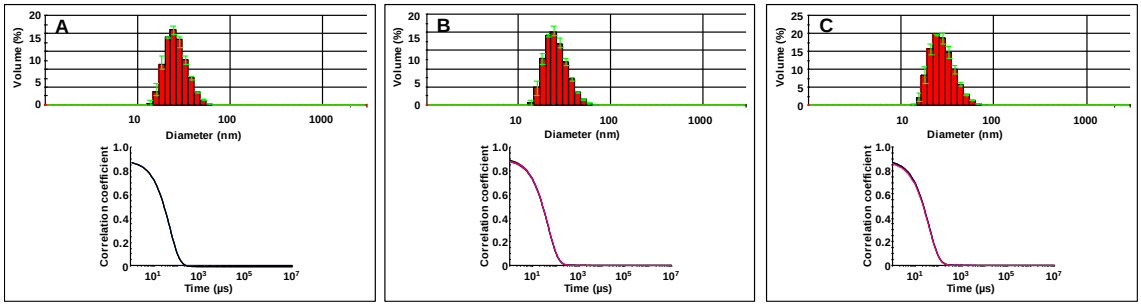


Figure S4.12. PIC micelles prepared from PEG-[G3]-BnNH$_2$·HCl and HA$_{71}$ in 10 mM PB, pH 7.4, 25 °C. DLS histograms and correlation functions (25 °C) recorded upon formation (**A**) and 1 h after the addition of 150 mM NaCl (**B**). DLS histogram and correlation function (37 °C) of the micelles in 150 mM NaCl after heating at 37 °C for 24 h (**C**).

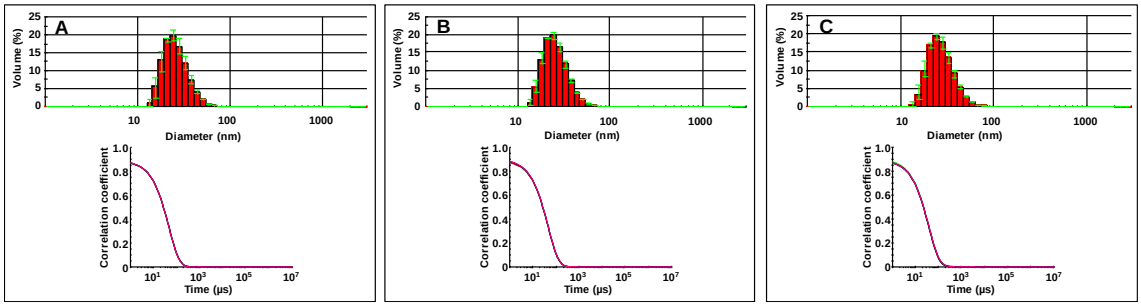


Figure S4.13. PIC micelles prepared from PEG-[G3]-BnNH2·HCl and HA165 in 10 mM PB, pH 7.4, 25 °C. DLS histograms and correlation functions (25 °C) recorded upon formation (**A**) and 1 h after the addition of 150 mM NaCl (**B**). DLS histogram and correlation function (37 °C) of the micelles in 150 mM NaCl after heating at 37 °C for 24 h (**C**).

Z-Potentials

Z-potential values of PIC micelles were obtained by laser doppler anemometry (LDA), measuring the mean electrophoretic mobility (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). Measurements were performed in 10 mM PB pH 7.4 (Hückel approximation). PIC micelles revealed values close to zero: CS$_{35}$ (-0.78 mV), ALG$_{21}$ (-1.38 mV) and HA$_{71}$ (-1.92 mV).

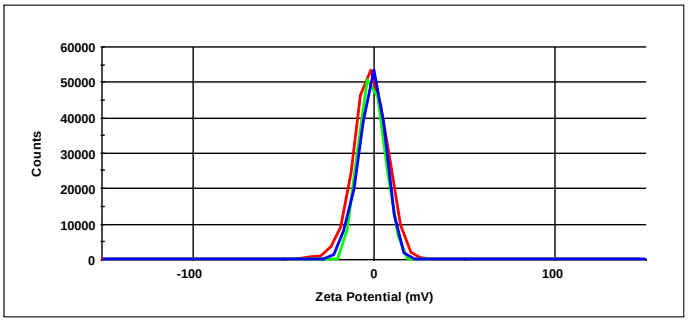


Figure S4.14. Z-potential of PIC micelles prepared from PEG-[G3]-PhCO$_2$Na and CS$_{35}$ in 10 mM PB, pH 7.4.

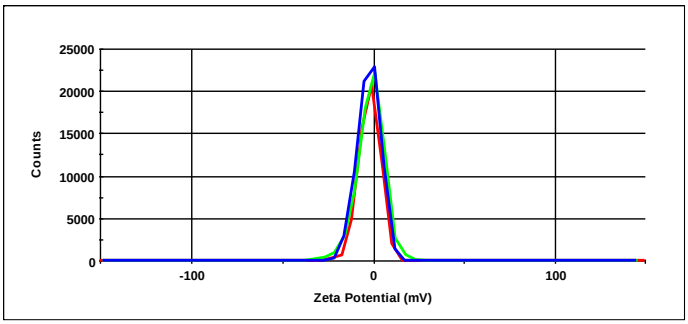


Figure S4.15. Z-potential of PIC micelles prepared from PEG-[G3]-BnNH$_2$·HCl and ALG$_{21}$ in 10 mM PB, pH 7.4.

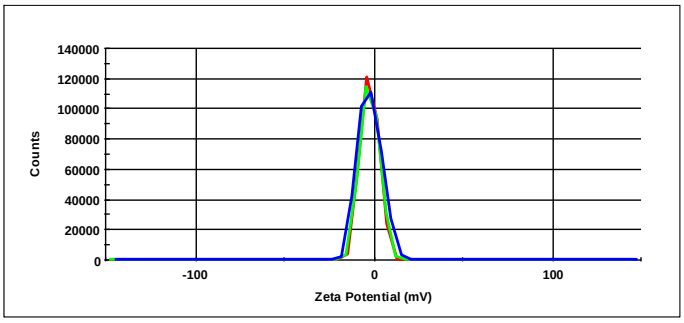


Figure S4.16. Z-potential of PIC micelles prepared from PEG-[G3]-BnNH$_2$·HCl and HA$_{71}$ in 10 mM PB, pH 7.4.

Doxorubicin (DOX) Loaded PIC Micelles

Encapsulation efficiency (EE) describes the fraction of drug incorporated into a micelle compared to the total amount of drug used in its preparation (EE = weight of drug in micelle × 100/weight of feeding drug). Drug loading (DL) refers to the mass fraction of a micelle that is composed of the drug (DL = weight of drug in micelle × 100/weight of drug-loaded micelle).

Preparation of DOX-loaded PIC micelles

PIC micelles from PEG-[G3]-BnNH$_2$·HCl and ALG$_{21}$, ALG$_{168}$, and ALG$_{389}$ were prepared as described above. Then, an aqueous solution of DOX (1/3 of PIC micelle volume, 1.0 mg/mL in H$_2$O) was added to the solution of micelles and the resulting mixture was stirred at rt overnight. Unloaded DOX was removed by dialysis (Spectra/Por® 6, MWCO 1 kDa) against 200 mL PBS pH 7.4 for 12 h in the dark at 37 °C. To determine the EE and DL of DOX, aliquots of the buffer solution were taken at the end of the dialysis (3 × 150 µL) and placed in a 96-well microplate. Then, 500 mM acetate pH 4 buffer (50 µL) was added to each well and the fluorescence of the samples was measured at a microplate reader ($\lambda_{exc.}$ 485±20 nm, $\lambda_{em.}$ 535±20 nm; Tecan Infinite F200 PRO). The concentration of unloaded DOX in solution was determined by comparison with a standard calibration curve made from the fluorescence emission of fresh solutions of DOX of known concentration prepared under identical conditions. EE of 56, 54 and 50% and DL of 17, 16, and 15% were obtained for the ALG$_{21}$, ALG$_{168}$, and ALG$_{389}$ micelles, respectively.

Fluorescence spectra of DOX-loaded micelles in PBS (samples diluted 20× with H_2O) were recorded in a NanoDrop 3300 fluorospectrometer ($\lambda_{exc.}$ 470±10 nm).

In vitro Release Study of DOX

DOX-loaded PIC micelles derived from PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl and ALG_{21}, ALG_{168}, and ALG_{389} were prepared and dialyzed as described above (Spectra/Por® 6, MWCO 1 kDa; 800 µL of micelles against 200 mL PBS pH 7.4, 37 °C, 12 h in the dark). Then, dialysis bags were moved to 50 mM acetate buffer pH 5.0, 100 mM NaCl (200 mL) and dialysis continued at 37 °C in the dark. At fixed times, aliquots (3 × 150 µL) were taken and placed in 96-well microplates. Then, 500 mM acetate pH 4 buffer (50 µL) was added to each well and the fluorescence of the samples was measured in a microplate reader ($\lambda_{exc.}$ 485±20 nm, $\lambda_{em.}$ 535±20 nm; Tecan Infinite F200 PRO). The amount of released DOX was calculated by comparison with a standard calibration curve made from the fluorescence emission of fresh solutions of DOX of known concentration, prepared under identical conditions.

Stability of DOX-loaded PIC Micelles in Serum

DOX-loaded PIC micelles derived from PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl and ALG_{21}, ALG_{168}, and ALG_{389} were prepared as described above. After unloaded DOX was removed by dialysis (Spectra/Por® 6, MWCO 1 kDa) against PBS pH 7.4 (12 h, 37 °C) in the dark, DOX-loaded micelles were incubated in fetal bovine serum (FBS) at 37 °C in the dark for 2, 12, and 24 h (volume ratio micelle solution:FBS, 1:9). Then, the mixtures were filtered through centrifugal filters (Amicon Ultra-4, MWCO 10 kDa, 6000 rpm, 60 min, 15 °C). Aliquots of the filtered solution (3 × 150 µL) were taken and placed in a 96-well microplate. Then, 500 mM acetate pH 4 buffer (50 µL) was added to each well and the fluorescence of the samples was measured in a microplate reader ($\lambda_{exc.}$ 485±20 nm, $\lambda_{em.}$ 535±20 nm; Tecan Infinite F200 PRO). Released DOX was calculated by comparing the fluorescence of the samples with a calibration curve made with solutions of known concentrations of DOX processed in the same way as the micelles.

Table S4.1. Percentage of DOX released from PIC micelles incubated in 90% FBS at 37 °C.

PIC Micelle	Time (h)		
	2	**12**	**24**
PEG-[G3]-$BnNH_2$/ALG_{21}	5±1	7±1	10±1
PEG-[G3]-$BnNH_2$/ALG_{168}	8±1	12±2	15±2
PEG-[G3]-$BnNH_2$/ALG_{389}	10±2	16±2	22±3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cell Studies

Cell Cultures

Human adenocarcinoma alveolar basal epithelial (A549) cells, obtained from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), were cultured at 37 ºC in 5% CO_2 atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose, containing 10% fetal bovine serum (FBS) and supplemented with 50 U/mL penicillin and 50 U/mL streptomycin. All cell experiments were performed with this modified DMEM containing 10% FBS and simply referred in the text as "medium".

Cytotoxicity Assays

A549 cells were seeded in a 96-well microplate (4×10^3 cells/well) in 100 µL of DMEM supplemented with 10% FBS and maintained at 37 ºC in a 5% CO_2 atmosphere for 24 h. Then, growth medium was replaced by fresh medium containing different concentrations of micelles and incubated for selected periods of time. Afterwards, 10 µL of a MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] solution (5 mg/mL in PBS) were added to each plate and incubated for 4 h, before 100 µL of solubilizing solution (10% SDS in 0.01 M HCl) were added and the resulting mixtures incubated overnight. Absorbance was read at 570±10 nm in a microplate reader (Tecan Infinite F200 PRO) and the relative cell viability was calculated according to: $(A_{sample}\text{-}A_{blank}/A_{control}\text{-}A_{blank}) \times 100$, where A_{sample} corresponds to the absorbance of well with cells treated with a determined sample, A_{blank} to the absorbance of well without cells, and $A_{control}$ to the absorbance of well with untreated cells.

Flow Cytometry

A549 cells were seeded in a 96-well microplate (1.7×10^4 cells/well) in 150 µL of DMEM supplemented with 10% FBS and maintained at 37 ºC in a 5% CO_2 atmosphere for 24 h. Then, growth medium was replaced by fresh medium containing DOX-loaded micelles and incubated at 37 ºC for 1 h. Cells were rinsed twice with PBS and trypsinized. Afterwards, DMEM supplemented with 2% FBS and 5 mM EDTA was added before analysis by flow cytometry (Guava® easyCyte BG HT Instrument). DOX fluorescence was detected by excitation with blue laser (488 nm), and emission detection in yellow channel (583 ± 26 nm).

Cellular Uptake Studies

A549 cells were seeded onto coverslips in a 12-well microplate and incubated overnight in 1 mL of DMEM supplemented with 10% FBS. Then, medium was replaced by solutions of PIC micelles [(i) 100 µL of fluorescently labeled (AF488-CS-PIC or FITC-ALG-PIC) micelles in 900 µL of medium; (ii) 25 µL of DOX-loaded ALG-PIC micelles or control free DOX in 975 µL of medium) and incubated at 37 ºC for a given time. Afterwards, medium was removed, cells were washed twice with PBS, and fresh medium (1 mL) was added before cells were incubated again for a given time. Half an hour before observation, cellular nuclei were stained by adding 10 µL of 2 µM Hoechst

33258 solution to each well, and acidic organelles stained by adding 10 μL of 5 μM LysoTracker Red (for PIC micelles labeled with Alexa Fluor 488 or FITC) or 10 μL of 100 μM LysoTracker Green (for free DOX and DOX-loaded PIC micelles). Immediately before observation, medium was removed and cells were washed twice with PBS before fresh medium was added. Intracellular distributions were observed by fluorescence microscopy using an Olympus BX-51 microscope equipped with an Olympus DP-71 camera.

The parameters of the fluorescent channels are the following ones. Blue channel: ultraviolet excitation U-MWU2: excitation filter 360-370 nm, emission filter 420 nm and dichromatic mirror 400 nm. Green channel: blue excitation U-MWB2: excitation filter 460-490 nm, emission filter 520 nm and dichromatic mirror 500 nm. Red channel: green excitation UMNG2: excitation filter 530-550 nm, emission filter 590 nm and dichromatic mirror 570 nm. Images were processed with Adobe Photoshop software.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.5. References

[1] Hoffman, A. S. *J. Control. Release* **2008**, *132*, 153-163.
[2] Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. *J. Control. Release* **2014**,*190*, 15-28.
[3] Tibbitt, M. W.; Dahlman, J. E.; Langer,R. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 704-717.
[4] Kabanov, A. V.; Vinogradov, S. V.; Suzdaltseva, Y. G.; Alakhov, V. Y. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6*, 639-643.
[5] Harada, A.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1995**, *28*, 5294-5299.
[6] van der Burgh, S.; de Keizer, A.; Cohen Stuart, M. A. *Langmuir* **2004**, *20*, 1073-1084.
[7] Voets, I. K.; de Keizer, A.; Cohen Stuart, M. A. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *147–148*, 300-318.
[8] Takahashi, R.; Narayanan, T.; Yusa, S.-I.; Sato, T. *Macromolecules* **2018**, *51*, 3654-3662.
[9] Maeda, H.; Nakamura, H.; Fang, J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 71-79.
[10] Bae, Y.; Kataoka, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 768-784.
[11] Sousa-Herves, A.; Fernandez-Megia, E.; Riguera, R. *Chem. Commun.* **2008**, 3136-3138.
[12] Fernandez-Villamarin, M.; Sousa-Herves, A.; Porto, S.; Guldris, N.; Martinez-Costas, J.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 2528-2537.
[13] Amaral, S. P.; Tawara, M. H.; Fernandez-Villamarin, M.; Borrajo, E.; Martínez-Costas, J.; Vidal, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 5273-5277.
[14] Kakizawa, Y.; Harada, A.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.***1999**, *121*, 11247-11248.
[15] Yuan, X.; Yamasaki, Y.; Harada, A.; Kataoka, K. *Polymer* **2005**, *46*, 7749-7758.
[16] Lee, Y.; Ishii, T.; Cabral, H.; Kim, H. J.; Seo, J.-H.; Nishiyama, N.; Oshima, H.; Osada, K.; Kataoka, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 5309-5312.
[17] Wang, J.; Wang, J.; Ding, P.; Zhou, W.; Li, Y.; Drechsler, M.; Guo, X.; Cohen Stuart, M. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 12680-12684.
[18] Sousa-Herves, A.; Novoa-Carballal, R.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *AAPS J.* **2014**, *16*, 948-961.
[19] Sousa-Herves, A.; Sánchez Espinel, C.; Fahmi, A.; González-Fernández, Á.; Fernandez-Megia, E. *Nanoscale* **2015**, *7*, 3933-3940.
[20] Vukojicic, P.; Béhar, G.; Tawara, M. H.; Fernandez-Villamarin, M.; Pecorari, F.; Fernandez-Megia E.; Mouratou, B. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 21391-21398.
[21] Neira, J. L.; Correa, J.; Rizzuti, B.; Santofimia-Castaño, P.; Abian, O.; Velázquez-Campoy, A.; Fernandez-Megia, E.; Iovanna, J. L. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 2567-2576.
[22] Cruz, L.; Basílio, N.; Mendoza, J.; Mateus, N.; de Freitas, V.; Tawara, M. H.; Correa, J.; Fernandez-Megia, E. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 11696-11706.
[23] Pinto, L. F.; Correa, J.; Martin-Pastor, M.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1972-1977.
[24] Rinaudo, M. *Polym. Int.* **2008**, *57*, 397-430.
[25] Shelke, N. B.; James, R.; Laurencin, C. T.; Kumbar, S. G. *Polym. Adv. Technol.* **2014**, *25*, 448-460.
[26] Yemisci, M.; Caban, S.; Gursoy-Ozdemir, Y.; Lule, S.; Novoa-Carballal, N.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E.; Andrieux, K.; Couvreur, P.; Capan, Y.; Dalkara, T. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2015**, *35*, 469-475.
[27] Willersinn, J.; Bogomolova, A.; Cabré, M. B.; Schmidt, B. V. K. J. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 1244-1254.
28 Sherman, S. E.; Xiao, Q.; Percec, V. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 6538-6631.

[29] Yu, Y.; Gim, S.; Kim, D.; Arnon, Z. A.; Gazit, E.; Seeberger, P. H.; Delbianco, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4833-4838.
[30] Ravi Kumar, M. N. V.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. J. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6017-6084.
[31] Inamdar, N. N.; Mourya, V. in *Advanced Biomaterials and Biodevices*, John Wiley & Sons, Inc., 2014, p. 183.
[32] Novoa-Carballal, R.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. in *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics*, ed. B. Sarmento and J. das Neves, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 2012, p. 333.
[33] Lee, K. Y.; Mooney, D. J. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 106-126.
[34] Dosio, F.; Arpicco, S.; Stella, B.; Fattal, E. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *97*, 204-236.
[35] Sæther, H. V.; Holme, H. K.; Maurstad, G.; Smidsrød, O.; Stokke, B. T. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 813-821.
[36] Boddohi, S.; Moore, N.; Johnson, P. A.; Kipper, M. J. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1402-1409.
[37] Wen, Y.; Grøndahl, L.; Gallego, M. R.; Jorgensen, L.; Møller, E. H.; Nielsen, H. M. *Biomacromolecules* **2012**,*13*, 905-917.
[38] Luo, K.; Yin, J.; Song, Z.; Cui, L.; Cao, B.; Chen, X. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2653-2661.
[39] De Santis, S.; Diociaiuti, M.; Cametti, C.; Masci, G. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *101*, 96-103.
[40] Khanal, A.; Nakashima, Y.; Li, Y.; Nakashima, K.; Kawasaki, N.; Oishi, Y. *Colloids Surf. A* **2005**, *260*, 129-135.
[41] Baccile, N.; Reboul, J.; Blanc, B.; Coq, B.; Lacroix-Desmazes, P.; In, M.; Gérardin, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8433-8437.
[42] Maggi, F.; Ciccarelli, S.; Diociaiuti, M.; Casciardi, S.; Masci, G. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3499-3507.
[43] Reboul, J.; Nugay, T.; Anik, N.; Cottet, H.; Ponsinet, V.; In, M.; Lacroix-Desmazes, P.; Gerardin, C. *Soft Matter* **2011**, *7*, 5836-5846.
[44] Novoa-Carballal, R.; Pergushov, D. V.; Muller, A. H. E. *Soft Matter* **2013**, *9*, 4297-4303.
[45] Sousa-Herves, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 205-210.
[46] Fernandez-Megia, E.; Correa, J.; Riguera, R. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3104-3111.
[47] Amaral, S. P.; Fernandez-Villamarin, M.; Correa, J.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4522-4525.
[48] Fernandez-Villamarin, M.; Sousa-Herves, A.; Correa, J.; Munoz, E. M.; Taboada, P.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *ChemNanoMat* **2016**, *2*, 437-446.
[49] Rinaudo, M. *Food Hydrocoll.* **2017**, *68*, 122-127.
[50] Novoa-Carballal, R.; Fernandez-Megia, E.; Riguera, R. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2079-2086.
[51] Darke, A.; Finer, E. G.; Moorhouse, R.; Rees, D. A. *J. Mol. Biol.* **1975**, *99*, 477-486.
[52] Novoa-Carballal, R.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Polymer* **2013**, *54*, 2081-2087.
[53] Novoa-Carballal, R.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 3225-3231.
[54] van der Kooij, H. M.; Spruijt, E.; Voets, I. K.; Fokkink, R.; Cohen Stuart, M. A.; van der Gucht, J. *Langmuir*, **2012**, *28*, 14180-14191 and references therein.
[55] Larger diameter values obtained by AFM (53± 7nm for CS_{35} micelles) in comparison to those from cryo-TEM (24±4 nm) reveal significant deformation from the spherical shape observed in solution by DLS (40±1 nm), occurred upon absorption onto the

hydrophilic mica AFM surface, as opposed to the hydrophobic carbon surface, the substrate for cryo-TEM characterization. For similar observations on size effects, see for example: Qi, K.; Ma, Q.; Remsen, E. E.; Clark Jr., C. G.; Wooley, K. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6599-6607.
[56] Biswas, S.; Kumari, P.; Lakhani, P. M.; Ghosh, B. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *83*, 184-202.
[57] Ge, Z.; Liu, S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7289-7325.
[58] Tacar, O.; Sriamornsak, P.; Dass, C. R. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65*, 157-170.
[59] Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 361-368.
[60] Lee, C. C.; Gillies, E. R.; Fox, M. E.; Guillaudeu, S. J.; Fréchet, J. M. J.; Dy, E. E.; Szoka, F. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 16649-16654.
[61] MacKay, J. A.; Chen, M.; McDaniel, J. R.; Liu, W.; Simnick, A. J.; Chilkoti, A. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 993-999.
[62] Fernandez-Megia, E.; Novoa-Carballal, R.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *61*, 155-161.
[63] Tømmeraas, K.; Vårum, K. M.; Christensen, B. E.; Smidsrød, O. *Carbohydr. Res.* **2001**, *333*, 137-144.
[64] Mao, S.; Shuai, X.; Unger, F.; Simon, M.; Bi, D.; Kissel, T. *Int. J. Pharm.* **2004**, *281*, 45-54.
[65] Sorlier, P.; Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1336-1342.
[66] Schatz, C.; Pichot, C.; Delair, T.; Viton, T.; Domard, A. *Langmuir* **2003**, *19*, 9896-9903.
[67] Schatz, C.; Viton, C.; Delair, T.; Pichot, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 641-648.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 3

De micelas nanométricas a gigantes PIC mediante autoensamblaje jerárquico de polímeros dendríticos

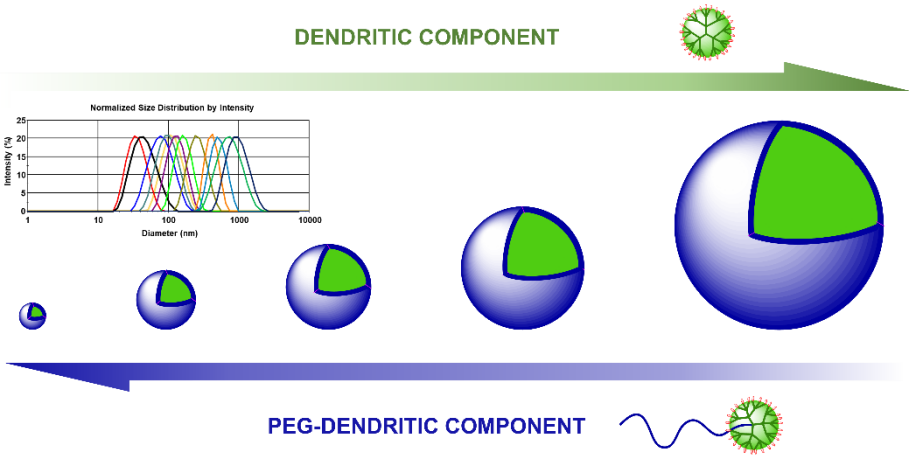
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante.

Miguel de Unamuno

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. CAPÍTULO 3. De micelas nanométricas a gigantes PIC mediante autoensamblaje jerárquico de polímeros dendríticos



Las micelas de tipo *polyion complex* (PIC) se han convertido en prometedores sistemas de *drug delivery* (DD) gracias a sus propiedades únicas. Pero el escaso control sobre su tamaño, en torno a los 30-40 nm, sigue siendo una de sus mayores limitaciones. En este trabajo proponemos explorar la regulación del tamaño de micelas PIC a través del empleo de proporciones variables de un dendrímero aniónico PEGuilado y otro sin PEG que posee la misma estructura e idéntico número de cargas. Usando un poliaminoácido como la PLL como especie de carga opuesta, y manteniendo una relación estequiométrica de cargas, proponemos la posibilidad de aumentar el tamaño de las micelas PIC desde los 40 hasta los 800 nm reduciendo la cantidad de dendrímero PEGuilado y sustituyéndolo por dendrímero sin PEG.

Mediante un estudio más detallado se evaluará el comportamiento con esta variación de componentes tanto del número de micelas, como de la superficie y densidad de PEG usando los tamaños obtenidos por *Dynamic Light Scattering* (DLS). Usando el peso molecular de las micelas obtenido por medidas de *Static Light Scattering* (SLS), se confirmarán estos comportamientos. Por último, se llevará a cabo una caracterización detallada de las micelas a través de la medida de su potencial z y el análisis por criomicroscopía de transmisión electrónica (cryo-TEM) que arrojará luz sobre las tendencias obtenidas con los datos de SLS y DLS. Además, mediante el etiquetado fluorescente de sus componentes, se analizará por microscopía confocal la estructura *core*-corona de estas micelas PIC.

5.1. Introducción

Desde el nacimiento de los primeros DDS en la década de los 50 se han descrito multitud de sistemas para la administración de fármacos y, entre ellos, los sistemas nanométricos han despertado un gran interés. Las micelas PIC se han consolidado como importantes sistemas de DD gracias a sus propiedades únicas como su preparación en medio acuoso, estructura *core*-corona, carga neta neutra, tamaño nanométrico y bajos índices de polidispersidad (PDI).[1,2] Estos sistemas se preparan por interacción electrostática entre polímeros con cargas opuestas en una relación estequiométrica de cargas. La presencia de un bloque hidrófilo neutro unido a uno o

ambos componentes permite confinar la interacción electrostática dentro del *core* de la micela.[3-8]

Aunque se han descrito multitud de aplicaciones de micelas PIC para el transporte de fármacos o biomoléculas como proteínas, anticuerpos o material genético,[8-11] este tipo de sistemas presentan dos grandes limitaciones. Su naturaleza electrostática las hace extremadamente sensibles a la fuerza iónica y existe un escaso control sobre su tamaño final.

Se han desarrollado mecanismos capaces de mejorar su estabilidad frente a la fuerza iónica, como el *crosslinking* covalente entre los componentes de la micela, o aproximaciones de *conversión de carga* mediante las que se modifica la estructura de alguno de los componentes incrementando la cantidad de cargas.[12-14] Nuestro grupo de investigación ha abordado esta problemática explotando la rigidez intrínseca y naturaleza globular de los dendrímeros. De esta forma, se han descrito micelas PIC estables a fuerzas iónicas incluso superiores a 3 M, explotando la rigidez intrínseca y la naturaleza globular de dendrímeros GATG.[15] Sin embargo, el control sobre el tamaño sigue siendo una gran limitación de estos sistemas.

Nuestro grupo de investigación ha descrito la preparación de micelas PIC a partir de copolímeros de bloque PEG-dendrímero y poliaminoácidos/polisacáridos de carga opuesta, que presentan tamaños en el rango de 30-40 nm.[15-17] Este tamaño coincide con el de micelas PIC preparadas a partir de polímeros lineales para las que, además, se ha demostrado la imposibilidad de regular el tamaño mediante variación del peso molecular de los componentes.[18-23] Esta limitación resulta de la arquitectura *core*-corona propia de micelas PIC, en la que los polímeros y bloques de carga opuesta se sitúan en el *core*, rodeados de una corona de PEG. La imposibilidad de regular el tamaño de micelas PIC es particularmente relevante en el área del transporte de fármacos, habida cuenta de la dependencia que existe entre tamaño y farmacocinética/biodistribución de nanopartículas.[24,25] Además, la obtención de micelas de tamaño superior a la micra abriría la posibilidad de utilizar estos sistemas como implantes locales e incluso como modelos protocelulares. Existe por tanto una urgente necesidad de desarrollar métodos que permitan la obtención de micelas PIC de tamaño variable desde 30-40 nm hasta superar la barrera de la micra.

En este trabajo proponemos explorar la regulación del tamaño de micelas PIC mediante el control de la proporción de PEG en la mezcla de los componentes empleados en la preparación de micelas. Aprovechando que la estructura *core*-corona antes mencionada confina los componentes cargados en el *core*, proponemos regular el tamaño de micelas PIC derivadas de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ y el poliaminoácido poli-L-lisina (PLL) mediante el empleo de proporciones variables de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ y el dendrímero no PEGuilado 3[G2]-$PhCO_2Na$, que posee la misma estructura y número de grupos terminales que el bloque dendrítico presente en PEG-[G3]-$PhCO_2Na$. Manteniendo una relación estequiométrica de cargas entre los componentes aniónicos y catiónicos, consideramos la posibilidad de incrementar de forma sustancial el tamaño de micelas PIC mediante reducción progresiva de la proporción entre PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ y 3[G2]-$PhCO_2Na$, siempre que el componente PEGuilado (PEG-[G3]-$PhCO_2Na$) mantuviera su preferencia por situarse en la corona de las micelas. La interacción de 3[G2]-$PhCO_2Na$ y PLL quedaría confinada y estabilizada en el *core* de la micela gracias a la corona de PEG, permitiendo la formación de estructuras de mayor tamaño (Figura 5.1).

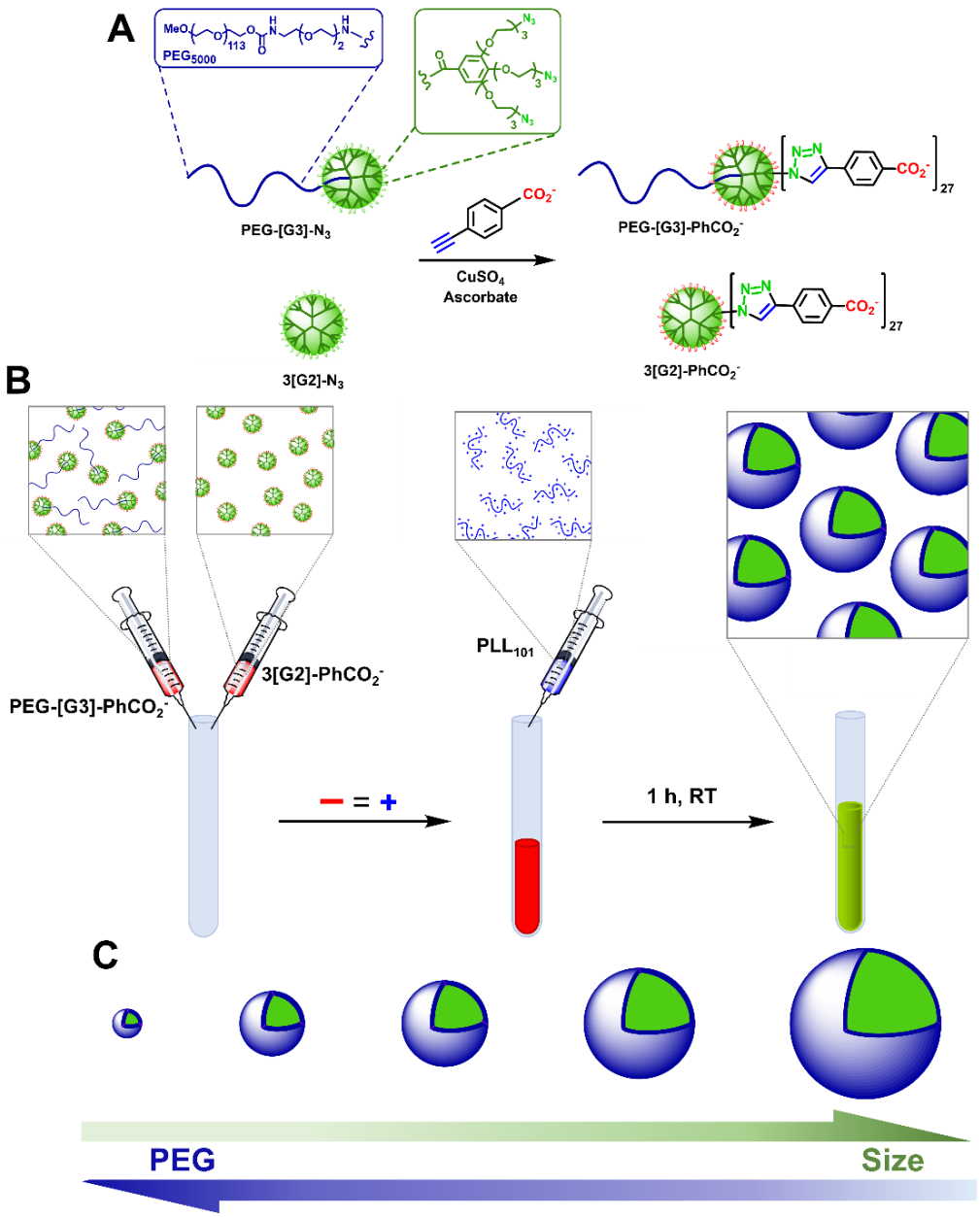


Figura 5.1. Estructura y síntesis del copolímero PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ y del dendrímero 3[G2]-$PhCO_2Na$ (**A**). Esquema de la preparación de micelas PIC (**B**) y evolución de su tamaño en función de la proporción proporción PEG-[G3]-$PhCO_2Na$:3[G2]-$PhCO_2Na$ (**C**).

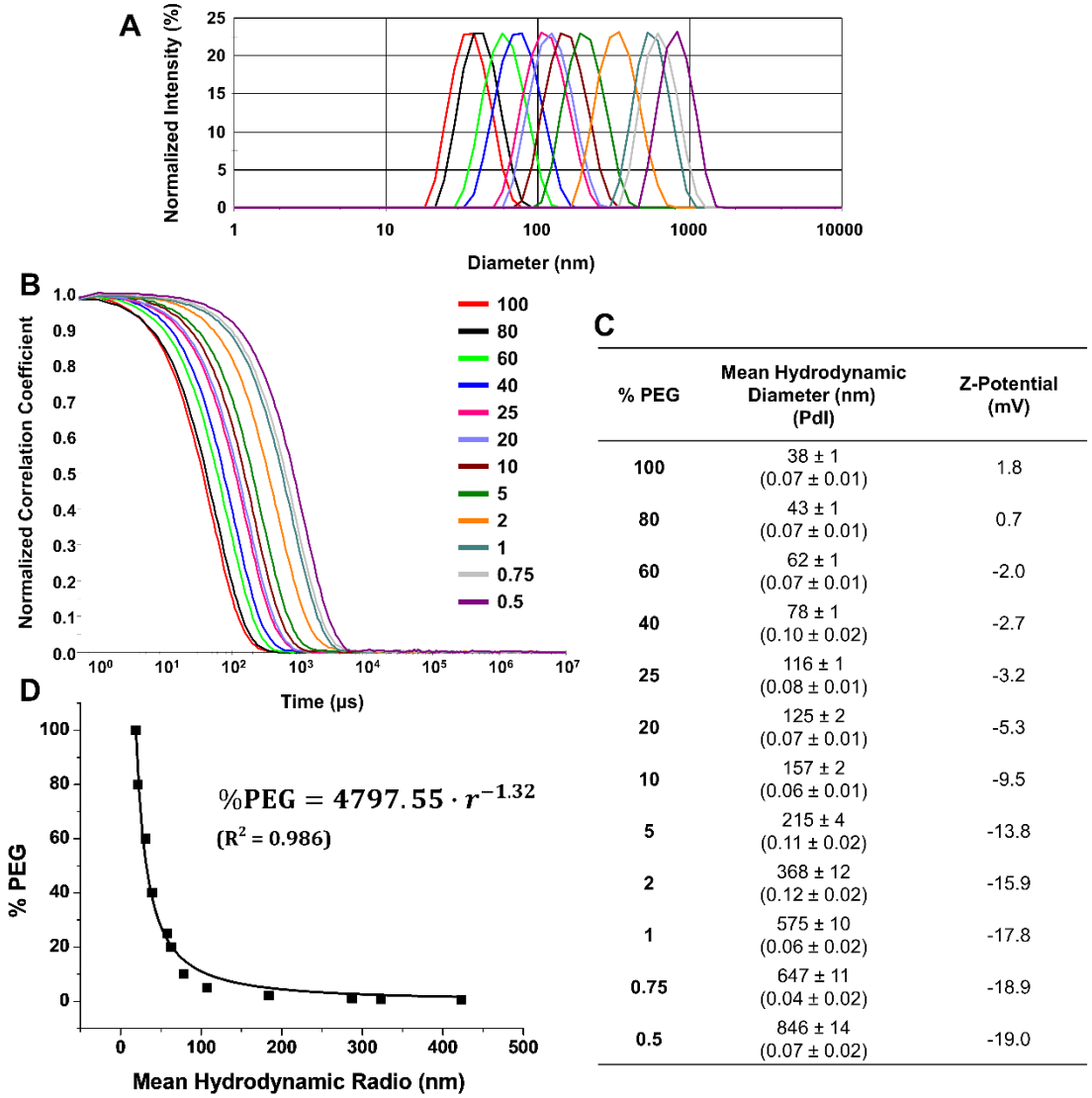
5.2. Resultados y discusión

La síntesis del copolímero de bloque PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ se realizó siguiendo un procedimiento previamente descrito por nuestro grupo de investigación.[15] De forma similar, el dendrímero aniónico 3[G2]-$PhCO_2Na$ se sintetizó a partir de 3[G2]-N_3, un dendrímero de segunda generación de la familia GATG,[26] mediante una reacción CuAAC entre las azidas terminales y el ácido 4-etinilbenzoico (Figura 5.1A).[27]

Una vez sintetizados los componentes dendríticos, se evaluó la preparación de micelas con diferentes proporciones de PEG. Para ello se añadió una cantidad fija de PLL_{101} en disolución sobre mezclas PEG-[G3]-$PhCO_2Na$/3[G2]-$PhCO_2Na$ de proporción variable, manteniendo una relación estequiométrica de cargas. Las

micelas se prepararon en tampón 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl y las estructuras nanométricas resultantes se analizaron por DLS (Figura 5.2).

El análisis del tamaño de las micelas reveló que a medida que disminuye la proporción de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ y aumenta la de 3[G2]-$PhCO_2Na$, el tamaño aumenta desde 38 nm para un 100% de PEG hasta aproximadamente 850 nm para el 0.5%, obteniéndose bajos valores de PDI en todos los casos (Figuras 5.2A-C y S5.1-5.12). El uso de porcentajes de PEG inferiores a 0.5% condujo a la agregación y/o precipitación del sistema, indicativo de la importancia del PEG en la superficie de las micelas a la hora de proporcionar estabilidad coloidal. La elevada variación del tamaño de las micelas confirma la hipótesis de partida por la cual es posible incrementar el tamaño de micelas PIC mediante una regulación del porcentaje de PEG *via* confinamiento de los componentes cargados en su interior.



% PEG	Mean Hydrodynamic Diameter (nm) (PdI)	Z-Potential (mV)
100	38 ± 1 (0.07 ± 0.01)	1.8
80	43 ± 1 (0.07 ± 0.01)	0.7
60	62 ± 1 (0.07 ± 0.01)	-2.0
40	78 ± 1 (0.10 ± 0.02)	-2.7
25	116 ± 1 (0.08 ± 0.01)	-3.2
20	125 ± 2 (0.07 ± 0.01)	-5.3
10	157 ± 2 (0.06 ± 0.01)	-9.5
5	215 ± 4 (0.11 ± 0.02)	-13.8
2	368 ± 12 (0.12 ± 0.02)	-15.9
1	575 ± 10 (0.06 ± 0.02)	-17.8
0.75	647 ± 11 (0.04 ± 0.02)	-18.9
0.5	846 ± 14 (0.07 ± 0.02)	-19.0

Figura 5.2. Distribución de tamaños por intensidad (**A**) y función de correlación (**B**) de micelas PIC obtenidas por DLS. Tamaño, PDI y potencial Z medido por DLS y *Laser Doppler Anemometry* (LDA) para las micelas PIC con diferentes proporciones de PEG (ratio PEG-[G3]-$PhCO_2Na$: 3[G2]-$PhCO_2Na$) (**C**). Variación del radio de las micelas (DLS) con distintos porcentajes de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (**D**).

La Figura 5.2D muestra la variación del radio de las micelas con el porcentaje de PEG. Inicialmente, se observa una reducción del tamaño lenta en el rango 20-100% PEG, que posteriormente se acelera de forma drástica a menores porcentajes de PEG. La relación entre el porcentaje de PEG y los radios obtenidos experimentalmente se ajusta perfectamente a una curva exponencial de orden -1.32 respecto al radio de las micelas (%PEG = A · $r^{-1.32}$). Esta ecuación mostrada en la Figura 5.2D constituye una herramienta extremadamente útil para la obtención de micelas a la carta de cualquier tamaño comprendido entre 40 y 850 nm mediante selección del porcentaje de PEG adecuado.

La posibilidad de formar micelas con un rango de tamaños tan amplio y en un solo paso, junto a la capacidad de predecir su tamaño en función de la proporción de componente PEGuilado nos animó a analizar en profundidad el modelo de agregación propuesto y a desarrollar ecuaciones que permitiesen predecir la variación teórica de número de partículas (*N*) y la superficie total de las partículas (*S*) en función del porcentaje de PEG.

Para determinar cómo varía el número de partículas (*N*) con el porcentaje de PEG, se asumió que las micelas presentan una estructura esférica y que el volumen total de *cores* (*V*, compuesto por los componentes y bloques poliméricos cargados) es independiente de la cantidad de PEG en superficie. Para este análisis se consideró que el volumen de la corona de PEG es despreciable frente al de la micela, algo perfectamente asumible a medida que aumenta el tamaño de las micelas.

Partiendo de la ecuación del volumen de una esfera (V_{esfera}, Ecuación 5.1), donde *r* es el radio de la micela, se definió V_i como el volumen total de micelas para un determinado porcentaje de PEG (Ecuación 5.2). A partir de la relación entre el volumen total de micelas para dos porcentajes de PEG, se obtuvo la Ecuación 5.3 que relaciona el número de micelas con su radio.

$$V_{esfera} = \frac{4}{3}\,\pi\,\mathrm{r}^3 \qquad \textbf{Ecuación 5.1}$$

$$V_i = \frac{4}{3}\,\pi\,\mathrm{r_i}^3 \qquad \textbf{Ecuación 5.2}$$

$$\left.\begin{aligned} \mathrm{V_1} &= \mathrm{N_1}\,\frac{4}{3}\,\pi\,\mathrm{r_1}^3 \\ \mathrm{V_2} &= \mathrm{N_2}\,\frac{4}{3}\,\pi\,\mathrm{r_2}^3 \end{aligned}\right\}\ \mathrm{V_1} = \mathrm{V_2} \rightarrow \mathrm{N_1}\,\mathrm{r_1}^3 = \mathrm{N_2}\,\mathrm{r_2}^3 \rightarrow \frac{\mathrm{N_1}}{\mathrm{N_2}} = \left(\frac{\mathrm{r_2}}{\mathrm{r_1}}\right)^3 \qquad \textbf{Ecuación 5.3}$$

A continuación, se determinó la dependencia entre la superficie total de las partículas (*S*) y el porcentaje de PEG. Partiendo de la ecuación del área de una esfera (S_{esfera}, Ecuación 5.4) se definió Si como la superficie total de micelas para un determinado porcentaje de PEG (Ecuación 5.5). A partir de la relación entre la superficie total de micelas para para dos porcentajes de PEG y aplicando la Ecuación 5.3, se obtuvo la Ecuación 5.6, que relaciona la superficie total de micelas con su radio.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$$S_{esfera} = 4\,\pi\,r^2 \qquad \textbf{Ecuación 5.4}$$

$$S_i = N_i\,4\,\pi\,r_i^2 \qquad \textbf{Ecuación 5.5}$$

$$\left.\begin{aligned} S_1 &= N_1\,4\,\pi\,r_1^2 \\ S_2 &= N_2\,4\,\pi\,r_2^2 \end{aligned}\right\} \frac{S_1}{S_2} = \frac{N_1}{N_2}\left(\frac{r_1}{r_2}\right)^2 = \left(\frac{r_2}{r_1}\right)^3\left(\frac{r_1}{r_2}\right)^2 = \frac{r_2}{r_1} \rightarrow \frac{S_1}{S_2} = \frac{r_2}{r_1} \qquad \textbf{Ecuación 5.6}$$

El análisis de las Ecuaciones 5.3 y 5.6 permite predecir que la disminución del porcentaje de PEG resulta en una drástica reducción del número de partículas (*N*), que es proporcional al cubo de la relación de radios (Ecuación 5.3). Respecto a la superficie de partículas, a pesar de que al disminuir el porcentaje de PEG se incrementa el tamaño de las micelas y, consiguientemente, su superficie con el cuadrado del radio (S_{esfera}, Ecuación 5.4), la superficie total de partículas (S_i, Ecuación 5.5) disminuye proporcionalmente a la relación de radios (Ecuación 5.6) debido a la dependencia de *N* con el cubo de los radios.

Por último, se determinó la variación de la densidad de PEG por partícula (*D*) con el porcentaje de PEG. Para cada porcentaje de PEG, se definió D_i como la ratio entre el número de moles de PEG utilizados en la preparación de las micelas (n_i, equivalente a los moles de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$) y S_i, la superficie total de micelas (Ecuación 5.7). Utilizando la Ecuación 5.3, se obtuvo la Ecuación 5.8 que permite determinar la variación de la densidad de PEG en la superficie de las micelas en función de los radios y las cantidades de componente PEGuilado empleado. Un análisis rápido de los datos experimentales en la Figura 5.2C permite predecir una disminución de *D* de entorno a un orden de magnitud asociada a la reducción del porcentaje de PEG entre 100 y 0.5%.

$$D_i = \frac{n_i}{S_i} \qquad \textbf{Ecuación 5.7}$$

$$\left.\begin{aligned} D_1 &= \frac{n_1}{S_1} \\ D_2 &= \frac{n_2}{S_2} \end{aligned}\right\} \frac{D_1}{D_2} = \frac{n_1\,S_2}{n_2\,S_1} \rightarrow \frac{D_1}{D_2} = \frac{n_1\,r_1}{n_2\,r_2} \qquad \textbf{Ecuación 5.8}$$

A continuación, a partir de los tamaños obtenidos por DLS, se emplearon las Ecuaciones 5.3, 5.6 y 5.8 para obtener valores relativos de *N*, *S* y *D* para cada porcentaje de PEG, normalizados respecto a los valores de la micela de 0.5% PEG. La representación de estos valores frente a los porcentajes de PEG se muestran en la Figura 5.3 en azul. Se observa que tanto *N*, como *S* y *D* disminuyen de forma exponencial al reducir el porcentaje de PEG, con órdenes cercanos a 2.4 para *N*, a 0.7 para *S* y a 0.4 para *D*. El hecho de que las variaciones observadas sigan las tendencias predichas, especialmente por las Ecuaciones 5.6 y 5.8, apoya el modelo de agregación propuesto. Sin embargo, el apoyo más firme al modelo se obtuvo cuando

el valor de %PEG en las ecuaciones mostradas en la Figura 5.3 se sustituyó por la ecuación de la Figura 5.2D que relaciona %PEG con los valores experimentales de *r* obtenidos por DLS (%PEG = A · $r^{-1.32}$). Como resultado de esta sustitución se concluyó que la *N* relativa es inversamente proporcional al cubo del radio ($r^{-3.17}$), mientras que las *S* y *D* relativas son inversamente proporcionales al radio ($r^{-0.92}$) en coincidencia muy cercana con las predicciones mostradas para estas variaciones en las Ecuaciones 5.3 y 5.6.

Respecto a la variación de la *D* relativa con el porcentaje de PEG (Figura 5.3C, línea azul), a medida que el porcentaje de PEG decrece y el tamaño de las micelas aumenta, la densidad de PEG en la superficie disminuye de forma exponencial. Este hecho justifica que las micelas con %PEG inferiores a 0.5 terminen agregando en disolución, ya que la densidad de PEG es tan baja que no es capaz de proporcionar suficiente estabilidad coloidal.

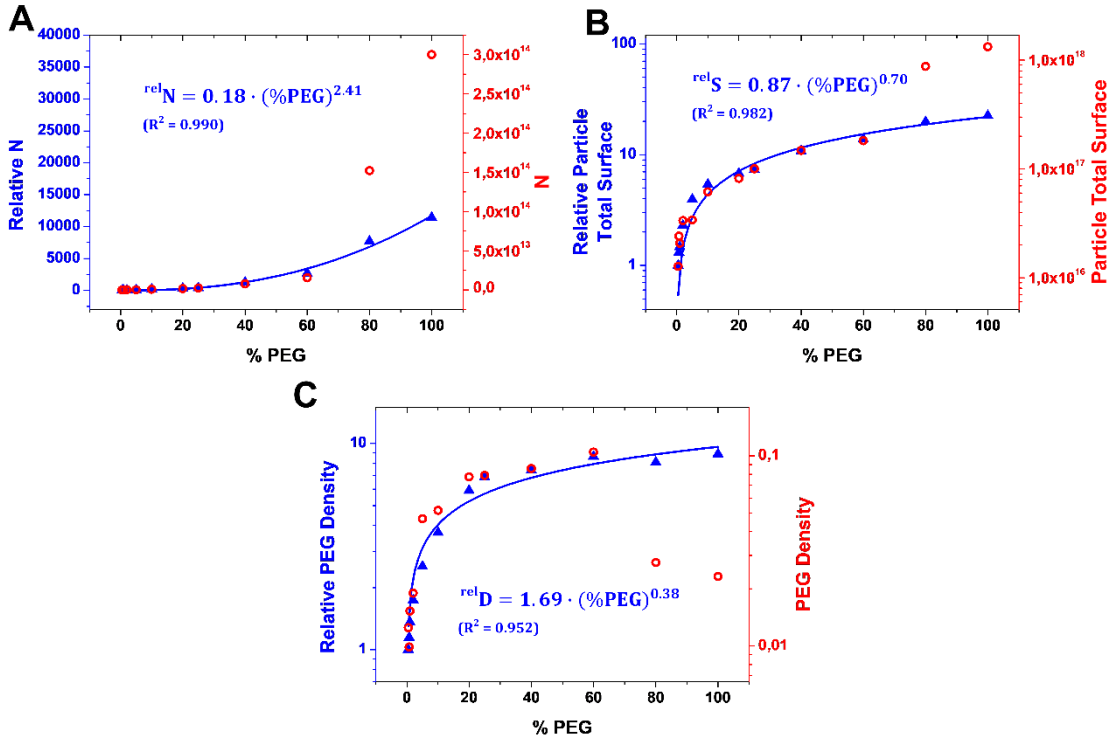


Figura 5.3. Representación normalizada del número de partículas (**A**), superficie total de las micelas (**B**) y densidad de PEG (**C**) obtenida a partir de las Ecuaciones 5.3, 5.6 y 5.8 y los datos de tamaño (*r*) determinados por DLS (azul). Representación absoluta del número de partículas (**A**), superficie total de las micelas (**B**) y densidad de PEG (**C**) obtenidas a partir a partir del dato de MW obtenido por SLS (Tabla 5.2) y los tamaños (*r*) determinados por DLS (rojo).

Para confirmar la solidez de los datos de DLS en las tendencias, nos planteamos analizar toda la serie de micelas mediante *Static Light Scattering* (SLS), para así determinar el peso molecular de las micelas (Información Suplementaria) y poder calcular de forma absoluta los valores de *N*, *S* y *D*. En las medidas de las muestras de 100 y 80% de PEG se detectó la presencia de dos tipos de partículas al observarse dos decaimientos diferentes del vector de dispersión *q*, uno correspondiente con las micelas PIC de tamaño nanométrico y un segundo decaimiento causado por una población de partículas de mayor tamaño invisible por DLS. Estas especies se han asociado a agregados PIC tipo *worm-like*,[23] que a pesar de representar un porcentaje

muy bajo de la muestra impiden un análisis directo de los datos. Por esta razón, ambas muestras fueron filtradas a través de un filtro de nylon de 0.45 µm antes de realizar la medida de SLS. Tras la eliminación de estas especies, se pudo confirmar por UV-Vis que su proporción en las disoluciones originales es inferior al 3% de la masa total de muestra.

Una vez obtenidos los MW (Información Suplementaria) y conociéndose las concentraciones de componentes en cada micela (Tabla S5.1) se determinó el número de agregación ($N_{agregación}$) de cada componente por micela, así como el número de micelas (*N*) en cada muestra (Tabla 5.2). Aplicando las Ecuaciones 5.5 y 5.7 previamente descritas y los valores de *r* determinados por DLS, se determinaron los valores de superficie total de micelas (*S*) y densidad de PEG (*D*) para toda la serie (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. MW de las micelas obtenido mediante SLS. $N_{agregación}$, número de micelas (*N*), superficie (*S*) y densidad de PEG (*D*) calculados usando los datos de DLS y SLS.

% PEG	MW (g/mol)	$N_{agregación}$			*N*	*S* (nm^2)	*D* (mol/nm^2)
		PEG-[G3]-$PhCO_2Na$	3[G2] -$PhCO_2Na$	PLL_{101}			
100	2.11×10^{6}	103	0	27	3.00×10^{14}	1.33×10^{18}	2.32×10^{-2}
80	3.85×10^{6}	158	40	53	1.52×10^{14}	8.77×10^{17}	2.75×10^{-2}
60	3.74×10^{7}	1220	813	544	1.56×10^{13}	1.82×10^{17}	1.05×10^{-1}
40	7.16×10^{7}	1653	2480	1105	7.67×10^{12}	1.48×10^{17}	8.57×10^{-2}
25	2.21×10^{8}	3345	10036	3577	2.37×10^{12}	1.01×10^{17}	7.89×10^{-2}
20	3.10×10^{8}	3810	15238	5092	1.66×10^{12}	8.18×10^{16}	7.75×10^{-2}
10	6.25×10^{8}	3969	35720	10610	7.99×10^{11}	6.15×10^{16}	5.16×10^{-2}
5	2.09×10^{9}	6742	128089	36044	2.35×10^{11}	3.40×10^{16}	4.66×10^{-2}
2	6.17×10^{9}	8056	394727	107674	7.87×10^{10}	3.35×10^{16}	1.89×10^{-2}
1	2.42×10^{10}	15845	1568675	423585	2.00×10^{10}	2.08×10^{16}	1.53×10^{-2}
0.75	2.64×10^{10}	12975	1717085	462491	1.83×10^{10}	2.41×10^{16}	9.88×10^{-3}
0.5	8.55×10^{10}	28030	5577890	1498612	5.66×10^{9}	1.27×10^{16}	1.25×10^{-2}

Los datos de *N*, *S* y *D* mostrados en la Tabla 5.2 se representaron frente al porcentaje de PEG y las tendencias (en rojo, Figura 5.3) se compararon con las relativas obtenidas en base a datos de DLS y las Ecuaciones 5.3, 5.6 y 5.8 (en azul, Figura 5.3). Como se puede apreciar en la comparación, ambas series de datos se solapan perfectamente en el rango 0.5-60% PEG que confirma con medidas absolutas el modelo de agregación propuesto. No obstante, existe una desviación en la tendencia para los datos obtenidos a partir de SLS en las micelas con un 80 y 100% de PEG, que podría explicarse bien porque estas micelas no sean completamente esféricas o porque presentan PEG en el interior del *core*, lo que las haría apartarse del modelo propuesto.[28] Para aclarar este punto, pretendemos estudiar la esfericidad de las micelas en función del porcentaje de PEG a través de la relación entre el radio de giro (R_g) y el radio hidrodinámico.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Para confirmar la naturaleza micelar de los ensamblados PIC, se realizó un estudio morfológico de los mismos mediante cryo-TEM. Se seleccionaron siete grados de

PEG diferentes (100, 40, 20, 10, 1, 0.75 y 0.5%), correspondientes a micelas con tamaños representativos de toda la serie (38, 78, 125, 157, 575, 647 y 846 nm por DLS, respectivamente). El análisis por cryo-TEM (Figura 5.4) reveló la presencia de estructuras esféricas compactas con diámetros medios coincidentes con los obtenidos por DLS. Así, del análisis de un número representativo de partículas para cada una de estas micelas, se obtuvieron los siguientes tamaños: 20, 59, 108, 171, 513, 634 y 763, respectivamente (Figura 5.4H). Como se puede apreciar existe una mínima diferencia entre el tamaño de DLS frente al determinado por cyro-TEM, especialmente en las micelas de menor tamaño. Se ha descrito que habitualmente las cadenas de PEG se vuelven invisibles al haz de electrones que utiliza esta técnica, lo que provoca una aparente reducción en el tamaño.[29-31] En el caso de las micelas con mayores tamaños existe una limitación técnica que provoca que parte de la población de partículas más grandes se queden fuera de la rejilla. Para que las imágenes puedan tener un contraste adecuado, el espesor del hielo no puede ser muy grande, por lo que las partículas con tamaños más grandes del propio espesor del hielo (aproximadamente 1 µm) son retenidas fuera de la rejilla en el proceso de vitrificación.

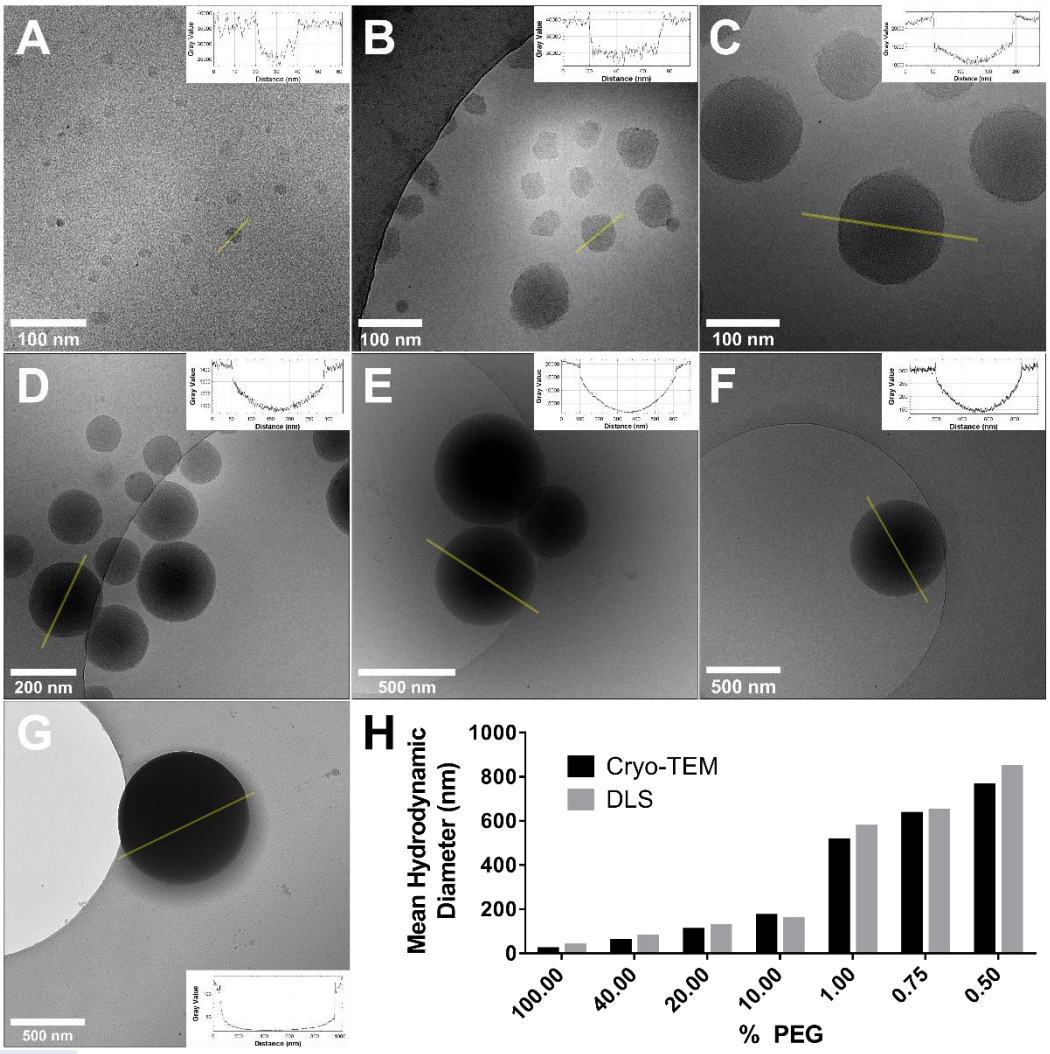


Figura 5.4. Imágenes de cryo-TEM de micelas formadas con distintos % de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$: 100% (**A**), 40% (**B**), 20% (**C**), 10% (**D**), 1% (**E**), 0.75% (**F**) y 0.5% (**G**). Comparación entre los tamaños de las micelas obtenidos por DLS y cryo-TEM (**H**).

Para dar mayor solidez a estos datos experimentales, se llevó a cabo una caracterización más exhaustiva de las micelas. Se midió el potencial z de toda la serie de micelas (Figuras 5.2C y S5.14-5.25) y se observó que aquellas que tenían mayores cantidades de PEG presentaban valores cercanos a cero. Sin embargo, a medida que se reduce la densidad de PEG se puede observar una clara tendencia a volverse más negativo. Este dato refuerza la tendencia en la variación de la densidad de PEG sobre la superficie de las micelas obtenida en los cálculos previos, puesto que a medida que se reduce la densidad de PEG, la carga del *core* queda más expuesta.

Para descartar la posible presencia de especies libres que no formen parte de la micela y que puedan alterar los datos de potencial z, se llevó a cabo la cuantificación de la cantidad de PLL_{101} libre en disolución después de la formación de las micelas del 100, 60, 40, 20, 1 y 0.5% de PEG. En todos los casos se obtuvieron eficiencias ≥98 ± 1 % (Información Suplementaria). Además, se realizó un experimento control en el que se confirmó que todo el PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ y el 3[G2]-$PhCO_2Na$ forman parte de la micela. Para ello se sometió a las micelas del 5% de PEG a un proceso de ultracentrifugación, eliminación del sobrenadante y resuspensión. Mediante este proceso cualquier especie aniónica libre en disolución se eliminaría con el sobrenadante, tras lo que la micela sin componentes aniónicos libres sería resuspendida. Se midió de nuevo el potencial z y al no observarse variaciones significativas en su valor, se descartó la presencia de especies aniónicas libres.

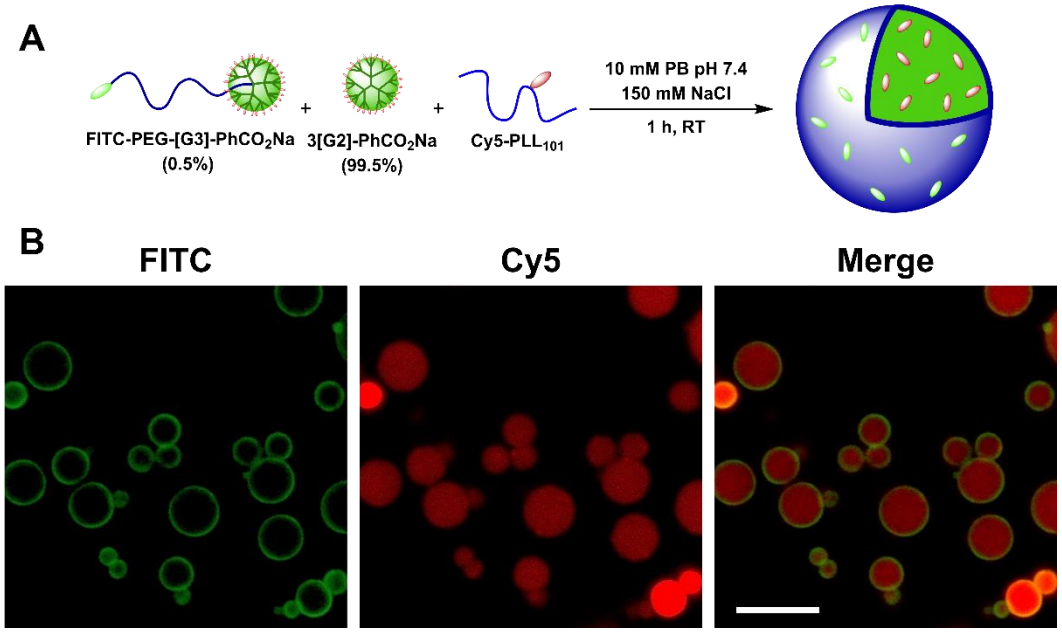


Figura 5.5. Esquema de la formación de micelas etiquetadas fluorescentemente (**A**). Imágenes de microscopía confocal de micelas formadas con un 0.5% de FITC-PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (verde), un 99.5% de 3[G2]-$PhCO_2Na$ y Cy5-PLL_{101} (rojo) en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl. Escala 5 µm (**B**).

Por último, se llevó a cabo un análisis de la estructura *core*-corona de estos sistemas para comprobar que todo el PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ se encuentra en la superficie y no en el *core*, comprobando así que las predicciones y los datos de la variación de la densidad de PEG en la superficie son correctos. Para ello se formó una micela con 0.5% de FITC-PEG-[G3]-$PhCO_2Na$, que incorpora una fluoresceína en el extremo terminal del PEG, y una PLL_{101} funcionalizada con Cy5 (Figuras 5.5A y S5.13). Tras su análisis por microscopía confocal de alta resolución (Figura 5.5B) se puede ver la

corona de PEG en verde (fluoresceína) y el *core* en rojo (Cy5), indicativo de que el PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ forma parte exclusivamente de la corona, mientras que el 3[G2]-$PhCO_2Na$ junto con la PLL_{101} forman el *core* de la micela.

5.3. Conclusiones

En este trabajo se ha estudiado la regulación del tamaño de micelas PIC desde los clásicos 40 nm hasta más de 800 nm a través de la combinación de dendrímeros y copolímeros de bloque PEG-dendrímero en determinadas ratios con poliaminoácidos de carga opuesta. Se ha demostrado que, gracias a las propiedades únicas de los dendrímeros como su rigidez intrínseca y su naturaleza globular, la interacción electrostática se confina en un *core* estabilizado por una corona de PEG. Además, a través de los tamaños obtenidos por DLS con las distintas ratios dendrímero/PEG-dendrímero se ha estudiado la variación en el número de micelas, su superficie total y su densidad de PEG en la superficie, demostrando que la densidad de PEG no es constante y que existe una densidad mínima que le aporta a las micelas PIC estabilidad coloidal. Este comportamiento también se ha estudiado a través de medidas de SLS para la determinación del MW de las micelas, lo que ha permitido la determinación de valores absolutos del número de micelas, superficie y densidad de PEG.

5.4. Información Suplementaria

Materiales

Todos los reactivos empleados en este capítulo fueron comprados en Sigma-Aldrich o Fluka a menos que se indique lo contrario. Todos los disolventes son de grado HPLC, adquiridos en Scharlab, Sigma-Aldrich o Acros Organics. La Et_3N y el DMSO se secaron bajo tamices moleculares de 4 Å previamente activados en una mufla a 500 ºC. La DMF se secó utilizando un sistema de purificación de disolventes SPS800 de MBRAUN. El H_2O de grado Milli-Q se obtuvo mediante un sistema de purificación de agua Millipore/Integral 5. Los copolímeros de bloque PEG-[G3]-$PhCO_2Na$, H_2N-PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ y el dendrímero 3[G2]-N_3 se prepararon siguiendo procedimientos previamente descritos por nuestro grupo de investigación.[15,26] El hidrobromuro de poli(L-lisina) (PLL_{101}) [MW 21300 y DP 101 determinados por RMN] se adquirió en Polypeptide Therapeutic Solutions. El fluoróforo Cy5 NHS ester se compró en Lumiprobe GmbH.

Métodos generales

Ultrafiltración y Diálisis

Las purificaciones por ultrafiltración se realizaron en celdas agitadas de Millipore Amicon usando membranas de celulosa regenerada (YM3, MWCO 3 kDa) bajo una presión de N_2 de 5 psi. Las diálisis se realizaron con membranas Spectra/Por 6 de 18 mm (MWCO 1 kDa) de SpectrumLabs.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Espectroscopía de RMN

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Varian Mercury 300 MHz o Varian Inova 500 MHz. Los desplazamientos químicos se describen en unidades δ

(ppm) y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz, usando como referencia la señal residual del disolvente o la señal del TMS. El procesado de los espectros se llevó a cabo utilizando el software MestreNova versión 14.2.2-28739 (Mestrelab Research).

Espectroscopía Infrarroja

Los espectros FT-IR se registraron en un Perkin-Elmer Spectrum Two equipado con un accesorio UATR.

Espectroscopía UV-Vis

Los espectros UV-Vis se registraron en un espectrómetro Jasco V-630.

Determinación de valores de pH

Los valores de pH se midieron con un pH-metro portátil (Crison PH25) conectado a un electrodo de vidrio (Crison 52 09).

Microscopía confocal de alta resolución

Las micelas se analizaron utilizando el microscopio de barrido láser confocal invertido Leica Stellaris 8 FALCON (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con el paquete Leica Application Suite X (LAS X). Las muestras fueron excitadas con un láser de luz blanca (WLL2) y se emplearon detectores híbridos para detectar la emisión de luz fluorescente. Las longitudes de onda de excitación/ emisión se establecieron en 491 nm / 496-600 nm para la fluoresceína y 649 nm / 658-730 nm para la Cy5. Utilizando el objetivo de inmersión en glicerol HC PL APO CS2 93×/1.30 Gly, se adquirieron series de imágenes (*xyz*) con una resolución de 544 × 272 pixeles, correspondientes a un área *xy* de 20.83 × 10.4 µm a intervalos de *z* de 0.038 µm. Las imágenes fueron adquiridas aplicando la deconvolución adaptativa *Leica Lightning*.

Cryo-Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM)

Las micelas PIC preparadas en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl se *crosslinkearon* mediante la adición de EDC (5 equiv por grupo amino, 100 mg/mL en H_2O). Después de agitar a temperatura ambiente overnight, las micelas se dializaron frente a H_2O (MWCO 1 kDa, 3 × 500 mL) para obtener las micelas PIC *croslinkeadas*.

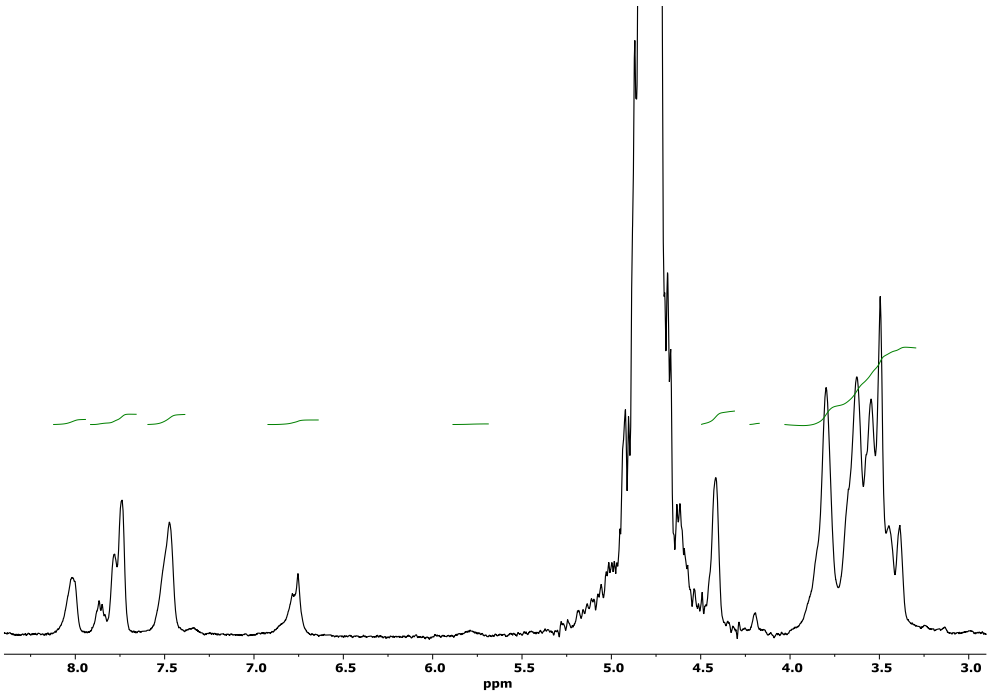
Para la crioimagen 2D, se depositaron 4 µL de muestra (0.5 mg/mL) directamente en una rejilla de microscopía (Quantifoil® R 2/2, carbon-grid glow-discharged 200-mesh) y se sumergieron rápidamente en etano líquido con la ayuda de un Vitrobot Mark III (FEI Inc., Eindhoven, Países Bajos). El análisis de la muestra se llevó a cabo con un microscopio electrónico de transmisión JEM-2200 FS/CR (JEOL Ltd.), utilizando un voltaje de 200 KV y un desenfoque de -1.5 a -5.0 µm. Las imágenes se tomaron con una cámara CCD 4K×4K UltraScan 4000 (Gatan Inc., Pleasanton, CA, EE. UU.). Para mejorar la relación señal/ruido, se utilizó un filtro de Omega-energy in-column con un ancho de rendija de energía establecido en 30 eV. El tamaño de las micelas PIC se determinó con el software ImageJ (versión 1.51j8) midiendo el perfil de intensidad de las micelas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Síntesis y caracterización

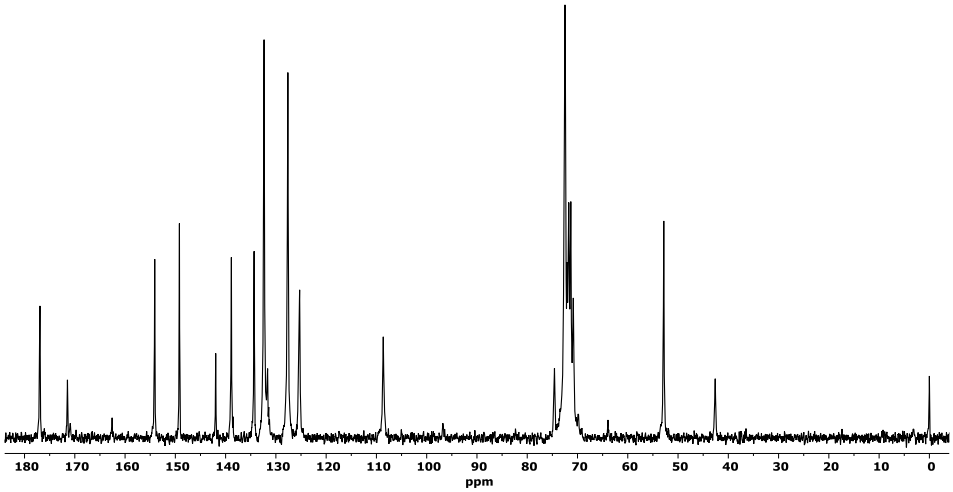
3[G2]-PhCO$_2$Na

Se añadió ácido 4-etinilbenzoico (58.4 mg, 0.35 mmol) a una disolución de 3[G2]-N_3 (49.8 mg, 6.4 μmol) en una mezcla de *t*-BuOH/H_2O (1.73 mL, 1:1). A continuación, se añadió $CuSO_4$ (86.6 μL, 8.7 μmol, 0.1 M, 5 mol% por azida) y ascorbato sódico (433 μL, 43.3 μmol, 0.1 M, 25 mol% por azida). Tras 18 h de agitación a temperatura ambiente protegida de la luz, se añadió ascorbato sódico (433 μL, 43.3 μmol, 0.1 M, 25 mol% por azida) y DMF (570 μL). Después de 24 h adicionales de agitación a temperatura ambiente protegida de la luz, la mezcla de reacción se purificó por ultrafiltración (YM3) y se lavó con una disolución 0.1 M EDTA pH 6.0 (2 × 15 mL), 0.1 M $NaHCO_3$ (2 × 15 mL) y H_2O (5 × 15 mL). La disolución resultante se liofilizó para obtener 3[G2]-PhCO$_2$Na (70.4 mg, 89 %) como una espuma de color amarillo pálido. ^{1}H RMN (500 MHz, D_2O) δ: 8.12-7.94 (m, 27H), 7.92-7.66 (m, 54H), 7.60-7.38 (m, 54H), 6.92-6.64 (m, 24H), 5.79 (br s, 3H), 4.35-4.31 (m, 72H), 4.23-4.17 (m, 6H), 4.03-3.29 (m, 408H). ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O) δ: 177.0, 176.9, 171.5, 170.9, 162.6, 154.1, 149.2, 142.0, 138.8, 138.5, 134.3, 132.3, 131.7, 127.6, 125.6, 108.6, 96.8, 74.6, 73.4, 72.5, 72.4, 72.1, 71.8, 71.7, 71.3, 70.8, 69.9, 69.8, 69.1, 63.9, 52.8, 42.6. IR (ATR): 3299, 1581, 1536, 1424, 1409, 782 cm^{-1}.

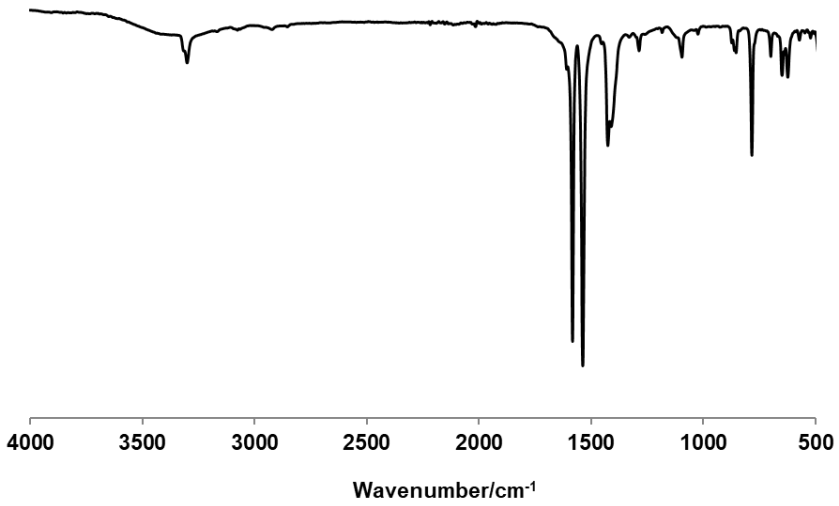


^{1}H RMN (D_2O, 500 MHz) de 3[G2]-PhCO$_2$Na.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



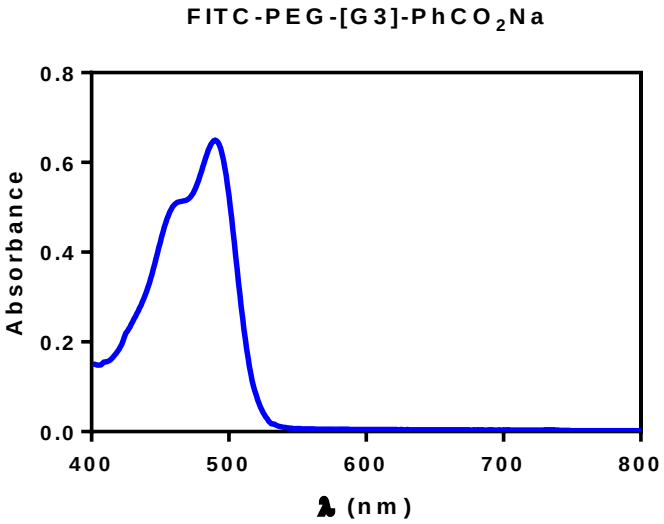
^{13}C RMN (D_2O, 75 MHz) de 3[G2]-$PhCO_2Na$.



IR de 3[G2]-$PhCO_2Na$.

FITC-PEG-[G3]-$PhCO_2Na$

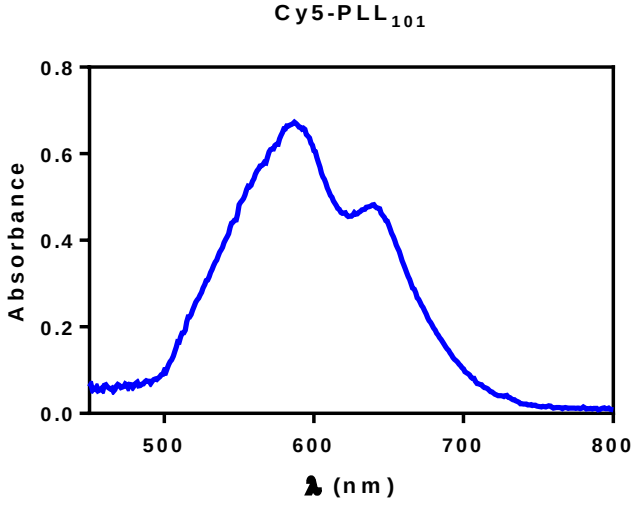
Sobre una disolución de H_2N-PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (5.0 mg, 0.30 μmol) y Et_3N (0.2 μL, 1.21 μmol) en DMF seco (262 μL), se añadió una disolución de FITC (0.9 mg, 2.40 μmol) en DMSO seco (188 μL). Tras 24 h de agitación bajo Ar, temperatura ambiente y protegida de la luz, la mezcla de reacción se purificó por ultrafiltración (YM3) y se lavó con una disolución 0.1 M $NaHCO_3$ (6 × 15 mL) y H_2O (3 × 15 mL). La disolución resultante se liofilizó para dar FITC-PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ como un sólido naranja (4.4 mg, 86%). Se determinó un grado de funcionalización de fluoresceína del 100% a través de su absorbancia a 490 nm (λ_{490}: 93200 $cm^{-1}M^{-1}$ proporcionado por el proveedor).



Espectro UV-Vis de FITC-PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ en H_2O.

Cy5-PLL$_{101}$

Sobre una disolución de PLL_{101} (8.8 mg, 0.39 μmol) en 0.1 M $NaHCO_3$ pH 9.0 (4.40 mL) se añadió una disolución de Cy5 NHS ester (0.3 mg, 0.39 μmol) en DMSO seco (39 μL) y la mezcla se agitó a overnight a temperatura ambiente protegida de la luz. La reacción se purificó mediante diálisis (2 × 500 mL H_2O, 3 × 500 mL 10 mM NaH_2PO_4, 3 × 500 mL 150 mM NaBr, 4 × 500 mL H_2O; MWCO 1 kDa) y se liofilizó para obtener Cy5-PLL_{101} (7.7 mg, 86%) como un sólido azul oscuro. Se determinó un grado de funcionalización de Cy5 del 44% a través de su absorbancia a 640 nm (λ_{640}: 250000 $cm^{-1}M^{-1}$ proporcionado por el proveedor).



Espectro UV-Vis de Cy5-PLL_{101} en H_2O.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Micelas PIC

Notas generales sobre las micelas PIC

Las disoluciones de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$, FITC-PEG-[G3]-$PhCO_2Na$, 3[G2]-$PhCO_2Na$, PLL_{101} y Cy5-PLL_{101} se envejecieron overnight a temperatura ambiente antes de la preparación de las micelas. Estas disoluciones se filtraron a través de filtros de nailon de 0.45 µm inmediatamente antes de la formación de las micelas. Se evitó el filtrado de las micelas PIC antes de las medidas de DLS para evitar la eliminación de grandes agregados que pudieran distorsionar el análisis de la formación y estabilidad de las micelas.

Preparación de micelas PIC

El PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (3.08 mg/mL), FITC-PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (3.00 mg/mL) y 3[G2]-$PhCO_2Na$ (2.16 mg/mL) se disolvieron por separado en 10 mM Na_2HPO_4/0.1 M NaOH (15% v/v) 150 mM NaCl, y se mezclaron en diferentes proporciones (Tabla S5.1). La PLL_{101} (0.5 mg/mL) y Cy5-PLL_{101} (0.51 mg/mL) se disolvieron en 10 mM NaH_2PO_4 150 mM NaCl. Las micelas se prepararon mezclando los componentes dendríticos aniónicos y la PLL en una ratio 1:2 (relación estequiométrica de aminas y carboxilatos). El pH final de la disolución de micelas fue 7.3-7.5, y se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente antes de su análisis.

Tabla S5.1. Volúmenes de los componentes y concentración final de la micela.

% PEG	PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (µL)	3[G2]-$PhCO_2Na$ (µL)	Concentración micela (mg/mL)
100	300	0	1.08
80	240	60	1.02
60	180	120	0.97
40	120	180	0.91
25	75	225	0.87
20	60	240	0.86
10	30	270	0.83
5	15	285	0.82
2	6	294	0.81
1	3	297	0.80
0.75	2.25	297.75	0.80
0.5	1.50	298.50	0.80

Volumen de PLL_{101} constante: 600 µL.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Eficiencia de formación de las micelas PIC

La eficiencia de formación de las micelas PIC se evaluó mediante la cuantificación de la cantidad de PLL_{101} libre en la disolución de las micelas preparadas a partir de PEG-

[G3]-$PhCO_2Na$ (1.03 mg/mL en micela), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (0.72 mg/mL en micela) y PLL_{101} (0.33 mg/mL en micela). Para llevar a cabo la cuantificación se explotó la fluorescencia que caracteriza a los isoindoles sustituidos tras la reacción de aminas primarias con *o*-ftalaldheído en presencia de tioles.[32,33] Primero se llevó a cabo una separación de cualquier PLL_{101} libre en disolución a través de una ultracentrifugación (308000 rcf, 15 °C, 4 h) de las micelas PIC (4 mL en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl), usando como control una disolución de PLL_{101} (4 mL in 10 mM PB pH 7.4, 0.33 mg/mL) para descartar la precipitación de la PLL_{101} en el proceso. A continuación, los sobrenadantes de las micelas PIC y del control (25 µL) se mezclaron por separado en una placa de 96 pocillos con una disolución de 0.4 M H_3BO_3 pH 9.7 (25 µL) y 50 µL de una disolución que contenía *o*-ftalaldheído (0.04% w/v), 2-mercaptoetanol (0.2% v/v) y Et_2O (0.1% v/v) en H_2O. Las concentraciones de los sobrenadantes se determinaron midiendo su fluorescencia ($\lambda_{exc.}$ 355 nm y $\lambda_{em.}$ 460 nm, Lector de placas Tecan InfiniteF200 PRO) en comparación con una recta de calibrado de PLL_{101}. Se obtuvo como resultado que el 98.0% (±1.0%) de la PLL_{101} control permanece en disolución tras la ultracentrifugación y que la eficiencia de formación en todos los casos fue superior al 98% (Tabla S5.2).

Tabla S5.2. Eficiencia de formación de las micelas PIC.

% PEG	% PLL Libre
100	2.0
60	1.0
40	1.6
20	0.3
1	0.4
0.5	0.3

Dymanic Light Scattering (DLS) de las micelas PIC

Las medidas de DLS se realizaron en un Malvern Nano ZS (Malvern Instruments, U.K.), trabajando a 633 nm con un ángulo de dispersión de 173º, a 25 °C. Los diámetros medios de DLS se obtuvieron a partir de la distribución por intensidad de los tamaños de partícula, proporcionada por el software Malvern Zetasizer. Los histrogramas de DLS se obtuvieron a partir de las distribuciones por intensidad del tamaño de partícula.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

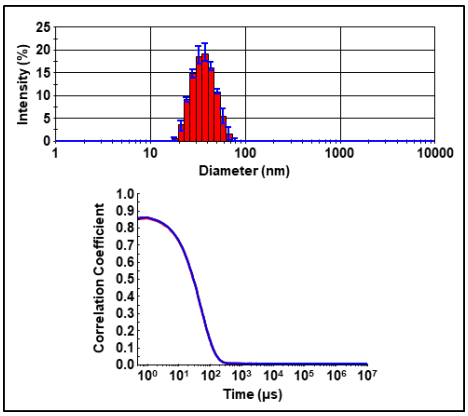


Figura S5.1. Micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-PhCO$_2$Na (100%) y PLL$_{101}$ en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C. Histograma de DLS y función de correlación medidas 1 h después de la formación.

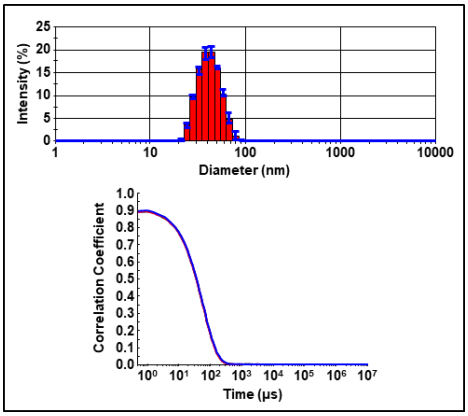


Figura S5.2. Micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-PhCO$_2$Na (80%), 3[G2]-PhCO$_2$Na (20%) y PLL$_{101}$ en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C. Histograma de DLS y función de correlación medidas 1 h después de la formación.

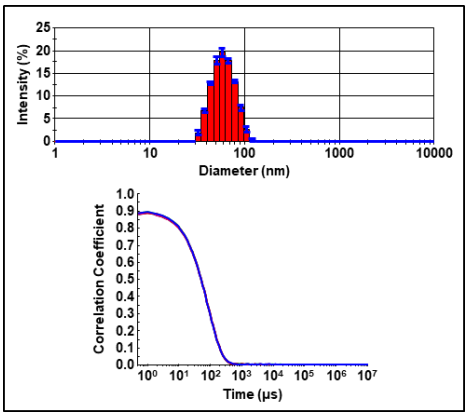


Figura S5.3. Micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-PhCO$_2$Na (60%), 3[G2]-PhCO$_2$Na (40%) y PLL$_{101}$ en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C. Histograma de DLS y función de correlación medidas 1 h después de la formación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

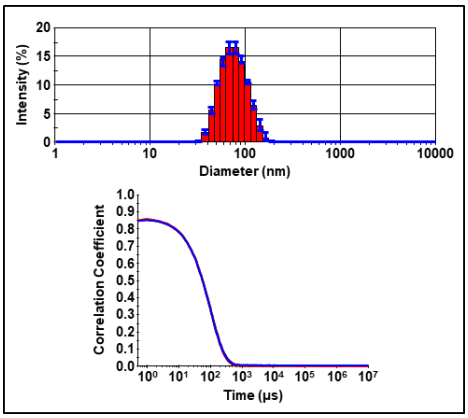


Figura S5.4. Micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (40%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (60%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C. Histograma de DLS y función de correlación medidas 1 h después de la formación.

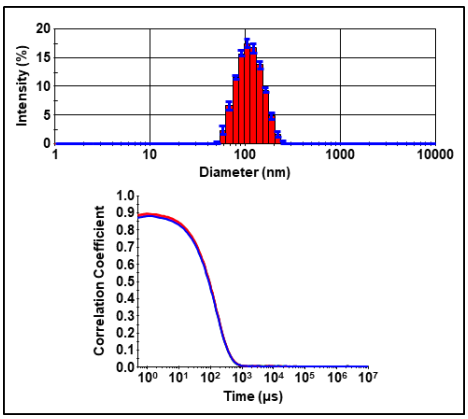


Figura S5.5. Micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (25%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (75%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C. Histograma de DLS y función de correlación medidas 1 h después de la formación.

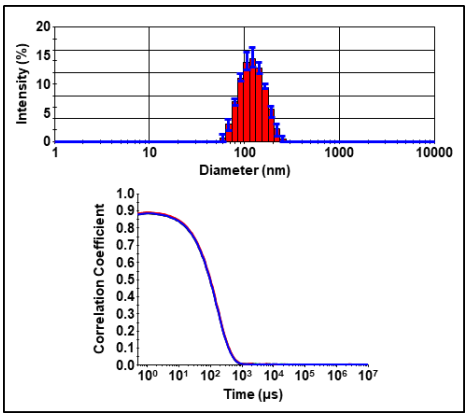


Figura S5.6. Micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (20%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (80%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C. Histograma de DLS y función de correlación medidas 1 h después de la formación.

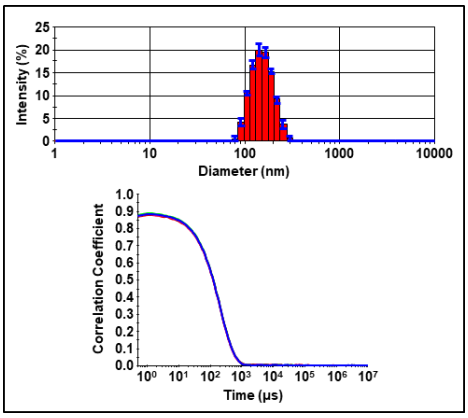


Figura S5.7. Micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (10%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (90%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C. Histograma de DLS y función de correlación medidas 1 h después de la formación.

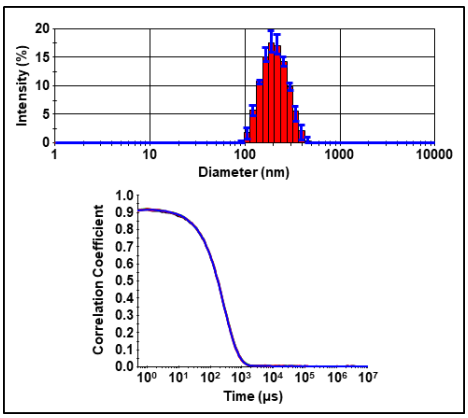


Figura S5.8. Micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (5%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (95%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C. Histograma de DLS y función de correlación medidas 1 h después de la formación.

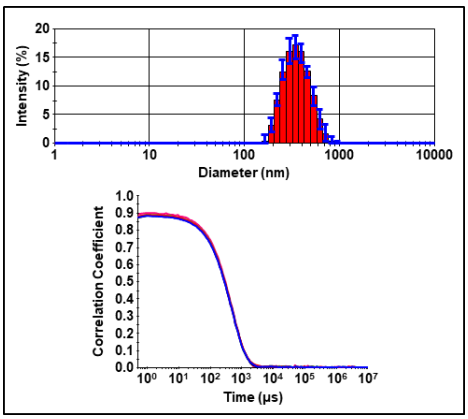


Figura S5.9. Micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (2%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (98%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C. Histograma de DLS y función de correlación medidas 1 h después de la formación.

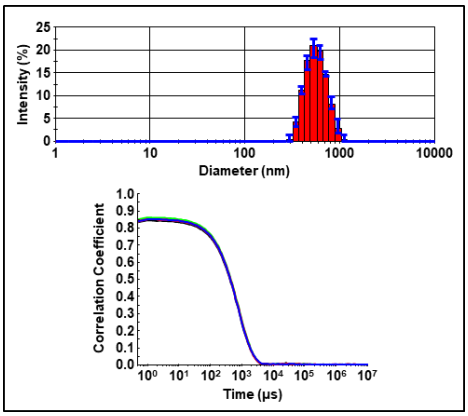


Figura S5.10. Micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (1%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (99%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C. Histograma de DLS y función de correlación medidas 1 h después de la formación.

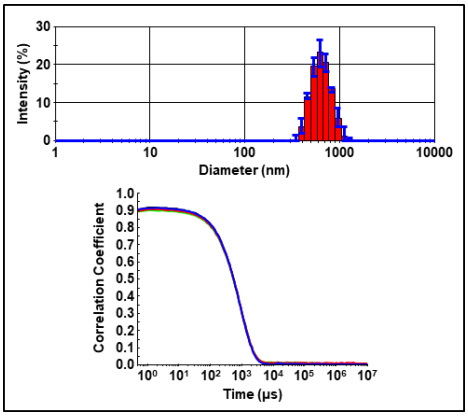


Figura S5.11. Micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (0.75%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (99.25%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C. Histograma de DLS y función de correlación medidas 1 h después de la formación.

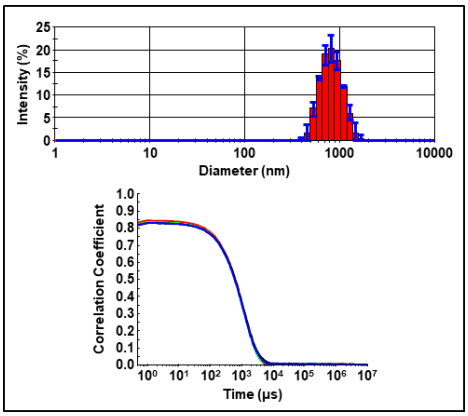


Figura S5.12. Micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (0.5%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (99.5%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C. Histograma de DLS y función de correlación medidas 1 h después de la formación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

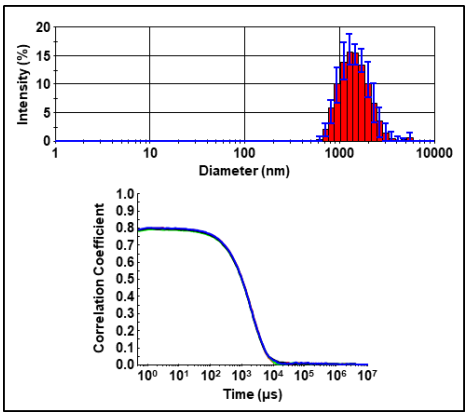


Figura S5.13. Micelas PIC preparadas a partir de FITC-PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (0.5%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (99.5%) y $Cy5\text{-}PLL_{101}$ en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C. Histograma de DLS y función de correlación medidas 1 h después de la formación.

Potencial Z de las micelas PIC

Los valores de potencial Z de las micelas PIC se obtuvieron mediante *laser doppler anemometry* (LDA), midiendo la movilidad electroforética media (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). Las medidas se realizaron en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl (aproximación de Hückel).

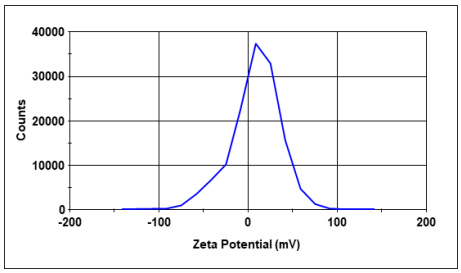


Figura S5.14. Potencial Z de micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (100%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C, aproximación de Hückel.

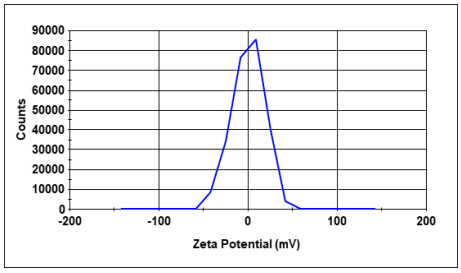


Figura S5.15. Potencial Z de micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (80%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (20%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C, aproximación de Hückel.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

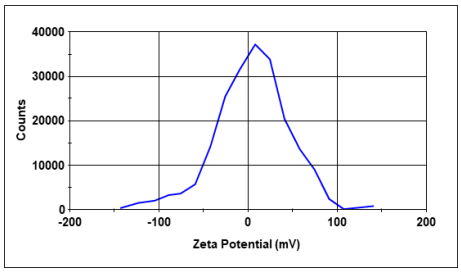


Figura S5.16. Potencial Z de micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (60%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (40%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 ºC, aproximación de Hückel.

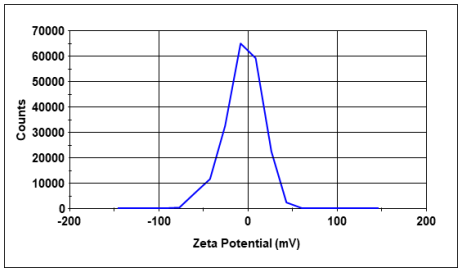


Figura S5.17. Potencial Z de micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (40%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (60%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 ºC, aproximación de Hückel.

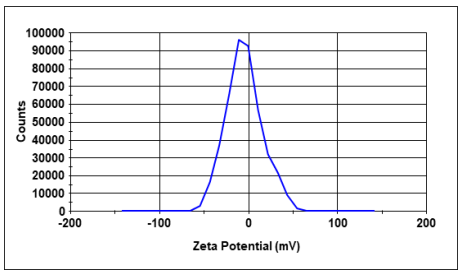
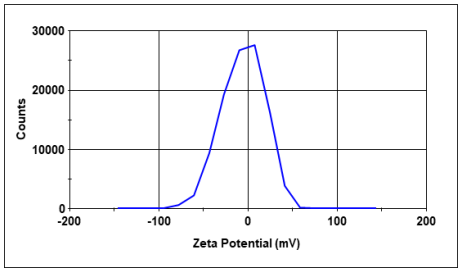


Figura S5.18. Potencial Z de micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (25%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (75%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 ºC, aproximación de Hückel.



USC
TECNOLOGÍA

Figura S5.19. Potencial Z de micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (20%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (80%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 ºC, aproximación de Hückel.

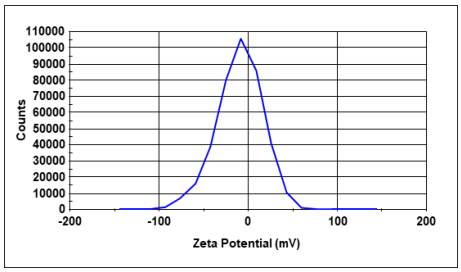


Figura S5.20. Potencial Z de micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (10%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (90%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 ºC, aproximación de Hückel.

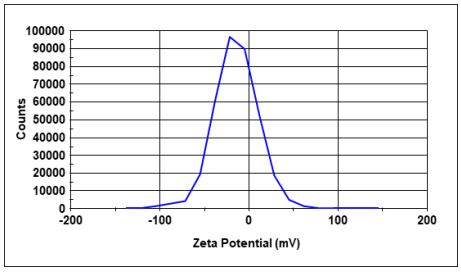


Figura S5.21. Potencial Z de micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (5%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (95%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 ºC, aproximación de Hückel.

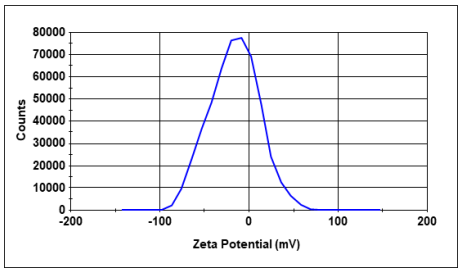


Figura S5.22. Potencial Z de micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (2%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (98%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 ºC, aproximación de Hückel.

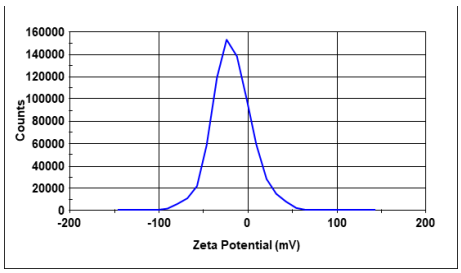


Figura S5.23. Potencial Z de micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (1%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (99%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 ºC, aproximación de Hückel.

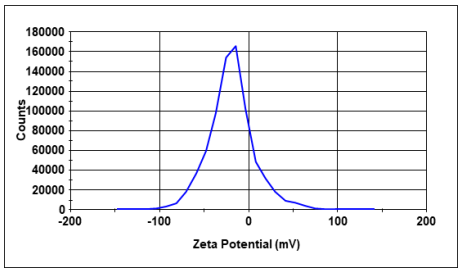


Figura S5.24. Potencial Z de micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (0.75%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (99.25%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C, aproximación de Hückel.

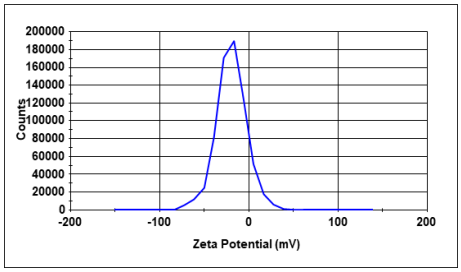


Figura S5.25. Potencial Z de micelas PIC preparadas a partir de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ (0.5%), 3[G2]-$PhCO_2Na$ (99.5%) y PLL_{101} en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 °C, aproximación de Hückel.

Medidas de SLS

Todos los experimentos de *Static Light Scattering* (SLS) realizaron en un espectrómetro 3D DLS (LS Instruments, Suiza) equipado con un láser He-Ne de 20 mW (λ = 632.8 nm). El instrumento realiza dos experimentos simultáneamente y correlaciona ambas señales para suprimir la dispersión múltiple. Las muestras se midieron en tubos cilíndricos de borosilicato de 5 mm a 25 °C durante 10 s, y la función de autocorrelación de segundo orden (G_2 -1) se promedió con 20 medidas diferentes en cada ángulo. El ángulo, θ, se convirtió en el vector de dispersión *q* usando:

$$q = \frac{4\pi\eta}{\lambda}\sin(\theta/2) \qquad \textbf{Ecuación S5.1}$$

G_2 se transformó en la función de autocorrelación de primer orden G_1 utilizando la relación de Siegert:

$$G_2 - 1 = \beta\,|G_1|^2 \qquad \textbf{Ecuación S5.2}$$

Donde β es la intersección de la función de autocorrelación y está relacionada con la cantidad de dispersión múltiple en el sistema, la tasa de decaimiento Γ, se calculó asumiendo un decaimiento exponencial de G_1:

$$G_1 = e^{\Gamma\tau} \qquad \textbf{Ecuación S5.3}$$

Donde τ es el tiempo de retardo y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$$\Gamma = D\, q^2 \qquad \textbf{Ecuación S5.4}$$

Donde D es el coeficiente de difusión que se estima calculando la pendiente de Γ *vs.* q^2.

En las medidas de SLS la muestra, el fondo y el tolueno se midieron 10 veces durante 10 s en cada ángulo, usando tubos de borosilicato de 10 mm en modo de correlación cruzada 3D. El ángulo (θ) se convirtió al vector de dispersión *q* usando la Ecuación S5.1, donde η y λ son el índice de refracción del disolvente (1.33) y la longitud de onda del láser incidente (632.8nm). La relación de Rayleigh en exceso (*R*) se calculó a partir de:

$$R = \frac{I_{sample} - I_{bk}}{I_{tl}} R_T \left(\frac{n}{n_{tl}}\right)^2 \qquad \textbf{Ecuación S5.5}$$

Donde R_T, *n* y n_{tl} son la relación de Rayleigh del tolueno a λ = 632 nm (1.02×10^{-5} cm^{-1}) y, el índice de refracción del agua y el tolueno, respectivamente. Se corrigió la dispersión múltiple usando:

$$R_\beta = R \sqrt{\frac{\beta_{reference}}{\beta_{sample}}} \qquad \textbf{Ecuación S5.6}$$

La constante de contraste para estimar el peso molecular aparente se calculó siguiendo la ecuación S5.7:

$$k = \frac{\left(4\pi n \frac{dn}{dc}\right)^2}{N_A \lambda^4} \qquad \textbf{Ecuación S5.7}$$

Donde *n*, dn/dc y N_A son el índice de refracción del agua, la variación del índice de refracción con la concentración y el número de Avogadro respectivamente. El dn/dc (0.1664 cm^3/g) se obtuvo a partir de la pendiente del índice de refracción frente a la concentración de partículas utilizando un refractómetro diferencial que trabaja a λ = 633 nm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.5. Referencias

[1] Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 15-28.
[2] Tibbitt, M. W.; Dahlman, J. E.; Langer, R. *J. Am. Chem.* Soc. 2016, *138*, 704-717.
[3] Kataoka, K.; Togawa, H.; Harada, A.; Yasugi, K.; Matsumoto, T.; Katayose, S. *Macromolecules* **1996**, *29*, 8556-8557.
[4] Kabanov, A. V.; Bronich, T. K.; Kabanov, V. A.; Yu, K.; Eisenberg, A. *Macromolecules* **1996**, *29*, 6797-6802.
[5] Harada, A.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1995**, *28*, 5294-5299.
[6] Kabanov, A. V.; Vinogradov, S. V.; Suzdaltseva, Y. G.; Alakhov, V. Y. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6*, 639-643.
[7] van der Burgh, S.; de Keizer, A.; Cohen Stuart, M. A. *Langmuir* **2004**, *20*, 1073-1084.
[8] Voets, I. K.; de Keizer, A.; Cohen Stuart, M. A. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *147–148*, 300-318.
[9] Lee, Y.; Kataoka, K. *Soft Matter* **2009**, *5*, 3810-3817.
[10] Maeda, H.; Nakamura, H.; Fang, J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 71-79.
[11] Bae, Y.; Kataoka, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 768-784.
[12] Kim, A.; Miura, Y.; Ishii, T.; Mutaf, O. F.; Nishiyama, N.; Cabral, H.; Kataoka, K. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 446-453.
[13] Naito, M.; Ishii, T.; Matsumoto, A.; Miyata, K.; Miyahara, Y.; Kataoka, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 10751-10755.
[14] Lee, Y.; Ishii, T.; Cabral, H.; Kim, H. J.; Seo, J.-H.; Nishiyama, N.; Oshima, H.; Osada, K.; Kataoka, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 5309-5312.
[15] Fernandez-Villamarin, M.; Sousa-Herves, A.; Porto, S.; Guldris, N.; Martínez-Costas, J.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 2528-2537.
[16] Sousa-Herves, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Chem. Commun.* **2008**, 3136-3138.
[17] Lopez-Blanco, R.; Fernandez-Villamarin, M.; Jatunov, S.; Novoa-Carballal, R.; Fernandez-Megia, E. *Polym. Chem.* **2019**, *10*, 4709-4717.
[18] Capeloa, L.; Yazdi, M.; Zhang, H.; Chen, X.; Nie, Y.; Wagner, E.; Lachelt, U.; Barz, M. *Macromol. Rapid Commun.* **2022**, *43*, 2100698-2100706.
[19] Yoshinaga, N.; Uchida, S.; Dirisala, A.; Naito, M.; Osada, K.; Cabral, H.; Kataoka, K. *J. Control. Release* **2021**, *330*, 317-328.
[20] Magana, J. R.; Sproncken, C. C. M.; Voets, I. K. *Polymers* **2020**, *12*, 1953-1989.
[21] Cabral, H.; Matsumoto, Y.; Mizuno, K.; Chen, Q.; Murakami, M.; Kimura, M.; Terada, Y.; Kano, M. R.; Miyazono, K.; Uesaka, M.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 815-823.
[22] Wu, B.; Huang, W.-Q.; Nie, X.; Zhang, Z.; Chen, G.; Wang, H.-L.; Wang, F.; Ding, S.-G.; Hao, Z.-Y.; You, Y.-Z. *Colloids Interface Sci. Commun.* **2021**, *41*, 100386-100393.
[23] van der Kooij, H. M.; Spruijt, E.; Voets, I. K.; Fokkink, R.; Cohen Stuart, M. A.; van der Gucht, J. *Langmuir* **2012**, *28*, 14180-14191.
[24] Yu, W.; Liu, R.; Zhou, Y.; Gao, H. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 100-116.
[25] Ekladious, I.; Colson, Y. L.; Grinstaff, M. W. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2019**, *18*, 273-294.
[26] Amaral, S. P.; Tawara, M. H.; Fernandez-Villamarin, M.; Borrajo, E.; Martinez-Costas, J.; Vidal, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 5273-5277.
[27] Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
[28] Reinhold, F.; Kolb, U.; Lieberwirth, I.; Gröhn, F. *Langmuir* **2009**, *25*, 1345-1351.
[29] Zetterberg, M. M.; Reijmar, K.; Pränting, M.; Engström, A.; Andersson, D. I.; Edwards, K. *J. Control. Release* **2011**, *156*, 323-328.

[30] Kuntsche, J.; Horst, J. C.; Bunjes, H. *Int. J. Pharm.* **2011**, *417*, 120-137.
[31] Nordström, R.; Zhu, L.; Härmark, J.; Levi-Kalisman, Y.; Koren, E.; Barenholz, Y.; Levinton, G.; Shamrakov, D. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 123-141.
[32] Garcia Alvarez-Coque, M. C.; Medina Hernández, M. J.; Villanueva Camañas, R. M.; Mongay Fernández, C. *Anal. Biochem.* **1989**, *178*, 1-7.
[33] Benson, J. R.; Hare, P. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72*, 619-622.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 4

Gallic acid-triethylene glicol aptadendrimers synthesis, biophysical characterization and cellular evaluation

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad.

Julio Verne

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Gallic Acid–Triethylene Glycol Aptadendrimers Synthesis, Biophysical Characterization and Cellular Evaluation

Adapted from:

André Miranda,[a] Roi Lopez-Blanco,[b] Jéssica Lopes-Nunes,[a] Ana M. Melo,[c,d] Maria Paula Cabral Campello,[e,f] António Paulo,[e,f] Maria Cristina Oliveira,[e,f] Jean-Louis Mergny,[g] Paula A. Oliveira,[h] Eduardo Fernandez-Megia[b] and Carla Cruz[a,i,]

Pharmaceutics **2022**, *14*, 2456-2472.

[a] CICS-UBI—Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6201-506 Covilhã, Portugal.
[b] Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS), Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.
[c] iBB—Institute for Bioengineering and Biosciences, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal.
[d] Associate Laboratory i4HB—Institute for Health and Bioeconomy at Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal.
[e] Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Estrada Nacional 10 (km 139.7), 2695-066 Bobadela, Portugal.
[f] Departamento de Engenharia e Ciências Nucleares, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Estrada Nacional 10 (km 139.7), 2695-066 Bobadela, Portugal.
[g] Laboratoire d'Optique et Biosciences, Ecole Polytechnique, CNRS, INSERM, Institut Polytechnique de Paris, 91128 Palaiseau, France
[h] Centre for Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences (CITAB), Inov4Agro, University of Trás-os-Montes and Alto Douro (UTAD), Quinta de Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal.
[i] Departamento de Química, Universidade da Beira Interior, Rua Marquês de Ávila e Bolama, 6201-001 Covilhã, Portugal.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CAPÍTULO 4. Gallic acid-triethylene glicol aptadendrimers synthesis, biophysical characterization and cellular evaluation

Herein, we describe the synthesis of an aptadendrimer by covalent bioconjugation of a gallic acid–triethylene glycol (GATG) dendrimer with the G-quadruplex (G4) AT11 aptamer (a modified version of AS1411) at the surface. We evaluated the loading and interaction of an acridine orange ligand, termed C_8, that acts as an anticancer drug and binder/stabilizer of the G4 structure of AT11. Dynamic light scattering experiments demonstrated that the aptadendrimer was approximately 3.1 nm in diameter. Both steady-state and time-resolved fluorescence anisotropy evidenced the interaction between the aptadendrimer and C_8. Additionally, we demonstrated that the iodine atom of the C_8 ligand acts as an effective intramolecular quencher in solution, while upon complexation with the aptadendrimer, it adopts a more extended conformation. Docking studies support this conclusion. Release experiments show a delivery of C_8 after 4 h. The aptadendrimers tend to localize in the cytoplasm of various cell lines studied as demonstrated by confocal microscopy. The internalization of the aptadendrimers is not nucleolin-mediated or by passive diffusion, but via endocytosis. MTT studies with prostate cancer cells and non-malignant cells evidenced high cytotoxicity mainly due to the C_8 ligand. The rapid internalization of the aptadendrimers and the fluorescence properties make them attractive for the development of potential nanocarriers.

6.1. Introduction

Cancer is a major public health problem that, unfortunately, is growing worldwide. Prostate cancer, like any other cancer, is a cellular disease caused by the alteration of specific genes or changes in cellular signals that lead to abnormal cell growth and proliferation maturation.[1] Chemotherapy, radiotherapy, and surgery are the preferred therapies; however, off-target activity/reactivity and toxicity are major shortcomings.[2] One of the best ways to address these weaknesses is using drug delivery systems that enhance the tumor targeting, tumor uptake, and internalization of the drug by the tumor cells. Several nanostructures, such as dendrimers, have been used to deliver drugs.[3] Dendrimers are synthetic tree-like macromolecules composed of repetitive layers of branching units that are prepared in a controlled iterative process, through generations with discrete properties.[4] As opposed to classical linear polymers, dendrimers are monodispersed and globular.[5] Their quantized nature allows a degree of control over properties/applications unattainable by linear polymers, which has been coined as the "dendritic effect". In addition, their hydrophobic–hydrophilic character is intrinsically related to the anionic, neutral, or cationic terminal functionalities on the surface.[6] Aptamers have been widely used as promising targeting moieties due to hallmark properties, such as low immunogenicity, easy synthesis, and high specific binding affinity.[7] They can be used to modify drug-loaded nanocarriers for targeted drug delivery. For example, AS1411 is an aptamer formed by a G-rich sequence that can fold into a specific secondary structure, more specifically into a G-quadruplex (G4) conformation.[8,9] The nucleolin (NCL) protein, a tumor biomarker overexpressed in the cancer cell surface, is recognized by AS1411 and its derivatives with high affinity. After binding to NCL, AS1411 can interfere with its oncogenic functions.[10,11] AS1411 has demonstrated an excellent safety profile and

ability to induce durable responses in some patients with intractable cancers. Unfortunately, the suboptimal pharmacology and low potency of AS1411 may limit its future development as it is rapidly cleared out from the body.[10] More promising alternatives to AS1411 include versions with modified nucleobases or backbones (such as AT11, AT11-L0, and AT11-B0) or with modifications at the terminus of sequences (such as AS1411-N6)[12,13] to be used as promising drug delivery platforms due to their safety profile, ability to induce durable responses, and higher drug accumulation in some cancer cells[8,9] due to NCL targeting.[14]

In the current study, we describe an aptamer–dendrimer conjugate (aptadendrimer) composed of a gallic acid–triethylene glycol (GATG) dendrimer (Figure 6.1A,B) of fourth generation[15] functionalized with the AT11 aptamer, a modified version of AS1411, in which one thymine was removed from the bulge (Figure 6.1C).[16,17] We have studied the loading of this aptadendrimer with an acridine orange ligand, termed C_8, that acts as an anticancer drug and binder/stabilizer of the G4 structure of AT11 (Figure 6.1D). The aptadendrimer conjugate with C_8 was characterized in terms of size, charge, and drug release. The cell viability, uptake, and delivery were evaluated into prostate cancer and healthy cell lines. Altogether, our work describes and opens the way for the design and synthesis of aptadendrimers with potential as effective drug delivery systems for cancer therapeutic strategies.

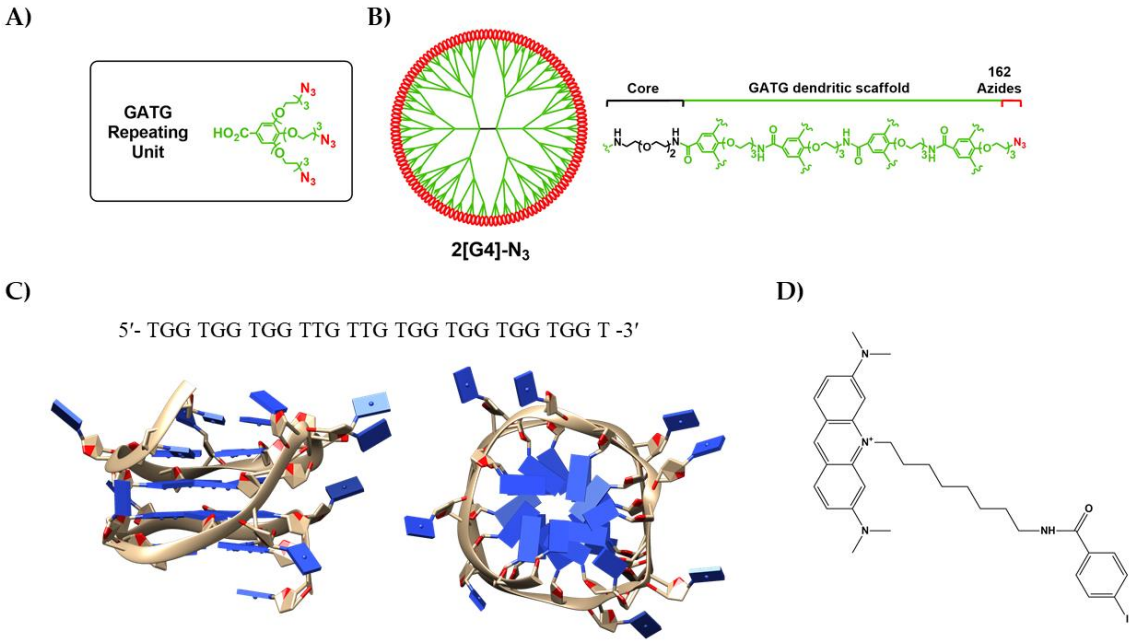


Figure 6.1. (**A**) Chemical structure of the GATG repeating unit. (**B**) 2[G4]-N_3 dendrimer with 162 terminal azides. (**C**) G-rich nucleotide sequence and tridimensional structure of AT11 aptamer (PDB entry 2N3M) and (**D**) chemical structure of 10-(8-(4-iodobenzamide)octyl))-3,6-bis(dimethylamine)acridinium iodide, also known as C_8.

6.2. Materials and Methods

Oligonucleotides and Reagents

AT11 aptamer (5′-TGGTGGTGGTTGTTGTGGTGGTGGTGGT-3′) and AT11-NH_2 modified oligo were purchased lyophilized with double-HPLC grade purification from

Eurogentec (Liège, Belgium). The oligonucleotide concentration was determined using the molar extinction coefficient (ε) provided by the manufacturer and the absorbance at 260 nm. Oligonucleotides were prepared in the buffer according to previously optimized conditions (20 mM phosphate buffer pH = 6.9 supplemented with 65 mM KCl).[18] Solutions were prepared in ultrapure water (18.2 Ω cm^{-1} resistivity), purified with a milli-Q system from Millipore (Burlington, MA, USA). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA) or Fluka, unless otherwise noted. All solvents were HPLC grade, purchased from Scharlab, Sigma-Aldrich, or Acros Organics. Et_3N and DMSO were dried under 4Å molecular sieves. DBCO-PEG_{13}-NHS ester was purchased from Tebu-bio (Le Perray-en-Yvelines, France). Cy5-DBCO was purchased from Lumiprobe (Hannover, Germany). Amicon purifications were performed on Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit MWCO 3 kDa (Sigma-Aldrich, USA). The acridine orange derivative 10-(8-(4-iodobenzamide)octyl))-3,6-bis(dimethylamine) acridinium iodide (C_8) was synthesized as described elsewhere[19] and dissolved in DMSO at a final concentration of 10 mM. Subsequent dilutions were made with working buffer or cell culture medium. The cells PC-3 (CRL-1435™) and DU-145 (HTB-81™) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and PNT1A (catalogue number 95012614) were purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Wiltshire, UK).

Synthesis of 2[G4]-N_3 Dendrimer

The repeating unit of GATG dendrimers (Figure 6.1A) was synthesized according to our previous describe work using an efficient, safe (green chemistry principles), and cost-effective synthetic route of 4 steps.[20] This repeating unit was employed for the divergent synthesis of dendrimers as previously reported.[21] Briefly, the GATG repeating unit was firstly treated with hydroxybenzotriazole (HOBt) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) to promote the coupling of two repeating units to a 2,2′-(ethylenedioxy)bis(ethylamine) linker and produce 2[G1]-N_3, a dendrimer of first generation with 6 terminal azides. After the reduction of the azides with triphenylphosphine (Ph_3P), via the Staudinger reaction, the resulting terminal amines were again reacted with a second layer of repeating units, and these steps were repeated until the dendrimer achieved the fourth-generation 2[G4]-N_3 with 162 terminal azides (Figure 6.1B).

Aptadendrimer Synthesis: Surface Functionalization of 2[G4]-N_3 with AT11 Aptamer and Fluorophore Labelling

The bioconjugation process of the aptamer to the 2[G4]-N_3 dendrimer was carried out in two phases. Both steps are described in detail in the Supporting Information. First, the AT11 aptamer, modified with an NH_2 group, was functionalized with a DBCO-PEG_{13}-NHS ester (Figure 6.2A). The long PEG_{13} linker was selected to increase the distance between the dendrimer and the aptamer and, thus, to reduce possible electrostatic repulsions between aptamers. The dibenzocyclooctyne (DBCO) was chosen as a chemical handle for the subsequent bioconjugation step between the dendrimer and AT11-PEG_{13}-DBCO by means of a strain-promoted azide–alkyne cycloaddition (SPAAC)[22-24] (Figure 6.2B). The reaction progress of the SPAAC was monitored by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Finally, the aptadendrimer was labelled with a Cy5-DBCO fluorophore to allow its visualization in confocal microscopy experiments. (Figure 6.2B).

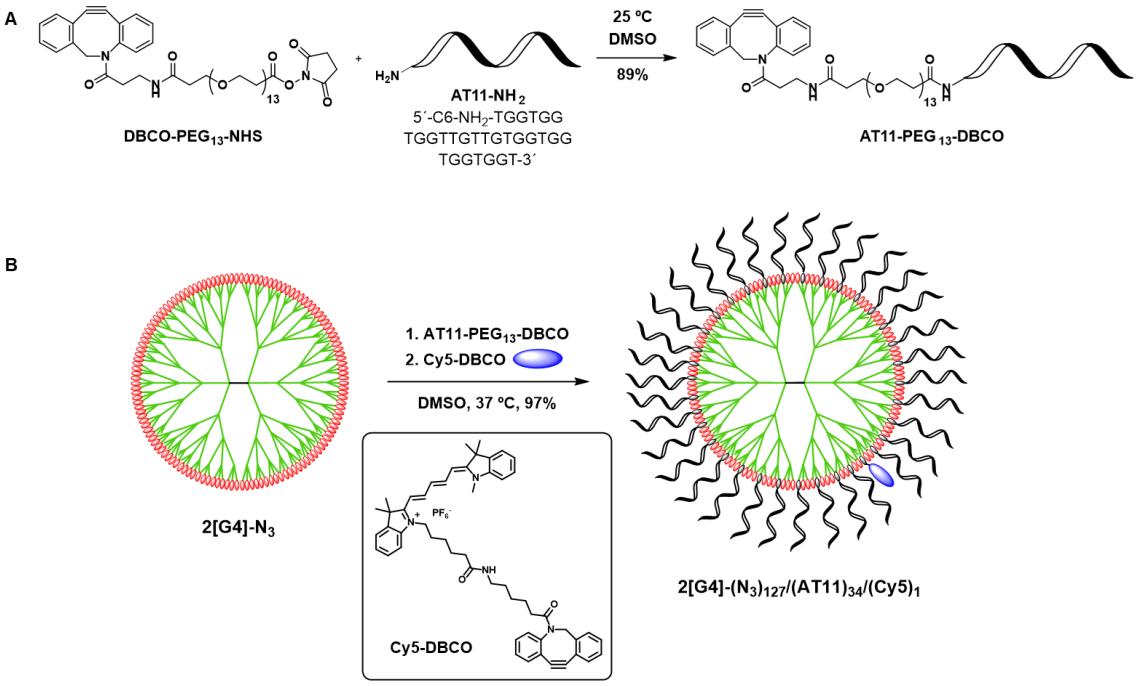


Figure 6.2. Surface functionalization of 2[G4]-N_3 dendrimer with AT11 aptamer and fluorophore labelling. (**A**) Functionalization of AT11 with a DBCO cyclooctyne and (**B**) AT11 bioconjugation on dendrimer surface by SPAAC.

Aptadendrimer Characterization

Dynamic light scattering (DLS) measurements were performed on a Malvern Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK), operating at 633 nm with a 173° scattering angle, at 25 °C. DLS mean diameters were obtained from the volume particle size distribution provided by the Malvern Zetasizer Software. DLS histograms were obtained from the volume particle size distributions. Z-potential values were obtained by laser Doppler anemometry (LDA), measuring the mean electrophoretic mobility (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments).

UV-Vis spectra were recorded on a Jasco V-630 (Tokyo, Japan) and circular dichroism (CD) measurements on a Jasco J-720 (Tokyo, Japan; 100 nm/min of scanning speed ranging from 200 to 400 nm and signal-averaged over three scans). Fluorescence spectra were recorded using a quartz suprasil cuvette (Hellma, Müllheim, Germany) on a Horiba Jobin-Yvon Fluoromax-3 (Tokyo, Japan) coupled to a Wavelength Electronics LFI-3751 temperature controller (excitation wavelength 646 nm, emission acquired from 650 to 800 nm, 20 °C).

Molecular Docking

The three-dimensional structure of the AT11 aptamer was downloaded from the PDB database (https://www.rcsb.org/, accessed on 5 February 2022; PDB entry 2N3M). The dock preparation (DockPrep tool), the assignment of Gasteiger charges and polar hydrogens for G4 nucleic acid were performed using Chimera 1.16. Docking experiments were carried out by the AutoDock 4.2 program using the Lamarckian genetic algorithm (25 runs in an initial population of 150 random individuals, a maximum number of evaluations of 2.5×10^6, rate of mutation and crossover of 0.02 and 0.8 and, finally, elitism value of 1). Using a box (125 × 125 × 125 Å along the x, y,

and z axes) with a grid spacing of 0.6 Å, the AT11 structure was centered and left rigid while the ligand was allowed full flexibility. Additionally, the same protocol was applied to understand the interaction between the C_8 ligand and the GATG repeating unit.

Loading Efficiency Determination

The loading efficiency of the C_8 ligand by the aptadendrimers was determined, based on the amount of C_8 entrapped, using Equation (6.1).

$$\text{Loading efficiency} = \frac{[\text{Amount of } C_8 \text{ added} - \text{Amount of free } C_8]}{\text{Amount of } C_8 \text{ added}} \qquad \text{Equation 6.1}$$

Briefly, the aptadendrimer (10 μM of aptamer) was incubated with C_8 (1 μM) under constant stirring using a Hula Mixer Sample Mixer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The measurements of the amount of C_8 were based on the fluorescence intensity of the ligand in the supernatant and following centrifugation at 3000× g for 15 min using a Vivaspin 2 kDa (Sartorius, Gottingen, Germany) in the flowthrough. For fluorescence measurements, a high-precision 3 mm × 3 mm cell (Hellma Analytics, Jena, Germany) was used in a Horiba FluoroMax4 fluorometer (Kyoto, Japan) using suitable excitation and emission wavelengths (492 and 526 nm, respectively). The wavelengths were determined after excitation and emission spectra in a fluorometer.

Drug Release

The C_8 release profile of aptadendrimer was studied applying the method reported by Carvalho *et al*.[25] Using a Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Device with a 3.5 kDa of molecular cut-off (Thermo Fisher Scientific, USA), 100 μL of aptadendrimer/C_8 complex was added and dialysis was performed in 1 mL of the final volume of buffer solution under constant stirring using an HulaMixer Sample Mixer (Thermo Fisher Scientific, USA). Samples were collected from the bottom tube (100 μL) along the time window, and buffer was added to the dialysis medium in order to maintain constant volume during the experiment. The released C_8 content was quantified by measuring the fluorescence of the samples using a high-precision 3 mm × 3 mm cell (Hellma Analytics, Germany) in a Horiba FluoroMax4 fluorometer (Kyoto, Japan) using suitable excitation and emission wavelengths (492 and 526 nm, respectively).

Steady-State Fluorescence Intensity and Anisotropy Measurements

Steady-state fluorescence experiments were performed in a Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3-22 (Tokyo, Japan) spectrofluorometer using 0.5 cm × 0.5 cm quartz cuvettes (Hellma Analytics, Germany) at room temperature. The emission spectra of 0.5 μM C_8 in buffer and upon incubation with increasing aptadendrimer concentrations were recorded with excitation at 488 nm with 2 and 4 nm slits in the excitation and emission, respectively.

For fluorescence anisotropy experiments, the samples were excited at 488 nm and the polarized emission was recorded at 520 nm using 5 and 10 nm slits in the excitation and emission, respectively. The steady-state fluorescence anisotropy, $\langle r \rangle$, was calculated using Equation (6.2) as previously described:[26]

$$\langle r \rangle = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot G \cdot I_{VH}} \qquad \text{Equation 6.2}$$

where I_{VV} and I_{VH} are the intensities of the vertically and horizontally polarized fluorescence emission upon excitation with vertically polarized light, respectively. The G factor ($G = I_{HV}/I_{HH}$, with horizontal excitation components) accounts for the monochromator transmission efficiency to the polarization of the light. Data are shown as mean ± standard deviation of 10 measurements.

Time-Resolved Fluorescence Intensity and Anisotropy Measurements

Time-resolved fluorescence experiments were carried out by the single-photon-timing technique as previously described.[27,28] The samples were excited at 488 nm using a BDS-SM-488FBE pulsed picosecond diode laser from Becker & Hickl (Berlin, Germany), and the fluorescence emission was recorded at 520 nm. The fluorescence intensity decays, $I(t)$, were collected with the emission polarizer set at the magical angle regarding the vertically polarized excitation beam. For anisotropy decays, the parallel and perpendicular polarized components of the fluorescence–$I_{VV}(t)$ and $I_{VH}(t)$, respectively–to the plane of the excitation beam were alternatively recorded. The instrument response function (IRF) was obtained from the excitation light scattered by a Ludox solution (silica, colloidal water solution, Sigma-Aldrich).

The decays were analyzed using the TRFA Data Processer Advanced (version 1.4) from the Scientific Software Technologies Centre (Belarusian State University, Minsk, Belarus) as previously detailed.[27,28] The reduced χ2 value (<1.3) and the random distribution of weighted residuals/autocorrelation plots were used to evaluate the goodness of the analysis.

Fluorescence intensity decays were analyzed using a sum of discrete exponential terms:[26]

$$I(t) = \sum_{i=1}^{n} \alpha_i \, exp(-t/\tau_i) \qquad \text{Equation 6.3}$$

here α_i and τ_i are the pre-exponential (amplitude) and the lifetime of the *i*th decay component of fluorescence, respectively. The amplitude-weighted mean fluorescence lifetime, $\langle \tau \rangle$, was then calculated according to:

$$\langle \tau \rangle = \sum_{i=1}^{n} \alpha_i \, \tau_i \qquad \text{Equation 6.4}$$

The fluorescence anisotropy decays, $r(t)$, were analyzed by a sum of discrete exponential terms as previously described:[26]

$$r(t) = \sum_{i=1}^{n} \beta_i \exp(-t/\phi_i) \qquad \text{Equation 6.5}$$

where β_i and ϕ_i stand for the normalized amplitude and the rotational correlation time of the *i*th anisotropy decay component, respectively.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cellular Uptake of Aptadendrimers

PNT1A, DU-145, and PC-3 cell lines were seeded in Ibidi 8-well μ-slides (IBIDI, Gräfelfing, Germany) at a final concentration of 1 × 10^5 cells/well. After 24 h for adhesion, the cells were incubated with aptadendrimers (0.1 μM) and aptadendrimers/C_8 complexes (0.1 μM and 0.33 μM, respectively) for 1 h. In the uptake mechanism experiment, the cells and all solutions were pre-incubated at 4 °C. Then, they were washed three times with PBS 1×, stained with 1 μM nuclear probe Hoechst 33342 for 15 min, and over again washed with PBS 1×. Images were acquired using a confocal laser scanning microscope (CLSM; Zeiss AxioObserver LSM 710, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a plane-apochromatic 63×/DIC objective and lasers (405, 488, 561 and 663 nm). All the images were processed with Zeiss ZEN Black software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Cytotoxic Studies of Aptadendrimers

The cytotoxicity of the aptadendrimer, C_8-loaded aptadendrimer, AT11 aptamer, and AT11-C_8 was evaluated in PNT1A, PC-3, and DU-145 cell lines by the MTT assay. The cells were seeded in 96-well plates (2 × 10^4 cells/mL) and after 24 h for cell adhesion, they were treated with different concentrations of aptadendrimers and complexes for 72 h. In IC_{50} experiments, the C_8 ligand was successively diluted (from 3.12 μM to 0.024 μM). The wells containing untreated cells were used as control. Then, fresh media containing 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide salt (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added, followed by further incubation at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% of CO_2 for 4 h. Formazan crystals were dissolved in DMSO, and their absorbance was recorded at 570 nm using a BioRad×Mark™ microplate reader(BioRad, Hercules, CA, USA). The cell viability percentages of different treatments were calculated by considering the absorbance of the control as 100% viability. Cell viability was expressed as mean ± SD from at least three different plates with each condition tested in quadruplicate wells. GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA) was used for data treatment.

6.3. Results and Discussion

For the preparation of the aptadendrimer, we selected a fourth-generation dendrimer of the GATG family, herein referred to as 2[G4]-N_3 (Figure 6.1B), previously described by some of us.[21] GATG dendrimers are composed of a gallic acid core, responsible for the multivalency, and long triethylene glycol spacer arms that give flexibility to the dendritic structure. They have been exploited for the preparation of drug[29,30] and gene delivery[31] systems, and the construction of monodisperse nanotools to modulate the complex mechanisms governing multivalent interactions.[32-35] 2[G4]-N_3, which is prepared divergently from a triethylene glycol diamine core and the GATG repeating unit (Figure 6.1A), carries 162 terminal azides that we have used for the bioconjugation of the AT11 aptamer by means of the strain-promoted azide–alkyne cycloaddition (SPAAC).[22-24]

With this aim, AT11-NH_2 (a version of AT11 with a terminal amino group) was first functionalized with a dibenzocyclooctyne (DBCO) using an active ester equipped with a long PEG_{13} linker (DBCO-PEG_{13}-NHS, DMSO, 25 °C). The long PEG-based linker was chosen over a long carbon spacer to increase the distance between the dendrimer

and the aptamer and consequently, the flexibility of the aptadendrimer (Figure 6.2A). Additionally, the PEG polymer coating has the advantage improving the biophysical and chemical properties of nanoparticles (such as high hydrophilicity, spatial repulsion, and electrical neutrality) that resulted in higher biocompatibility and blood circulation half-life.[36] Additionally, some therapeutical approaches using PEGylation have already been approved by the Food and Drug Administration of the USA.[36] Despite these positive points, PEG conjugation can present some drawbacks and limitations as adverse side effects caused by the polymer itself or by side products formed during synthesis, unexpected changes in the pharmacokinetic behavior and non-biodegradability of PEG.[37] After purification by dialysis, AT11-PEG_{13}-DBCO was obtained in 89% yield. The complete functionalization of AT11 with DBCO was confirmed by UV-Vis (Figure S6.1) based on their characteristic absorptions at 280 and 309 nm, as described in the Supporting Information.

The subsequent SPAAC bioconjugation of AT11-PEG_{13}-DBCO to 2[G4]-N_3 was performed in DMSO at 37 ºC (Figure 6.2B). Monitoring of the reaction progress was carried out by PAGE until no free aptamer was detected (Figure S6.2). Several loadings of AT11 aptamer per dendrimer were tested, namely 8, 17, and 34. Since, for the lower loadings, some aptadendrimer aggregation was observed, a loading of 34 was defined for this initial exploration of the aptadendrimer properties and activity. After completion of the AT11 bioconjugation, the aptadendrimer was labelled with a cyanine-5 (Cy5) fluorophore also using a SPAAC. After purification by ultrafiltration (Amicon) to remove any potential unreacted Cy5, 2[G4]-$(N_3)_{127}$/$(AT11)_{34}$/$(Cy5)_1$ was obtained in 97% yield. In this conjugate, a Cy5 loading of 1 was determined by UV-Vis (Figure S6.3) and checked by fluorescence spectroscopy (Figure S6.4), as described in the Supporting Information.

Once the synthesis of the aptadendrimer had been performed, we checked the G4 formation of AT11 conjugated on the dendrimer surface by CD spectroscopy (Figure S6.5). The results showed a characteristic profile of parallel G4 topology (positive and negative bands at 260 and 240 nm, respectively) as previously reported for this aptamer.[11] In addition, it was possible to observe an extra band around 280 nm, a chirality signal that can be explained by the conjugation of AT11 with the PEG_{13} spacer and the dendrimer. This band is attributed to the π-π* transition of the carbonyl groups of the GATG repeating unit that was embedded in a chiral entity becoming CD active[38,39] or can be explained by conjugation with the dendrimer that alters the secondary structure of AT11.

To evaluate if the aptadendrimer can benefit from the enhanced permeability and retention (EPR) effect, we performed a dynamic light scattering (DLS) assay to evaluate its size. The aptadendrimer exhibited a mean particle size of 3.1 nm (Figure S6.6), which is in accordance with the reference values.[40-42] In addition, this nanosize is suitable for cellular internalization (≤100 nm). Additionally, the surface charge of aptadendrimer was measured. A zeta potential of −22.2 mV was revealed for the aptadendrimer, an anionic character with a value in line with others previously described for G4 aptamer-based nanoparticles[43] and the charge adopted by G4 *vs.* duplex DNA.[44] The negative zeta potential of the aptadendrimer confirms the incorporation of AT11 (highly negative because of the phosphate groups) on the surface of the dendrimer, which is a neutral macromolecule (no charge on the surface

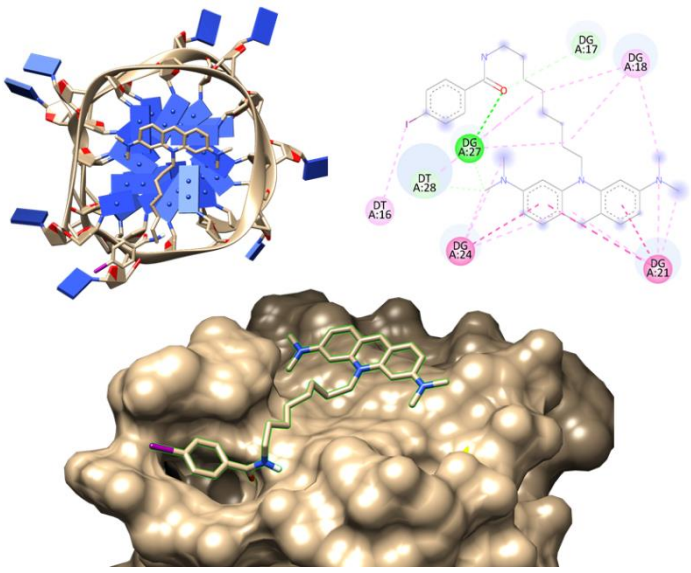
of 2[G4]-N_3). Not unexpectedly, the data obtained are in agreement with that for Au nanoparticles functionalized with aptamers.[43]

Next, we evaluated the binding mode and interactions between the acridine orange ligand C_8 and AT11 aptamer by molecular docking. C_8 was chosen not only because of its promising anticancer effects,[18,25,45,46] but also because it binds NCL-targeted aptamers and can potentially stabilize G4 structures. A previous report showed that interactions among the C_8 ligand and G4 structures are mainly end-stacking interactions between the planar acridine moiety and the top and bottom G-quartets,[47] resulting in the stabilization of G4 as evidenced by the thermal stability increase.[45,46,48-50]

However, the free C_8 ligand has a high toxicity in both malignant and normal cell lines.[25,43] For the molecular docking experiments, we used the tridimensional structure of AT11 previously determined by Do *et al.*[11] and deposited in the Protein Data Bank (PDB entry 2N3M). As expected, the results depicted in Figure 6.3 showed that C_8 interacts via π-π stacking with the tetrad (G18-G21-G24; π-π interactions). This can be explained by the planar nature of the acridine moiety that favors these interactions and the protonated nitrogen atoms that are placed near the central carbonyl groups in the G-tetrads. Additionally, it was observed the interaction of the ligand alkyl linker with the groove (G17-G27-T16-T28). Molecular docking simulations carried out between C_8 and the GATG repeating unit also confirmed contacts between the acridine scaffold and the gallic acid core of the dendritic structure (Figure S6.7).

Following this, the aptadendrimer encapsulating C_8 was prepared and characterized. There were no significant changes in size and zeta potential between the unloaded and C_8-loaded aptadendrimers, suggesting that the nanoparticle maintained the structure.

To analyze the loading efficiency of the aptadendrimer with C_8, we incubated C_8 with the aptadendrimer and the fluorescence of free C_8 (Figure S6.8) in the mixture was measured before and after centrifugation (Figure S6.9).[25] A percentage of C_8-loaded aptadendrimer around 98% was revealed through Equation (6.1).



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 6.3. Molecular docking simulation of AT11 aptamer with C_8. The image depicts the lowest binding free energy complex and the interactions with nucleotide residues.

The C_8 association to aptadendrimer was also monitored by both steady-state and time-resolved fluorescence and anisotropy measurements. The variation in the C_8 fluorescence intensity and the amplitude-weighted mean fluorescence lifetime, $\langle\tau\rangle$, upon complexation with aptadendrimers are shown in Figure 6.4A,B, respectively. Notably, the fluorescence intensity increased more than 20-fold and the $\langle\tau\rangle$ enhanced from 0.86 ns in the buffer to 4.05 ns upon C_8 binding to the aptadendrimers, supporting that C_8 fluorescence in the buffer is severely quenched. Considering the C_8 structure (Figure 6.1D), the iodine atom acts as an effective intramolecular quencher of the conjugated dye in an aqueous solution due to the heavy atom effect; upon its binding to the aptadendrimer, C_8 must adopt a more extended conformation that prevents the iodine quencher effect.

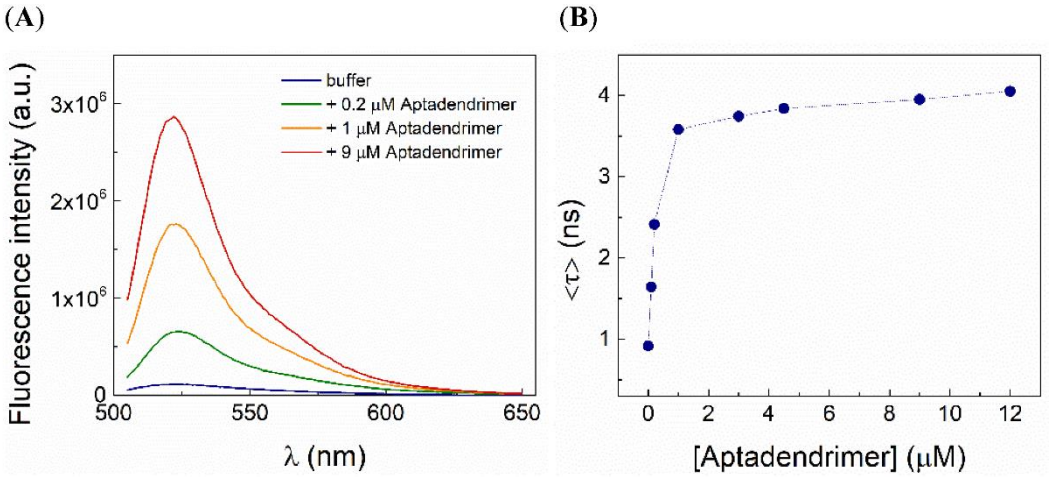


Figure 6.4. C_8 fluorescence is severely quenched in the buffer. Variations in (**A**) fluorescence emission spectra and (**B**) the amplitude-weighted mean fluorescence lifetime of 0.5 μM C_8 with increasing concentrations of aptadendrimer.

To further confirm the C_8-aptadendrimer complex formation, fluorescence anisotropy experiments were also carried out. A relatively high steady-state fluorescence anisotropy in buffer was obtained for a small fluorophore ($\langle r\rangle$ = 0.062 + 0.006), which is explained in part by the short fluorescence lifetime of C_8 in an aqueous solution. Remarkably, upon increasing the aptadendrimer concentration, the anisotropy of C_8 steadily augmented until attaining a plateau at $\langle r\rangle$~0.20 + 0.001 (Figure 6.5A). These data reveal that the hydrodynamic volume of C_8 increased in the presence of the aptadendrimer, confirming its complexation and the slowing down of the overall rotational tumbling of the complex during its fluorescence lifetime. Moreover, time-resolved fluorescence anisotropy experiments further confirmed the C_8 complexation. Indeed, the fluorescence anisotropy decay of C_8 was greatly affected by the addition of the aptadendrimer (Figure 6.5B). First, the fast rotational correlation time (ϕ_1) of C_8 was enhanced upon complexation towards 1.4 ns, which reflects the segmental motion of C_8 bound to the PEG_{13}-AT11 in the dendrimer. Moreover, the longer rotational correlation time (ϕ_2), assigned to the overall rotational motion, increased significantly from 0.14 ns for C_8 in solution to 10–12 ns upon binding to the aptadendrimer. Altogether, our results clearly show that C_8 binds to the aptadendrimer.

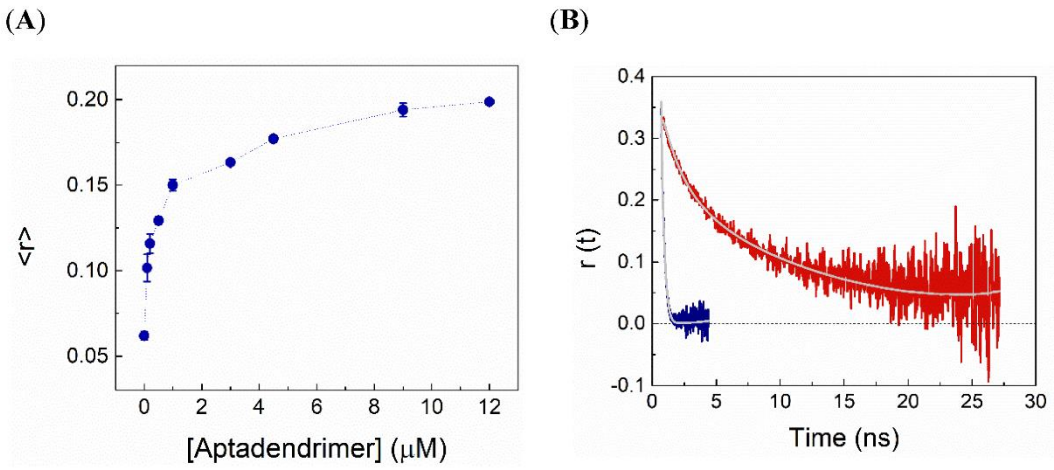


Figure 6.5. C_8 binding to the aptadendrimer. (**A**) Changes in the steady-state fluorescence anisotropy of 0.5 μM C_8 with increasing aptadendrimer concentrations. (**B**) Fluorescence anisotropy decays of 0.5 μM C_8 in buffer (blue) and in the presence of 9 μM of aptadendrimer (red). The rotational correlation times increased upon complexation denoting the changes in the segmental motion of bound C_8 (ϕ_1 from ~0.01 to 1.5 ns) and it is slower global tumbling upon binding to the large dendrimers (ϕ_2 increased from 0.15 to 10–12 ns).

The release profile of C_8 from the aptadendrimer complex (Figure 6.6) was evaluated in 20 mM KPi (pH = 6.9) supplemented with 65 mM KCl for 48 h, with samples collected at different time points. The results evidenced that the release is fast and most noticeable after 4 h and it has a maximum cumulative release profile at 12 h.

Next, we performed *in vitro* studies to access the cellular internalization and viability of the aptadendrimer in two prostate cancer cell lines (PC-3 and DU-145) and one non-malignant cell line (PNT1A). The cell viability was determined by the MTT assay after incubation of the AT11, C_8-AT11 complex, aptadendrimer, and C_8-aptadendrimer complex for 3 days. The results are presented in Figure 6.7.

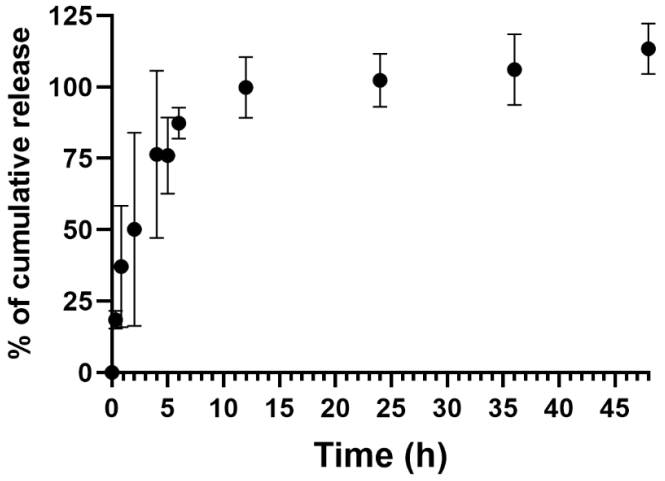


Figure 6.6. Cumulative release profile of C_8 from the C_8–aptadendrimer complex. The experiment was performed in 20 mM KPi (pH = 6.9) supplemented with 65 mM KCl for 48 h (n=3).

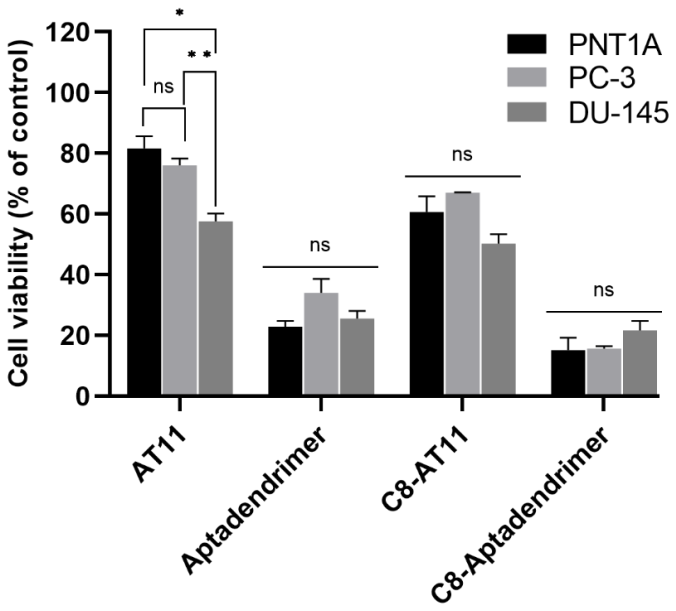


Figure 6.7. Histograms of cell viability of PNT1A, PC-3 and DU-145 cells after incubation with AT11 (6.6 μM), C_8-AT11 (6.6 μM AT11 + 0.66 μM C_8), aptadendrimer (0.2 μM) and C_8-aptadendrimer (0.2 μM aptadendrimer + 0.66 μM C_8) for 3 days. Results are presented in percentage normalized regarding control. Statistical analysis (One-way ANOVA) was performed using GraphPad Prism software: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns—not significant ($p > 0.05$). Complementary statistical analysis among all conditions in different cell lines are presented in Table S6.1.

Free AT11 elicited only a minor effect on the viability of both PC-3 and PNT1A cells (80% of mean viability) and 58% on the viability of DU-145 cells, in which DU-145 and PC-3 were both androgen-independent with moderate and high metastatic potential, respectively.[51] On the other hand, free C_8 reduced the viability of all cell lines (Figure S6.10), showing a non-selective cytotoxic effect, as previously seen.[43,49]

The aptadendrimer presented higher cytotoxicity than free AT11 in all cell lines. Indeed, incubation of the aptadendrimer (at the same concentration of AT11 as above) for 3 days dramatically increased its toxicity by 3.56 times for PNT1A, and 2.23 and 2.25 times for PC-3 and DU-145 cells (ratios among the viabilities of free AT11 and aptadendrimer), respectively (Figure 6.7). The cell viability decreased to *ca.* 23% for PNT1A, 34% for PC-3, and 26% for DU-145 cells. Regarding C_8–aptadendrimer, after 3 days, it caused a *ca.* 15%, 16%, and 22% reduction in viability of PNT1A, PC-3, and DU-145 cells, respectively. The similar toxicity for both cancer and non-malignant cells points to a lack of selectivity for the aptadendrimer to deliver C_8 to the target cancer cells.

In order to evaluate the uptake, we treated the cancerous and the non-malignant cell lines with the aptadendrimer and C_8–aptadendrimer complex labelled with Cy5 and recorded images using a confocal laser scanning microscope (CLSM). Firstly, we performed a live imaging of the aptadendrimer over 1 h in PC-3 and PNT1A cells (Figures S6.11 and S6.12). The results evidenced a fast internalization of the aptadendrimer. It was not possible to observe colocalization of the aptadendrimer with an NCL antibody in both cell lines, suggesting that internalization is not actively mediated by cell surface NCL. In a previous report, we showed that free Cy5-AT11 and

C_8-AT11 were able to colocalize NCL in HeLa cancer cells and that the complex remained stable during cell trafficking, while free C_8 localized with nucleoli.[18] To clarify the cellular uptake mechanism of the aptadendrimer, we incubated the cells with aptadendrimer at a low temperature (4 °C). At lower temperatures, cells reduced their metabolism, and the membrane increased rigidity and blocked energy-dependent uptake and passive diffusion.[52] The passive diffusion mechanism is predominantly limited to small, uncharged molecules that travel down concentration gradients. Our results (Figure S6.13) evidenced the absence of an aptadendrimer fluorescence signal for both cell lines at low temperatures. Of note, incubation at 4 °C also influenced Hoechst migration and, consequently, the labeling of nuclei. This result demonstrates that the uptake mechanism is not based on passive transport but rather on another pathway. Usually, the cellular uptake of nanocarriers requires endocytosis.[53] In the specific case of dendrimer nanocarriers, it is extensively described that internalization can occur through different endocytic routes.[54-58] We propose that in this case, internalization proceeds via endocytosis through an NCL-independent way. We can infer that the uptake mechanism can be intrinsically related to the high toxicity of aptadendrimers in both cell lines. Previous studies suggested that endocytosis pathways can be identified by the combination of different inhibitors, endocytic markers and genetic approaches.[59] Nevertheless, there is a possibility of side effects, upregulation of compensatory mechanisms and their effect can vary between different cell lines.[59]

Subsequently, whether the conjugation of the C_8 ligand with the aptadendrimer influences the internalization process was analyzed. For this, cell lines were incubated for 1 h with the C_8–aptadendrimer complex and after, imaged by CLSM. According to Figure 6.8, it is possible to claim that the aptadendrimer internalizes differently than free AT11 and that it is localized in the cytoplasm of the cells, demonstrating that the association of C_8 to the aptadendrimer did not affect the internalization and uptake into the cells.

Considering that the lysosomal escape of nanoparticles is a crucial parameter for an efficient intracellular delivery,[60] we decided to analyze the capacity of the developed aptadendrimer to escape from the lysosomal compartmentalization in PC-3 and PNT1A cells. From CLSM and using the LysoView 540 probe to stain lysosomes, we observed that PC-3 cells seemed to easily internalize the aptadendrimer and presented a higher fluorescence intensity than PNT1A (Figure S6.14). Regarding colocalization coefficients (Table S6.2), they were similar and relatively high, which could indicate that the aptadendrimer was unable to escape lysosome degradation in both cell lines. Although, the free aptadendrimer that did not colocalize with LysoView 540 (in both cell lines) could influence the similar results in the cell viability after aptadendrimer treatment. The colocalization of the aptadendrimer with the lysosomal marker corroborates the previous experiments where we confirmed that the passive diffusion mechanism is not the uptake route for aptadendrimer internalization. A recent study conducted by Moreno-Echeverr *et al*. summarizes a detailed experimental protocol for sample preparation, staining and imaging to improve the reproducibility of nanoparticles' colocalization with lysosomes.[61]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

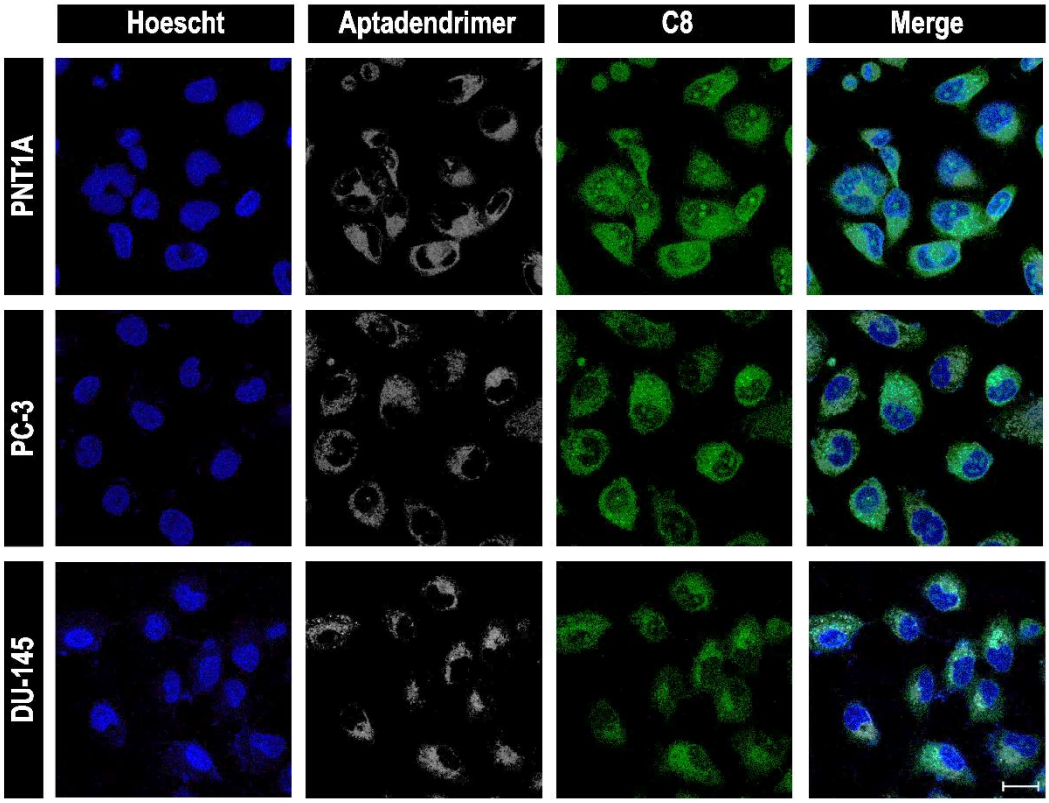


Figure 6.8. Confocal laser scanning microscopy of prostate cells (PNT1A, PC-3, and DU-145) incubated 1 h with the C_8–aptadendrimer complex. Results evidenced that the aptadendrimer and C_8–aptadendrimer complex is able to enter into all cell lines. Additionally, colocalization among the aptadendrimer and C_8 was observed which demonstrates the formation of a complex *in cellulo*. Cy5-labelled aptadendrimer is represented as a white signal and the C_8 ligand as green fluorescence. Cell nuclei are stained with Hoechst 33342 (blue signal). Scale bar: 20 µm.

6.4. Conclusions

This study reports the synthesis of an aptadendrimer, a fourth-generation GATG dendrimer functionalized on the surface with 34 copies of the AT11 aptamer loading the acridine orange ligand C_8. The aptamer AT11 adopts a G4 structure confirmed by CD spectroscopy before and after conjugation with the dendrimer. The aptadendrimer was prepared by conjugation via SPAAC, leading to nanostructures with a particle size of 3.1 nm suitable for *in vitro* studies. The association of the aptadendrimer with C_8, an acridine orange ligand with anticancer properties that binds/stabilizes the G4 structure of AT11, was confirmed by steady-state and time-resolved fluorescence and anisotropy measurements. Fluorimetry experiments also showed a high loading capacity of the aptadendrimer with C_8. The release of C_8 from the aptadendrimer was significant after 4 h and showed a maximum cumulative release profile after 12 h. Confocal microscopy indicated that the C_8–aptadendrimer complex was efficiently taken up into the cells and it was maintained during cell internalization and trafficking. The internalization of the aptadendrimer or complex with C_8 was not mediated by NCL or passive diffusion but by other internalization pathways such as endocytosis. The compartmentalization of aptadendrimers in the lysosomes was also verified. Cell viability studies showed that the aptadendrimer and C_8 complex presented a non-selective cytotoxic effect.

6.5. Supporting information

Aptadendrimer synthesis: surface functionalization of 2[G4]-N_3 with AT11 aptamer and fluorophore labelling

AT11-PEG$_{13}$-DBCO

DBCO-PEG$_{13}$-NHS (5.34 mg, 5.10 μmol, 25 equiv) was added to a solution of AT11-NH_2 (1.84 mg, 0.20 μmol) in DMSO (75 μL) and Et_3N (0.1 μL, 0.61 μmol) under Ar. After 24 h of stirring at room temperature, the reaction mixture was purified by dialysis (1 × 500 mL H_2O, 3 × 500 mL 20 mM potassium phosphate pH 6.9, 65 mM KCl, 3 × 500 mL H_2O; MWCO 1 kDa, Spectra/Por 6) to afford AT11-PEG$_{13}$-DBCO (1.82 mg, 89%).

The number of DBCO per AT11 ($N_{DBCO/AT11}$) was determined by UV-Vis (Figure S6.1) using the absorbance of AT11-PEG$_{13}$-DBCO at 280 nm (due to AT11 and DBCO) and 309 nm (due to DBCO). The calculation was done using the following equations:

$$[\mathrm{DBCO}] = \frac{\mathrm{A}_{\mathrm{DBCO}}^{309}}{\varepsilon_{\mathrm{DBCO}}^{309}} \qquad \textbf{Equation S6.1}$$

$$\mathrm{A}_{\mathrm{AT11}}^{260} = 2\mathrm{A}_{\mathrm{AT11}}^{280} \qquad \textbf{Equation S6.2}$$

$$\mathrm{A}_{\mathrm{AT11}}^{280} = \mathrm{A}_{\mathrm{Total}}^{280} - (1.089 \times \mathrm{A}_{\mathrm{DBCO}}^{309}) \qquad \textbf{Equation S6.3}$$

$$[\mathrm{AT11}] = \frac{\mathrm{A}_{\mathrm{AT11}}^{260}}{\varepsilon_{\mathrm{AT11}}^{260}} = \frac{2\mathrm{A}_{\mathrm{AT11}}^{280}}{\varepsilon_{\mathrm{AT11}}^{260}} = \frac{2\left(\mathrm{A}_{\mathrm{Total}}^{280} - \left(1.089 \times \mathrm{A}_{\mathrm{DBCO}}^{309}\right)\right)}{\varepsilon_{\mathrm{AT11}}^{260}} \qquad \textbf{Equation S6.4}$$

$$\mathrm{N}_{\mathrm{DBCO/AT11}} = \frac{[\mathrm{DBCO}]}{[\mathrm{AT11}]} \qquad \textbf{Equation S6.5}$$

where $\varepsilon_{\mathrm{DBCO}}^{309}$ is the extinction coefficient of DBCO at 309 nm (12000 $M^{-1}cm^{-1}$) and $\varepsilon_{\mathrm{AT11}}^{260}$ the extinction coefficient of AT11 at 260 nm (264800 $M^{-1}cm^{-1}$).

Considering the known absorbance ratios of AT11 at 260 and 280 nm (Equation (S6.2)) and of DBCO at 280 and 309 nm (Equation (S6.3)),[62] a $N_{DBCO/AT11}$ of 1 was determined from their molar concentrations (Equation (S6.5)).

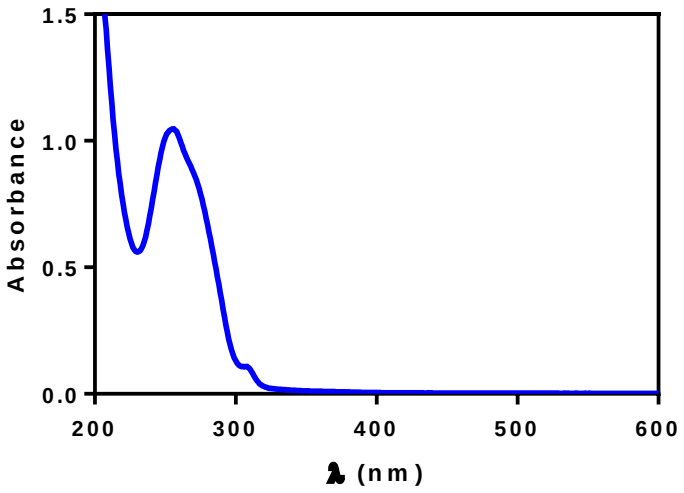


Figure S6.1. UV-Vis spectrum of AT11-PEG$_{13}$-DBCO in 20 mM potassium phosphate pH 6.9, 65 mM KCl.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2[G4]-$(N_3)_{127}$/$(AT11)_{34}$/$(Cy5)_1$

A solution of AT11-PEG_{13}-DBCO (1.68 mg, 0.17 μmol, 34 equiv) in DMSO (1.4 mL) was added to a solution of 2[G4]-N_3 (0.24 mg, 4.96 nmol) in DMSO (1.2 mL). After 24 h of stirring at 37 °C, LiBr (91.8 mg, 1.06 mmol, equivalent to 400 mM) was added and stirring continued for 96 h till no free AT11-PEG_{13}-DBCO was detected by PAGE (15%, 150 V, TAE running buffer, staining with EtBr; Figure S6.2). Then, Cy5-DBCO (4.61 μg, 5.03 nmol, 1 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h protected from light and then, purified by Amicon (3 × 5 mL H_2O, 4 × 5 mL 20 mM potassium phosphate pH 6.9, 65 mM KCl; MWCO 3 kDa) to afford 2[G4]-$(N_3)_{127}$/$(AT11)_{34}$/$(Cy5)_1$ (1.85 mg, 97%). A Cy5 loading of 1 was determined by UV-Vis (Figure S6.3) using an extinction coefficient of 250000 $M^{-1}cm^{-1}$ for Cy5 at 646 nm.

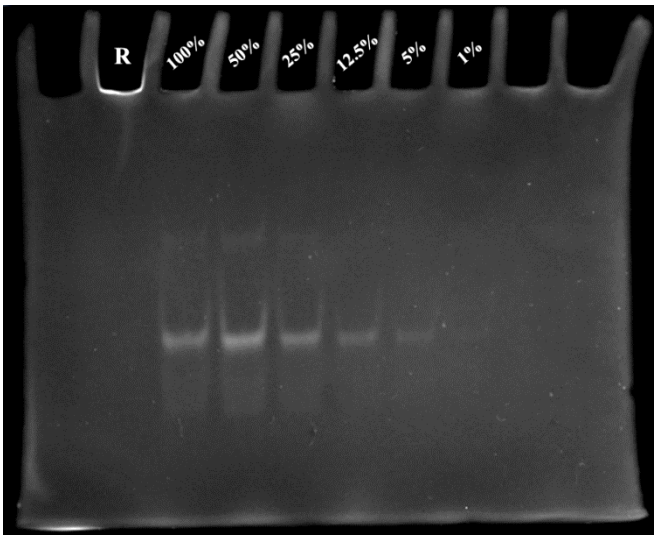


Figure S6.2. Monitoring of the SPAAC progression by PAGE (15%, 150 V, TAE running buffer, staining with EtBr) confirmed complete reaction. SPAAC reaction (R) and a calibration ladder that accounts for 100, 50, 25, 12.5, 5 and 1% of the AT11-PEG_{13}-DBCO added to the reaction.

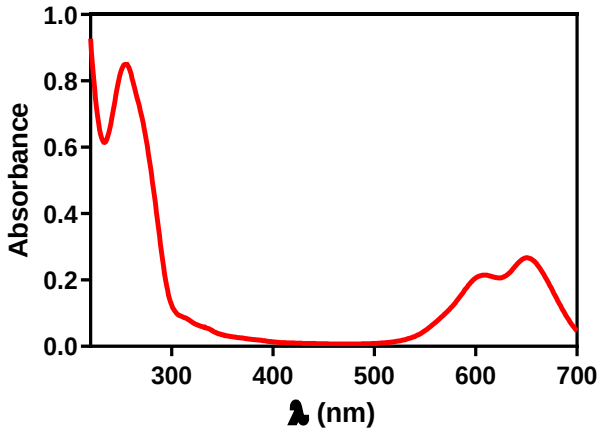


Figure S6.3. UV-Vis spectrum of aptadendrimer 2[G4]-$(N_3)_{127}$/$(AT11)_{34}$/$(Cy5)_1$ in 20 mM potassium phosphate pH 6.9, 65 mM KCl.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Additional characterization data

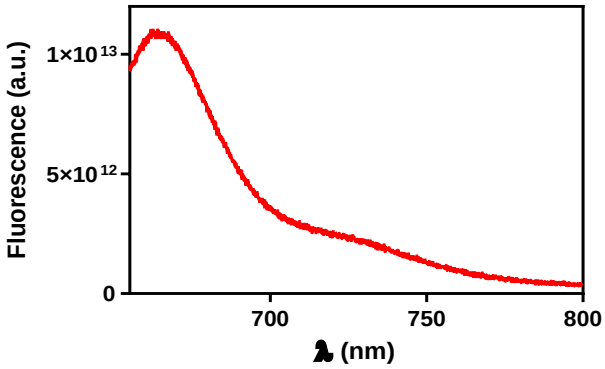


Figure S6.4. Fluorescence spectrum aptadendrimer 2[G4]-$(N_3)_{127}$/$(AT11)_{34}$/$(Cy5)_1$ in 20 mM potassium phosphate pH 6.9, 65 mM KCl ($\lambda_{exc.}$ 646 nm).

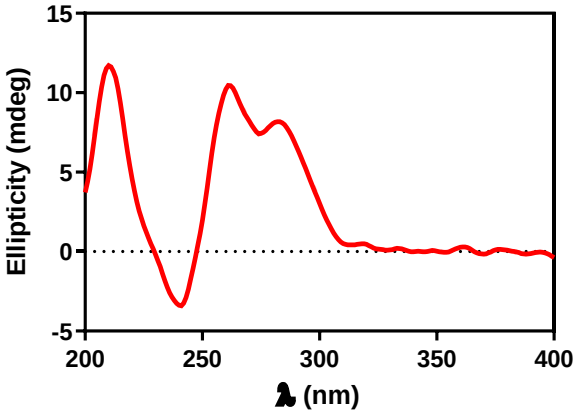


Figure S6.5. CD spectrum of aptadendrimer 2[G4]-$(N_3)_{127}$/$(AT11)_{34}$/$(Cy5)_1$ in 20 mM potassium phosphate pH 6.9, 65 mM KCl.

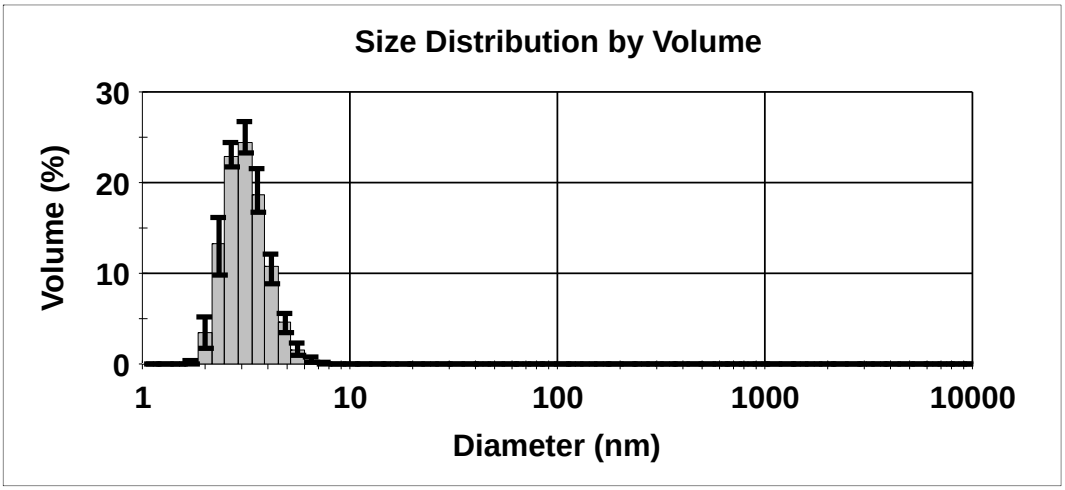


Figure S6.6. DLS of aptadendrimer (1 mg/mL) measured at 25 °C in KPi buffer supplemented with 65 mM of KCl.

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

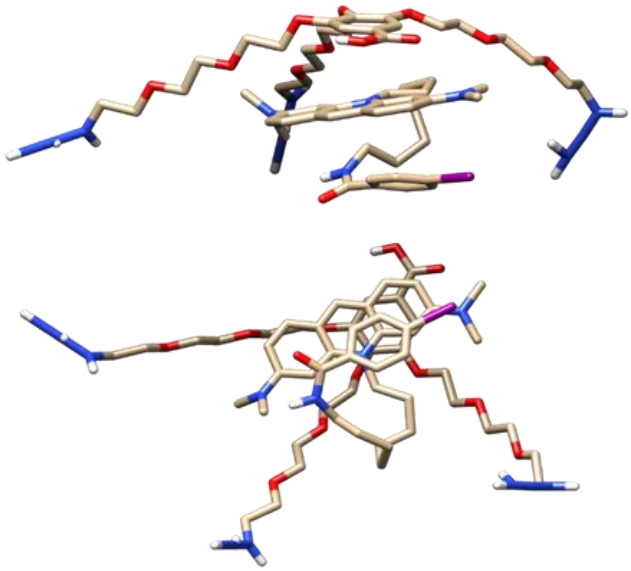


Figure S6.7. Molecular docking simulation of C_8 ligand with GATG repeating unit.

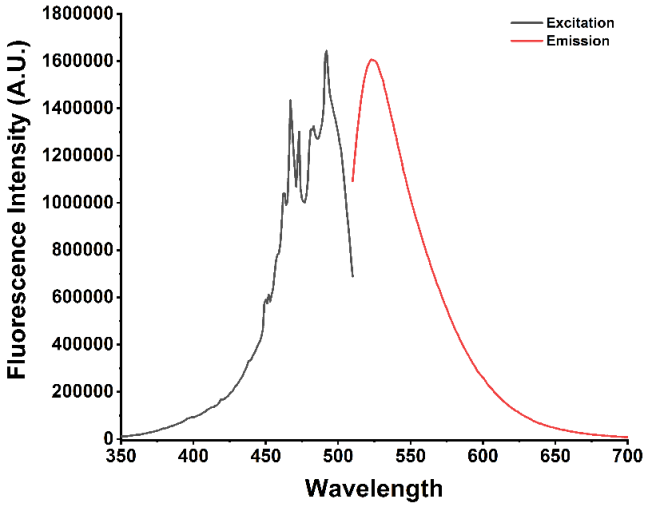
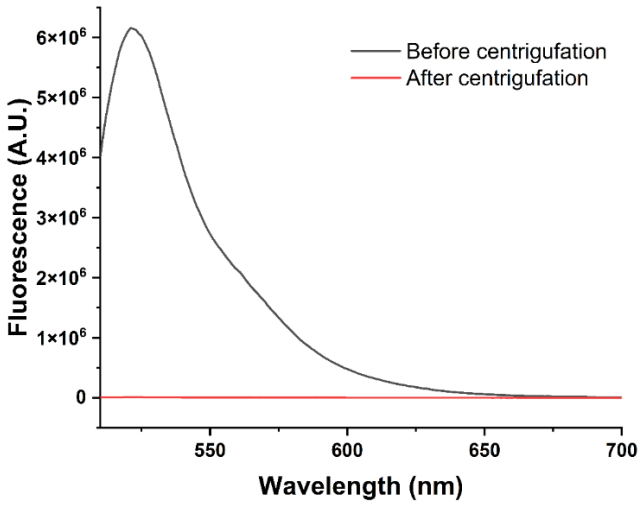


Figure S6.8. Excitation and emission fluorescence spectra of C_8.



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure S6.9. Loading efficiency experiment measured by the fluorescence spectrum of C_8 before and after centrifugation.

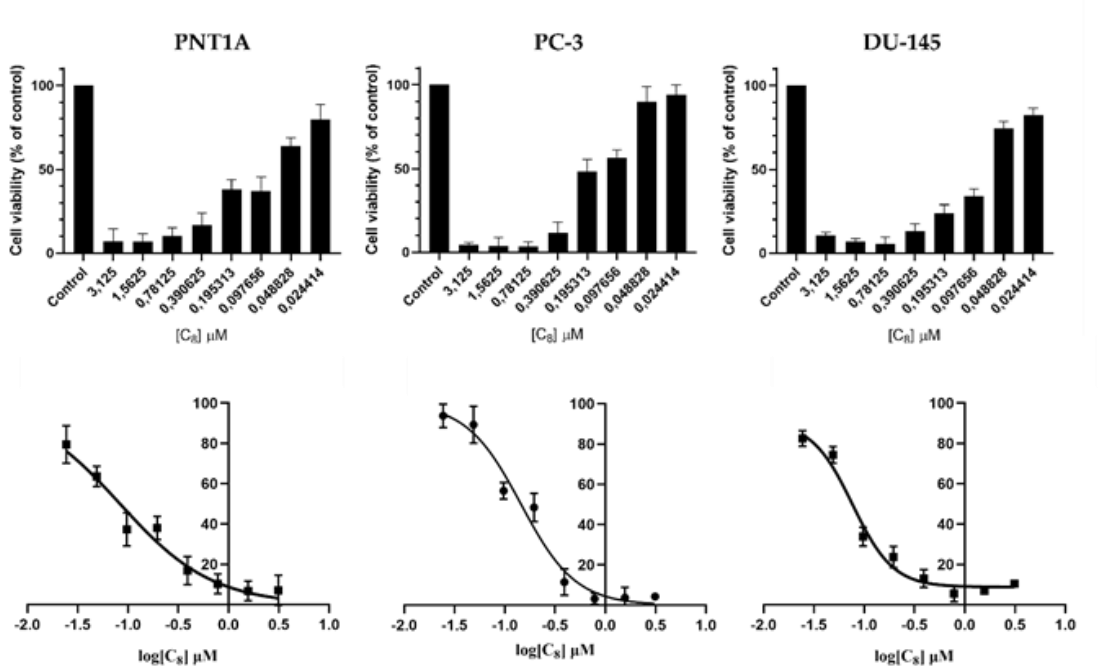


Figure S6.10. Cell viability histograms and dose-response data of cells after C_8 incubation for 3 days analyzed by MTT assay in PNT1A, DU-145, and PC-3.

Table S6.1. ANOVA analysis of experiments conducted in healthy and cancerous cell lines in distinct conditions.

Cell Line	PNT1A	PC-3	DU-145
Control *vs.* AT11	*	***	****
Control *vs.* C_8-AT11	****	****	****
Control *vs.* Aptadendrimer	****	****	****
Control *vs.* C_8-Aptadendrimer	****	****	****
AT11 *vs.* C_8-AT11	*	ns	ns
AT11 *vs.* Aptadendrimer	****	****	****
AT11 *vs.* C_8-Aptadendrimer	****	****	****
C_8-AT11 *vs.* Aptadendrimer	****	****	****
C_8-AT11 *vs.* C_8-Aptadendrimer	****	****	****
Aptadendrimer *vs.* C_8-Aptadendrimer	ns	**	ns

Statistical analysis (One-way ANOVA) was performed using GraphPad Prism software: *p< 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001; ns – not significant (p > 0.05).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

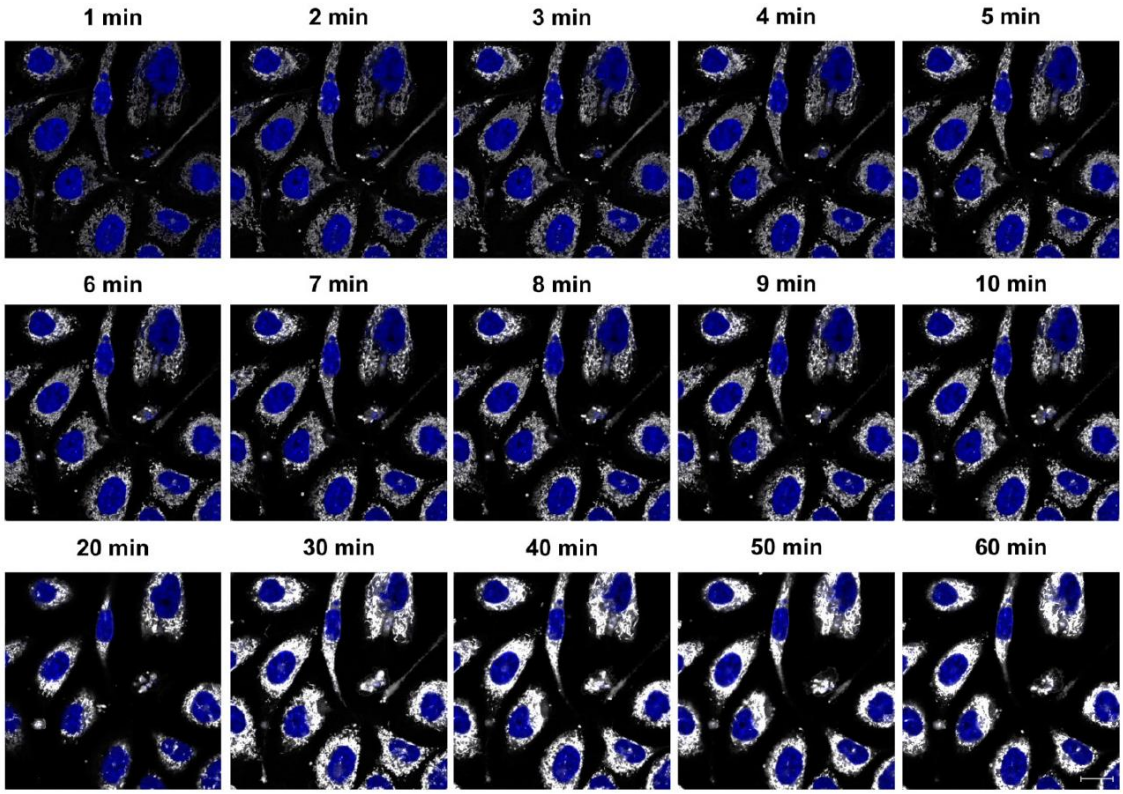


Figure S6.11. Aptadendrimer uptake in PC-3 cells at different times assessed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The white signal fluorescence represents the Cy5 labelled aptadendrimer. Cell nuclei (blue signal) are stained with Hoechst 33342. Scale bar: 20 μm.

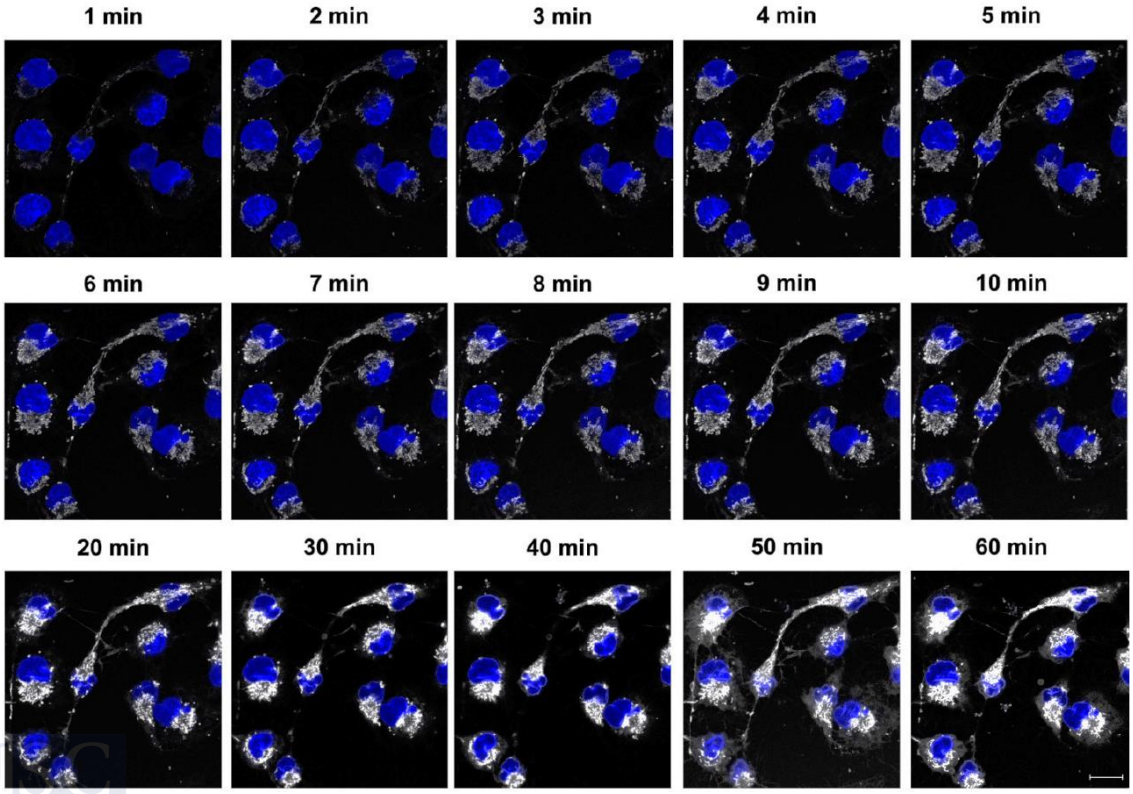


Figure S6.12. Cellular uptake of the aptadendrimer in PNT1A cells along time. Cy5 labelled aptadendrimer is represented with a white signal fluorescence and cell nuclei are stained with Hoechst 33342 (blue signal). Scale bar: 20 μm.

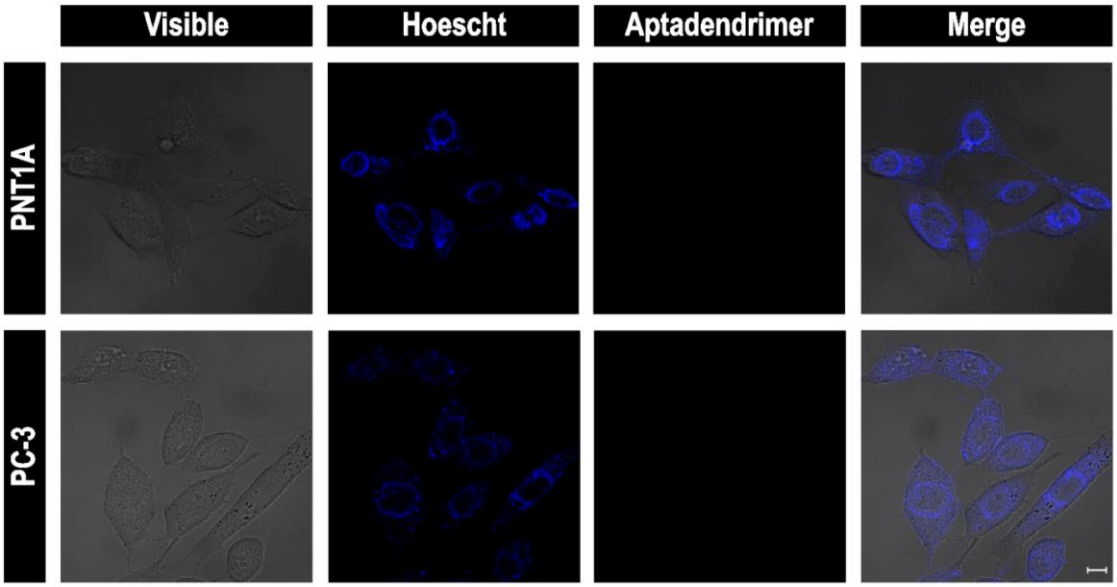


Figure S6.13. Cellular uptake of the aptadendrimer in PNT1A and PC-3 cell lines when incubated at low temperatures (4 °C). Cell nuclei are stained with Hoechst 33342 (blue signal). Scale bar: 20 μm.

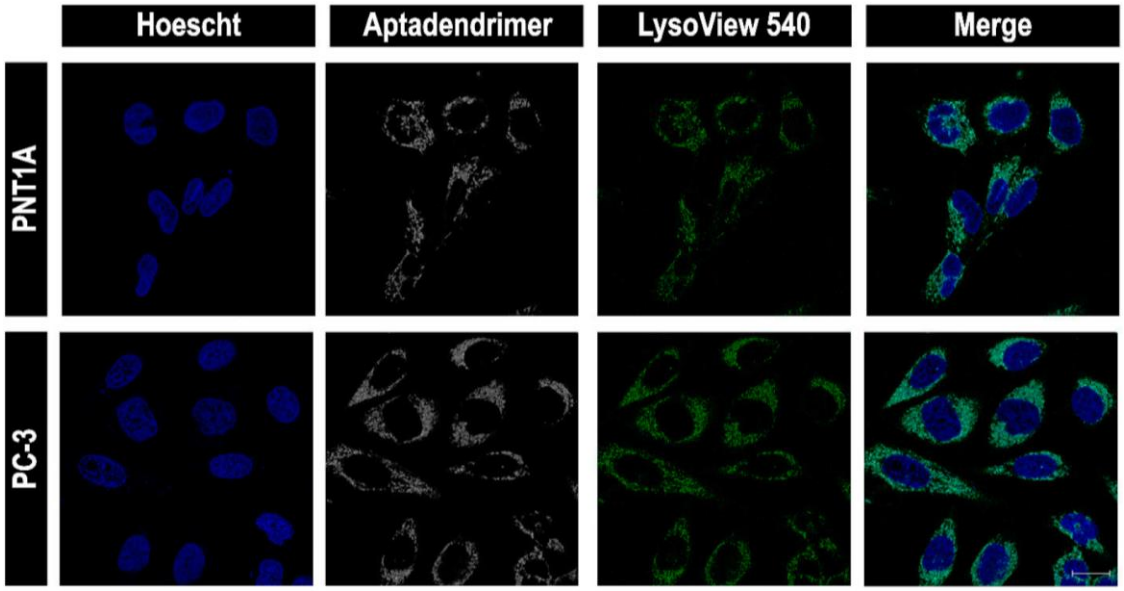


Figure S6.14. CLSM of lysosomal compartmentalization experiment in PC-3 and PNT1A cell lines. Cy5 labelled aptadendrimer is represented with a white signal fluorescence, lysosomes stained with LysoView 540 probe (green signal), and cell nuclei are stained with Hoechst 33342 (blue signal). Scale bar: 20 μm.

Table S6.2. Colocalization coefficients of lysosomal compartmentalization experiment in PC-3 and PNT1A cell lines.

	Mean Fluorescence Intensity		**Colocalization Analysis**		
	Aptadendrimer	LysoView	Pearson's Coefficient	Mander's Coefficient M1	Mander's Coefficient M2
PC-3	6.188±2.583	3.284±1.312	0.7910±0.0193	0.7850±0.0386	0.6350±0.0156
PNT1A	3.549±0.627	1.880±0.268	0.7477±0.0119	0.6090±0.0313	0.6800±0.0171

M1 - fraction of LysoView overlapping Aptadendrimer | M2- fraction of Aptadendrimer overlapping LysoView

6.6. References

[1] Rebello, R. J.; Oing, C.; Knudsen, K. E.; Loeb, S.; Johnson, D. C.; Reiter, R. E.; Gillessen, S.; Van der Kwast, T.; Bristow, R. G. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2021**, *7*, 9-35.
[2] Debela, D. T.; Muzazu, S. G.; Heraro, K. D.; Ndalama, M. T.; Mesele, B. W.; Haile, D. C.; Kitui, S. K.; Manyazewal, T. *SAGE Open Med.* **2021**, *9*, 1–10.
[3] Sherje, A. P.; Jadhav, M.; Dravyakar, B. R.; Kadam, D. *Int. J. Pharm.* **2018**, *548*, 707–720.
[4] Caminade, A.-M. *Dendrimers: Towards Catalytic, Material and Biomedical Uses*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2011; Volume 538.
[5] Tomalia, D. A.; Khanna, S. N. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2705–2774.
[6] Astruc, D.; Boisselier, E.; Ornelas, C. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1857–1959.
[7] Zhou, J.; Rossi, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *16*, 181–202.
[8] Bates, P. J.; Kahlon, J. B.; Thomas, S. D.; Trent, J. O.; Miller, D. M. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 26369–26377.
[9] Bates, P. J.; Laber, D. A.; Miller, D. M.; Thomas, S. D.; Trent, J. O. *Exp. Mol. Pathol.* **2009**, *86*, 151–164.
[10] Bates, P. J.; Reyes-Reyes, E. M.; Malik, M. T.; Murphy, E. M.; O'Toole, M. G.; Trent, J. O. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Gen. Subj*. **2017**, *1861*, 1414–1428.
[11] Do, N. Q.; Chung, W. J.; Truong, T. H. A.; Heddi, B.; Phan, A. T. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 7487–7493.
[12] Alshaer,W.; Hillaireau, H.; Fattal, E. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *134*, 122–137.
[13] Miranda, A.; Santos, T.; Largy, E.; Cruz, C. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 121–140.
[14] Shieh, Y.-A.; Yang, S.-J.; Wei, M.-F.; Shieh, M.-J. *ACS Nano* **2010**, *4*, 1433–1442.
[15]. Sousa-Hervés, A.; Novoa-Carballal, R.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *AAPS J.* **2014**, *16*, 948–961.
[16] Mignani, S.; Shi, X.; Ceña, V.; Majoral, J.-P. *Drug Discov. Today* **2020**, *25*, 1065–1073.
[17] Sheikh, A.; Kesharwani, P. *Eur. Polym. J.* **2021**, *159*, 110746–110758.
[18] Figueiredo, J.; Lopes-Nunes, J.; Carvalho, J.; Antunes, F.; Ribeiro, M.; Campello, M. P. C.; Paulo, A.; Paiva, A.; Salgado, G. F.; Queiroz, J. A.; *et al. Int. J. Pharm.* **2019**, *568*, 118511–118521.
[19] Pereira, E.; Quental, L. D.; Palma, E.; Oliveira, C.; Mendes, F.; Raposinho, P.; Correia, I.; Lavrado, J.; di Maria, S.; Belchior, A.; *et al. Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42544–42559.
[20] Amaral, S. P.; Fernandez-Villamarin, M.; Correa, J.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4522–4525.
[21] Amaral, S. P.; Tawara, M. H.; Fernandez-Villamarin, M.; Borrajo, E.; Martínez-Costas, J.; Vidal, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 5273–5277.
[22] Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
[23] Lallana, E.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 8794–8804.
[24] Dommerholt, J.; Rutjes, F. P. J. T.; Van Delft, F. L. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374*, 16-35.
[25] Carvalho, J.; Lopes-Nunes, J.; Vialet, B.; Rosado, T.; Gallardo, E.; Vale, J.; Eloy, C.; Ferreira, S.; Palmeira-De-Oliveira, R.; Campello, M. P. C.; *et al. Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2021**, *36*, 102429-102441.
[26] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer Science+Business Media LLC.: New York, NY, USA, 2006; pp. 15–16.
[27] Melo, A. M.; Fedorov, A.; Prieto, M.; Coutinho, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 18105–18117.

[28]. Scanavachi, G.; Coutinho, A.; Fedorov, A. A.; Prieto, M.; Melo, A. M.; Itri, R. *Langmuir* **2021**, *37*, 9952–9963.
[29] Navas Guimaraes, M. E.; Lopez-Blanco, R.; Correa, J.; Fernandez-Villamarin, M.; Bistué, M. B.; Martino-Adami, P.; Morelli, L.; Kumar, V.; Wempe, M. F.; Cuello, A. C.; *et al*. *ACS Nano* **2021**, *15*, 4678–4687.
[30] Lopez-Blanco, R.; Fernandez-Villamarin, M.; Jatunov, S.; Novoa-Carballal, R.; Fernandez-Megia, E. *Polym. Chem.* **2019**, *10*, 4709–4717.
[31] Leiro, V.; Garcia, J. P.; Moreno, P. M. D.; Spencer, A. P.; Fernandez-Villamarin, M.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E.; Pêgo, A. P. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 4901–4917.
[32] Araújo, A. R.; Correa, J.; Dominguez-Arca, V.; Reis, R. L.; Fernandez-Megia, E.; Pires, R. A. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 59673–59682.
[33] Vukojicic, P.; Béhar, G.; Tawara, M. H.; Fernandez-Villamarin, M.; Pecorari, F.; Fernandez-Megia, E.; Mouratou, B. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 21391–21398.
[34] Neira, J. L.; Correa, J.; Rizzuti, B.; Santofimia-Castaño, P.; Abian, O.; Velázquez-Campoy, A.; Fernandez-Megia, E.; Iovanna, J. L. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 2567–2576.
[35] Munoz, E. M.; Correa, J.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5966–5969.
[36] Shi, L.; Zhang, J.; Zhao, M.; Tang, S.; Cheng, X.; Zhang, W.; Li, W.; Liu, X.; Peng, H.; Wang, Q. *Nanoscale* **2021**, *13*, 10748–10764.
[37] Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288–6308.
[38] Padula, D.; Pescitelli, G. *Molecules* **2018**, *23*, 128-141.
[39] Hubbard, M. A.; Luyet, C.; Kumar, P.; Elvati, P.; VanEpps, J. S.; Violi, A.; Kotov, N. A. *Chirality* **2022**, *34*, 1494-1502.
[40] Maeda, H.; Nakamura, H.; Fang, J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 71–79.
[41] Kobayashi, H.; Watanabe, R.; Choyke, P. L. *Theranostics* **2014**, *4*, 81–89.
[42] Wilhelm, S.; Tavares, A. J.; Dai, Q.; Ohta, S.; Audet, J.; Dvorak, H. F.; Chan, W. C. W. *Nat. Rev. Mater.* **2016**, *1*, 16014-16025.
[43] Lopes-Nunes, J.; Agonia, A. S.; Rosado, T.; Gallardo, E.; Palmeira-De-Oliveira, R.; Palmeira-De-Oliveira, A.; Martinez-De-Oliveira, J.; Fonseca-Moutinho, J.; Campello, M. P. C.; Paiva, A.; *et al*. *Cancers* **2021**, *13*, 4038-4053.
[44] Carvalho, J.; Mergny, J.-L.; Salgado, G. F.; Queiroz, J. A.; Cruz, C. *Trends Mol. Med.* **2020**, *26*, 848–861.
[45] Carvalho, J.; Nunes, J. L.; Lopes, A. C.; Campello, M. P. C.; Paulo, A. R.; Queiroz, J. A.; Cruz, C. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 2992–3002.
[46] Carvalho, J.; Paiva, A.; Campello, M. P. C.; Paulo, A.; Mergny, J.-L.; Salgado, G. F.; Queiroz, J.; Cruz, C. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7945-7960.
[47] Carvalho, J.; Santos, T.; Carrilho, R.; Sousa, F.; Salgado, G. F.; Queiroz, J.; Cruz, C. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, *38*, 2276–2286.
[48] Santos, T.; Miranda, A.; Imbert, L.; Monchaud, D.; Salgado, G. F.; Cabrita, E. J.; Cruz, C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2022**, *215*, 114757-114776.
[49] Santos, T.; Pereira, P.; Campello, M. P. C.; Paulo, A.; Queiroz, J. A.; Cabrita, E.; Cruz, C. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *142*, 473–479.
[50] Carvalho, J.; Pereira, E.; Marquevielle, J.; Campello, M. P.; Mergny, J.-L.; Paulo, A.; Salgado, G. F.; Queiroz, J. A.; Cruz, C. *Biochimie* **2018**, *144*, 144–152.
[51] Alimirah, F.; Chen, J.; Basrawala, Z.; Xin, H.; Choubey, D. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 2294–2300.
[52] Behzadi, S.; Serpooshan, V.; Tao, W.; Hamaly, M. A.; Alkawareek, M. Y.; Dreaden, E. C.; Brown, D.; Alkilany, A. M.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4218–4244.

[53] Paillard, A.; Hindré, F.; Vignes-Colombeix, C.; Benoit, J.-P.; Garcion, E. *Biomaterials* **2010**, *31*, 7542–7554.
[54] Zhong, Q.; da Rocha, S. R. P. *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 1058–1072.
[55] Kitchens, K. M.; Foraker, A. B.; Kolhatkar, R. B.; Swaan, P. W.; Ghandehari, H. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 2138–2145.
[56] Kitchens, K. M.; Kolhatkar, R. B.; Swaan, P. W.; Ghandehari, H. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 364–369.
[57] Albertazzi, L.; Serresi, M.; Albanese, A.; Beltram, F. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 680–688.
[58] Albertazzi, L.; Fernandez-Villamarin, M.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 1059–1068.
[59] de Almeida, M. S.; Susnik, E.; Drasler, B.; Taladriz-Blanco, P.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 5397–5434.
[60] Panyam, J.; Zhou, W.; Prabha, S.; Sahoo, S. K.; Labhasetwar, V. *FASEB J.* **2002**, *16*, 1217–1226.
[61] Moreno-Echeverri, A. M.; Susnik, E.; Vanhecke, D.; Taladriz-Blanco, P.; Balog, S.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B. *J. Nanobiotechnol.* **2022**, *20*, 464–481.
[62] Liu, D.; Yang, J.; Wang, H. F.; Wang, Z.; Huang, X.; Wang, Z.; Niu, G.; HightWalker, A.R.; Chen, X. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5800–5806.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DISCUSIÓN GENERAL

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda.

Voltaire

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7. DISCUSIÓN GENERAL

A lo largo de este trabajo se han descrito diversas aplicaciones de dendrímeros y copolímeros de bloque PEG-dendrímero de la familia GATG como sistemas de transporte de fármacos, destacando la encapsulación de un fármaco insoluble en micelas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Capítulo 1), la modificación de las propiedades como la cinética de liberación de fármacos y el tamaño de micelas tipo PIC (Capítulos 2 y 3) y la formación de aptadendrímeros con potenciales aplicaciones en terapia contra el cáncer (Capítulo 4).

En la síntesis de los copolímeros de bloque PEG-dendrímero, PEG-[G1]-N_3 y PEG-[G3]-N_3 utilizados en los capítulos 1, 2 y 3, se escogió una estrategia *chain first*, donde se parte de una cadena de PEG-hidroxilo con una masa molecular media de 5000 Da. La activación del PEG se llevó a cabo mediante la incorporación de un trietilengicol diamina monoprotegido a través de un grupo carbamato. Tras la desprotección del grupo amino se incorporó una unidad de repetición dendrítica GATG a través de la formación de un enlace amida entre el grupo amino del PEG y el grupo ácido de la unidad de repetición, obteniéndose el copolímero de bloque de primera generación PEG-[G1]-N_3 (capítulo 1). Posteriormente, usando una secuencia de activación y crecimiento se sintetizó el copolímero de tercera generación PEG-[G3]-N_3, donde la activación se llevó a cabo a través de la reducción de los grupos azida de la periferia mediante una hidrogenación catalítica usando Pd/C e H_2 para obtener grupos amino sobre los que acoplar unidades de repetición en la etapa de crecimiento (Figura 7.1).

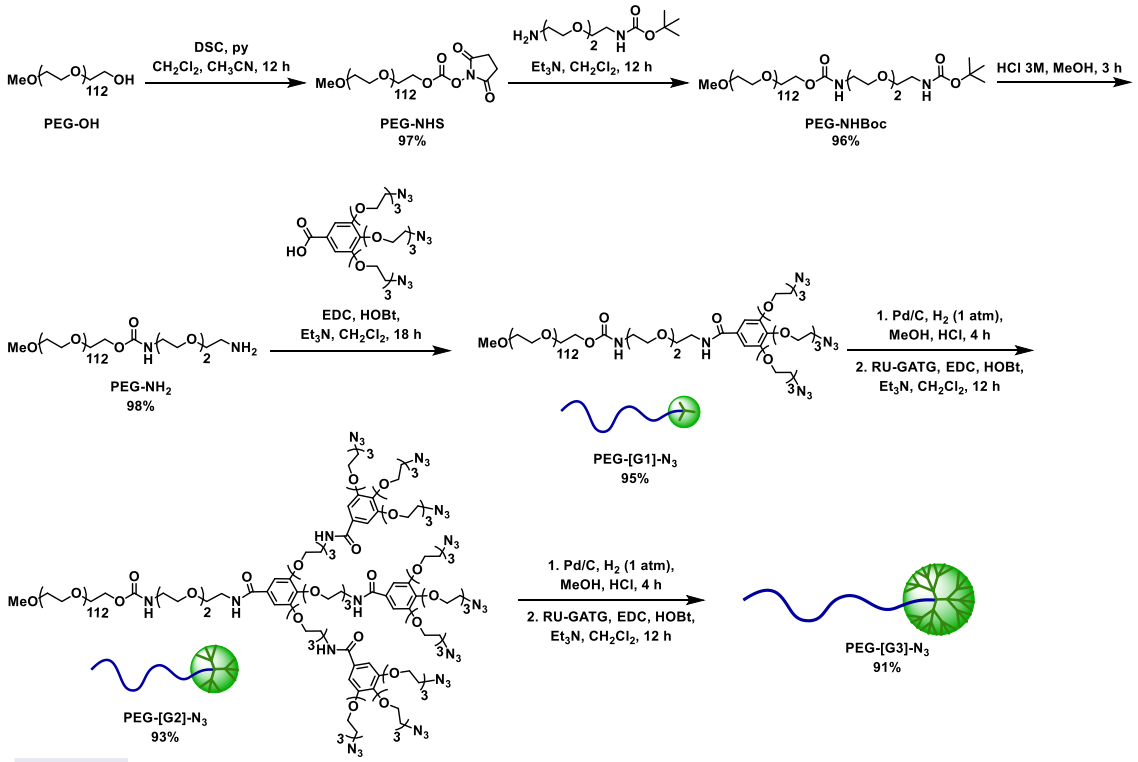


Figura 7.1. Esquema de la síntesis de los copolímeros de bloque PEG-dendrímero de la familia GATG, PEG-[G1]-N_3 y PEG-[G3]-N_3.

En los capítulos 2 y 3 se utilizaron copolímeros de bloque PEG-dendrímero de tercera generación funcionalizados con grupos ácido o amino, que los dotaron de carga negativa y positiva respectivamente. Para ello se llevó a cabo una CuAAC entre el copolímero de bloque PEG-[G3]-N_3 y, ácido 4-etinil benzoico para las cargas negativas y cloruro de 4-etinil bencilamonio para las cargas positivas, obteniéndose los copolímeros cargados correspondientes, PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ y PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl (Esquema 4.1).

La síntesis de los dendrímeros se llevó a cabo usando una estrategia divergente previamente descrita por nuestro grupo de investigación. Para la síntesis del dendrímero 2[G4]-N_3, necesario para el desarrollo del trabajo descrito en el capítulo 4, se llevó a cabo el acoplamiento de dos unidades de repetición dendrítica GATG sobre una cadena de trietilenglicol diamina a través de la formación de un enlace amida entre los grupos amino del trietilenglicol y el ácido carboxílico de la unidad de repetición, obteniéndose un dendrímero de primera generación 2[G1]-N_3. Usando la reacción de Staudinger, se consiguió una primera activación del dendrímero a través de la reducción de los grupos azida a grupos amino con PPh_3 para su posterior crecimiento con más unidad de repetición GATG. Mediante esta secuencia de activación y crecimiento se llegó a un dendrímero de cuarta generación, 2[G4]-N_3 (Figura 7.2A).

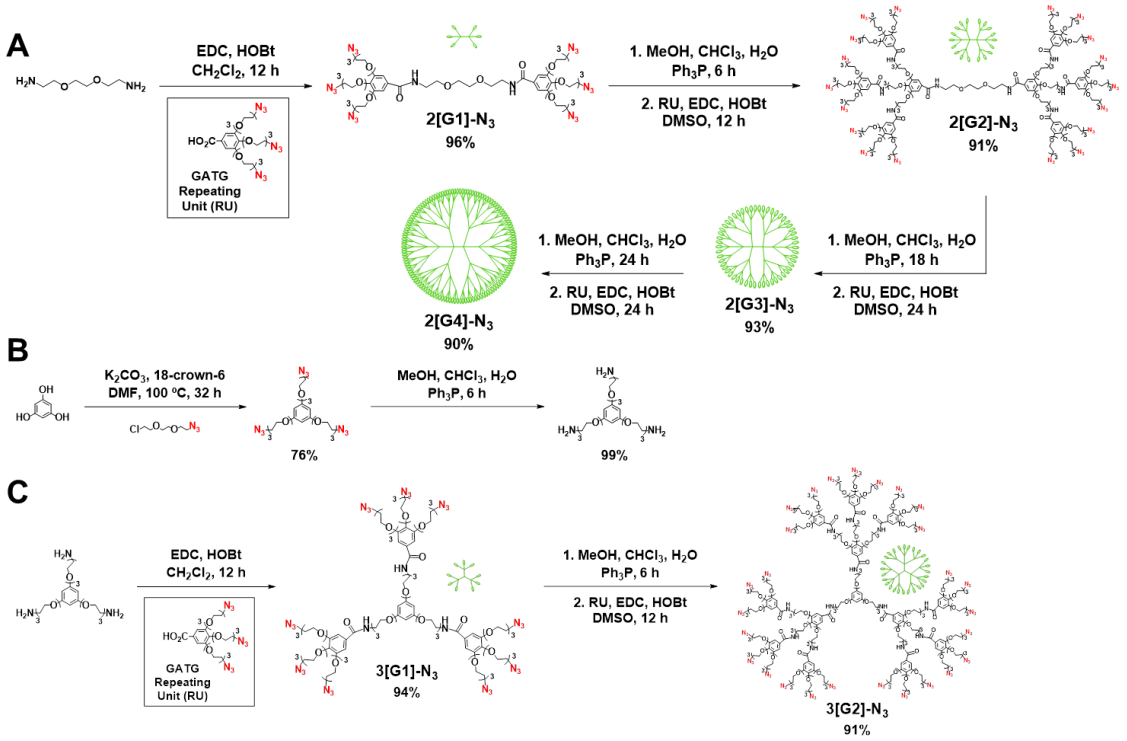


Figura 7.2. Esquema de la síntesis de dendrímeros de la familia GATG, 2[G4]-N_3 (**A**) y 3[G2]-N_3 (**C**). Esquema de la síntesis del *core* del dendrímero 3[G2]-N_3 (**B**).

En el caso del dendrímero 3[G2]-N_3 empleado en el capítulo 3, se utilizó la misma secuencia sintética partiendo de la molécula trivalente floroglucinol, sobre la que se incorporaron brazos de trietilenglicol azida para su posterior activación a través de una reducción de los grupos azida a grupos amino usando de nuevo la reacción de

Staudinger (Figura 7.2B). Usando la secuencia de crecimiento y activación previamente descrita se obtuvo 3[G2]-N_3 (Figura 7.2C)

En el capítulo 1 se aborda la problemática de la baja solubilidad e incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica del DMHCA (*N*,*N*-dimetil-3***β***-hidroxicolenamida). Este prometedor fármaco para la enfermedad de Alzheimer, es un agonista parcial de los receptores hepáticos X (LXR) capaz de inducir la expresión de apolipoproteína E (ApoE), la principal responsable de la eliminación del péptido ***β***-amiloide (A***β***) del cerebro y que, a diferencia de otros agonistas, no afecta a los niveles de colesterol y triglicéridos.

Para la solubilización y encapsulación del DMHCA en un DDS, se sintetizó el copolímero de bloque de primera generación, PEG-[G1]-N_3 sobre el que se incorporó el DMHCA explotando el único grupo hidroxilo de su estructura. Esta unión covalente se realizó a través de un enlace tipo éster debido a su conocida biodegradabilidad *in vivo* por acción del pH y la acción de esterasas.

La estrategia sintética utilizada se basó en una primera esterificación entre el grupo hidroxilo del DMHCA y ácido 4-pentinoico para obtener DMHCA-Alk, un derivado del fármaco que incorpora un grupo alquino para la posterior funcionalización del copolímero PEG-[G1]-N_3 mediante una CuAAC (Figura 3.1A). La selección adecuada de las condiciones de reacción, concretamente la temperatura y el uso de tris(benciltriazol metil)amina (TBTA) fueron factores críticos para llevar a cabo la reacción ($CuSO_4$, ascorbato, TBTA, THF/H_2O (4:1), 60 ºC, 36 h), en la que se obtuvo el copolímero de bloque anfifílico PEG-[G1]-DMHCA tras comprobar por espectroscopía IR la total desaparición de la banda característica de las azidas a 2100 cm^{-1}. Se caracterizó por ^{1}H RMN observándose la desaparición de la señal característica a 3.40 ppm de los protones en ***α*** a la azida y la aparición de una señal a 7.51ppm correspondiente con los protones de los triazoles. La formación de estos nuevos triazoles también se pudo comprobar por ^{13}C RMN con la aparición de dos nuevas señales a 122.2 y 127.9 ppm. La aparición de nuevas señales en RMN tanto de ^{1}H (5.35 ppm el alqueno y 3.00-2.93 ppm la *N*,*N*-dimetilamida) como de ^{13}C (139.5 ppm el alqueno y 173.6 ppm la amida) confirmaron la incorporación del DMHCA. Además, a través de espectrometría de masas MALDI-TOF se pudo detectar un pico coincidente con el peso molecular esperado del PEG-[G1]-DMHCA.

Una vez ancladas las moléculas de DMHCA sobre la parte dendrítica del copolímero de bloque PEG-[G1]-N_3 se obtuvo un copolímero anfifílico, y esta cualidad se explotó para la formación de micelas de tamaño nanométrico. Las micelas se obtuvieron disolviendo el PEG-[G1]-DMHCA a una concentración de 1 mg/mL en acetona/H_2O (1:1) y dejando que la acetona se evaporase (Figura 3.1B). Las micelas resultantes se midieron por DLS y se obtuvo un tamaño medio de aproximadamente 22 nm (Figura 3.1C) de acuerdo con las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 3.1D).

Se calculó un DL (*drug loading*) del 20% para estas micelas, que se mantuvieron estables en disolución al menos 1 semana sin que se observaran variaciones en el tamaño por DLS. Además, tampoco se advirtió variación en su tamaño al someterlas a un proceso de liofilización y resuspensión en PBS, muy importante de cara a su almacenamiento y manipulación. Con estas micelas liofilizadas y antes de proceder

con los estudios *in vitro* e *in vivo*, se realizó un estudio de la integridad del éster en la micela. Para ello se disolvió una muestra de micelas liofilizadas en $CDCl_3$, se analizó su espectro de ^1H RMN y no se observó variación en la integral de la señal de los protones en α al éster.

Además del copolímero PEG-[G1]-DMHCA y sus micelas, se sintetizó una versión modificada del copolímero de bloque donde se incorporó una biotina para la evaluación *in vitro* e *in vivo* del sistema. En este caso la síntesis parte de un PEG que incorpora un grupo amino protegido en el extremo distal. Tras el acoplamiento de una unidad de repetición GATG para obtener NHBoc-PEG-[G1]-N_3, se llevó a cabo una desprotección del grupo amino en medio ácido y la posterior incorporación de la biotina a través de una amida. En una última etapa sintética se incorporó el DMHCA mediante una CuAAC utilizando las condiciones previamente descritas (Esquema S3.1).

Para demostrar si el sistema tiene la habilidad de atravesar la barrera hematoencefálica (por sus siglas en inglés, BBB) y presenta actividad en las zonas deseadas, se llevaron a cabo una serie de estudios *in vitro* e *in vivo* en colaboración con el grupo del profesor Martín A. Bruno.

Primero se determinó la eficacia terapéutica de las micelas de PEG-[G1]-DMHCA *in vitro*, comparando el efecto del sistema frente al DMHCA libre y usando como control PEG-[G1]-CO_2H, el copolímero en bloque resultante de la hidrólisis del DMCHA. Tras 24 h de incubación del sistema y sus controles, se determinaron los niveles de ABCA1 y ApoE en células corticales gliales y neuronales de rata, observándose un incremento significativo de ambas proteínas comparando el control con el tratamiento de DMHCA tanto libre como en micela (Figura 3.2A,B). Cabe destacar que tampoco se observó una diferencia significativa en los niveles de expresión de las proteínas diana usando DMHCA libre o encapsulado, lo que confirmó la actividad de las micelas.

El siguiente paso fue evaluar si el sistema es capaz de llegar o no a las zonas de interés, para lo que se usó la versión modificada del sistema en la que se incorpora biotina en la superficie de las micelas. Se llevó a cabo un estudio por microscopía confocal analizando la distribución del sistema tras una incubación de 2 h en células neuronales y astrocitos. En ambos casos se demostró la habilidad del sistema para la internalización al observarse colocalización en células del sistema nervioso central (por sus siglas en inglés, CNS) (Figura 3.2C).

Con estos resultados se pasó a la evaluación de la administración *in vivo* de las micelas. Sabiendo que la administración de fármacos dirigidos a cerebro se puede ver obstaculizada por su paso a través de la BBB, en los últimos años ha ganado mucha importancia la administración intranasal como un paso eficaz de la nariz al cerebro evitando así el paso a través de la BBB. Se probó la administración del sistema marcado con biotina usando distintas dosis de DMHCA (0.2, 5 y 10 mg DMHCA/kg de peso corporal/día) y se analizó por microscopía confocal el hipocampo y la corteza cerebral a distintos tiempos (4, 12 y 24 h). El resultado obtenido fue que 24 h después de la administración de 5 y 10 mg de DMHCA/kg de peso corporal/día, el sistema colocaliza en el interior celular, pudiendo incluso apreciarse la colocalización con el núcleo de las células, donde se encuentran los receptores LXR (Figura 3.3A,B).

A continuación, se llevó a cabo un estudio de la dosis del sistema necesaria para la obtención de una buena respuesta en un tratamiento *in vivo*. Para ello se exploraron diferentes cantidades de DMHCA, 0.3, 1,5, 3 y 15 mg/kg de peso corporal/día, que equivalen a 1.5, 7.5, 15 y 75 mg de PEG-[G1]-DMHCA/kg de peso corporal/día. Después de 24 h se cuantificaron en el bulbo olfatorio los niveles de ApoE, obteniéndose que para los ratones que recibieron 3 y 15 mg de DMHCA estos niveles eran considerablemente mayores en comparación con los controles (Figura 3.3C). Se estableció por tanto una dosis de 3 mg de DMHCA por kg de peso del animal y por día y, además, se evaluó la eficacia de la administración a lo largo del tiempo con otra serie de estudios a 4, 12, 24, 48 y 72 h. Los valores óptimos de expresión de ApoE se obtuvieron a las 48 h en hipocampo y córtex cerebral. Sorprendentemente, al analizar estos niveles en hígado a las 24 h posteriores al inicio del tratamiento, se observó un aumento de ApoE. Este aumento se puede deber a que la micela es capaz de atravesar al BBB y llegar al hígado, donde existe una elevada expresión de los receptores LXR (Figura 3.3D,E).

Con la intención de determinar los posibles efectos farmacológicos de nuestro sistema sobre el deterioro de la memoria asociado a la deposición de Aβ, se llevó a cabo un nuevo estudio *in vivo* con ratones transgénicos con patología amiloide similar a la enfermedad de Alzheimer. Para esto se administró a un grupo de animales la dosis previamente descrita, mientras que a otro grupo se le administró el control PEG-[G1]-CO_2H. Tras 21 días de tratamiento se realizó el test NOR (*novel objetc recognition*), una prueba de reconocimiento de objetos con los que el animal está previamente familiarizado. Los ratones tratados con las micelas de PEG-[G1]-DMHCA desempeñaron significativamente un mejor reconocimiento de los objetos que los ratones tratados con el control (Figura 3.4A). Además, se analizó la cantidad de Aβ en corteza cerebral e hipocampo de los animales y se pudo apreciar una significativa reducción después del tratamiento con las micelas frente al control (Figura 3.4E).

Uno de los objetivos de este trabajo es el desarrollo de ligandos de LXR que no afecten a los niveles de colesterol y triglicéridos, por lo que se estudió el perfil plasmático de los animales tas el tratamiento. Se pudo comprobar que los niveles en plasma se mantenían intactos para ambos grupos (tratamiento con micelas de PEG-[G1]-DMHCA y tratamiento control con PEG-[G1]-CO_2H).

Por último, se evaluó la citotoxicidad *in vivo* del tratamiento con las micelas a través de un ensayo de caspasa 3/7. En las células de los mamíferos, se sabe que la apoptosis celular está acompañada de una mayor producción de caspasas por lo que en este estudio se analizó la activación de la caspasa-3 y 7. Se analizó la cantidad de estas proteasas en los ratones tratados y con la dosis experimental de 3 mg de DMHCA/kg de peso corporal/día y no se encontraron efectos citotóxicos a corto (72 h) y largo plazo (21 días).

En los capítulos 2 y 3 se ha trabajado con micelas de tipo PIC (por sus siglas en inglés, *polyion complex*). Este tipo de sistemas han despertado un gran interés en el campo del DD gracias a su fácil preparación en medio acuoso por interacción electrostática entre polímeros y/o biopolímeros de carga opuesta. A pesar de que se han descrito multitud de ejemplos con biopolímeros, como proteínas, péptidos o ácidos nucleicos, los ejemplos de micelas PIC que incorporan polisacáridos son escasos y por lo general poco estables frente a la fuerza iónica. Además, la imposibilidad de regular

el tamaño de este tipo de sistemas sigue siendo una limitación de este tipo de sistemas. En nuestro grupo de investigación se han descrito micelas PIC estables a fuerzas iónicas muy superiores a las preparadas con polímeros lineales (hasta 3 M) a través de la sustitución del bloque lineal por un bloque dendrítico. La mayor estabilidad de estas micelas PIC dendríticas está asociada con la rigidez intrínseca y la naturaleza globular de los dendrímeros. Animados por estos resultados y atraídos por el creciente interés en los polisacáridos como fuentes renovables de biomateriales, la gran variedad estructural, biocompatibilidad, biodegradabilidad y alta densidad de carga, en el capítulo 2 se planteó la formación de micelas PIC estables a concentraciones salinas fisiológicas con un polisacárido catiónico, quitosano (CS) y dos aniónicos, alginato y ácido hialurónico (ALG y HA).

Para ello se sintetizó un copolímero de bloque PEG-dendrímero de tercera generación con una cadena de PEG de 5000 Da, y se llevó a cabo su funcionalización con ácido 4-etinil benzoico para dotarlo de carga negativa (PEG-[G3]-$PhCO_2Na$), y cloruro de 4-etinil bencilamonio para la carga positiva (PEG-[G3]-$BnNH_2$·HCl) (Esquema 4.1). Se evaluó el efecto estabilizador de estos copolímeros de bloque dendrítico usando una serie de polisacáridos de carga opuesta (CS carga positiva, ALG y HA, cargas negativas) de distintos pesos moleculares (Tabla 4.1).

La preparación de las micelas PIC se llevó a cabo en 10 mM PB pH 7.4 mezclando disoluciones de los componentes aniónicos y catiónicos en una relación estequiométrica de cargas. Tras 3 h de formación, se determinaron los tamaños de las micelas resultantes por DLS (Tabla 4.2). Como tendencia general, los polisacáridos con mayor DP, CS_{480}, ALG_{2140} y HA_{497}, no fueron capaces de formar micelas, obteniéndose disoluciones de polímero libre o agregados. Por el contrario, se lograron formar micelas con el resto de polisacáridos confirmando el efecto estabilizador de los copolímeros de bloque PEG-dendrímero. Las micelas, con tamaños en el rango de 30 a 100 nm, fueron estables en presencia de 150 mM NaCl y 37 ºC durante al menos 24 h, a excepción de las formadas con CS_{172} y ALG_{1040} que agregaron durante el calentamiento (Tabla 4.2). Además, los menores tamaños y PDI corresponden con los DP más bajos, un efecto no observado previamente en micelas PIC.

A pesar de que lo esperable fuese lo contrario, es decir, una mayor estabilización de la micela para polisacáridos más grandes gracias a una contribución electrostática más fuerte en el núcleo de la micela, su elevada rigidez y marcada tendencia a la agregación se traducen en una interacción electrostática menos eficiente. Esto se confirmó analizando la estabilidad a largo plazo a 37 ºC de la serie de las micelas formadas con ALG (DP 21, 168, 389 y 694), siendo más estables las micelas de ALG_{21} y ALG_{168} (más de 2 semanas), frente a las de ALG_{389} (4 días) y ALG_{694} (1.5 días). Otro efecto que se observó fue que los mayores tamaños de las micelas se obtuvieron para los polisacáridos con mayor DP, confirmando la tendencia de los polisacáridos de elevado peso molecular a producir micelas más grandes y menos compactas.

Tras confirmar el efecto estabilizador de los copolímeros de bloque PEG-dendrímero en la formación de micelas PIC con polisacáridos, se estudió el comportamiento de copolímeros de bloque lineales en la formación de estas micelas. Para ello se utilizó la serie de ALG y PEG-PLL_{27} como copolímero lineal catiónico con un PEG del mismo peso molecular (5000 Da) e idéntico número de cargas que el PEG-[G3]-$BnNH_2$ (poli-

L-lisina con un DP de 27). Como se puede ver en la Tabla 4.2 y confirmando de nuevo las ventajas de la arquitectura dendrítica, solo se consiguió formar micelas con ALG_{21} y ALG_{168} que agregaron después de calentar a 37 ºC.

A continuación, se llevó a cabo la determinación de la eficiencia de formación de las micelas de la serie de ALG a través de la cuantificación del PEG-[G3]-$BnNH_2$ libre tras la formación, obteniéndose en todos los casos unas eficiencias de formación mayores del 95%. También se estudió el potencial z de las micelas, obteniéndose para los tres polisacáridos valores cercanos a cero (−0.78 mV para CS_{35}, −1.38 mV para ALG_{21}, −1.92 mV para HA_{71}), consistentes con una alta estabilidad coloidal, estructura *core*-corona y carga estequiometría de los componentes.

Se estudió también la estabilidad de las micelas de CS y ALG a la liofilización, propiedad relevante para aplicaciones de DD, y se comprobó que las micelas formadas con CS_{35} y ALG_{21} mantenían su tamaño y PDI tras la resuspensión. Además, la visualización mediante AFM y cryo-TEM de estructuras esféricas con diámetros medios de acuerdo con los obtenidos por DLS permitió confirmar estos datos (Figura 4.2C,D).

Para estudiar el potencial uso como DDS de estas micelas, se evaluó la citotoxicidad y capacidad de internalización en la línea celular A549. Los ensayos de viabilidad celular se llevaron a cabo usando el MTT y no se observó citotoxicidad de las micelas incluso a las concentraciones más altas (Figura 4.2J), lo que nos animó a estudiar la internalización celular. Para ello se incubaron las células con las micelas de ALG_{21} y CS_{35} marcadas con una etiqueta fluorescente (AF488 y FITC, respectivamente) durante 4 h. La capacidad de internalización de las micelas se pudo evaluar usando microscopía de fluorescencia y observándose la colocalización de las micelas con LysoTracker Red, un marcador de endosoma/lisosoma (Figura 4.2E,H). Con estos resultados y teniendo en cuenta las diferentes estabilidades de las micelas en función del DP del polisacárido, se exploró su potencial para la liberación intracelular controlada de fármacos de bajo peso molecular.

Se seleccionó el fármaco doxorrubicina (DOX) debido a su carácter fluorescente y su posible uso como como sonda en la evaluación de la estabilidad y compactación de las micelas en función del DP del polisacárido. Para ello se seleccionaron tres micelas de ALG con distinto DP (21, 168 y 389) y se llevó a cabo la encapsulación de la DOX sin observarse diferencias por DLS con las originales, determinándose unas eficiencias de encapsulación del 56, 54 y 50% para las micelas de ALG_{21}, ALG_{168} y ALG_{389} respectivamente. Se midió la emisión de fluorescencia de estas micelas y una disolución de DOX. Se observó que la fluorescencia de la DOX en el interior de las micelas sufría un proceso de *quenching*, siendo menor que la del fármaco libre. Este proceso de *quenching* se hizo más evidente a medida que se reducía el DP del ALG, obteniéndose los mayores valores de fluorescencia para las micelas de ALG_{389} y los más bajos para el ALG_{21}. Esta atenuación de la fluorescencia, resultante de la mayor proximidad de las moléculas de DOX en el *core*, se debe a la mayor compactación de las micelas formadas con los ALG de menor DP, obteniéndose factores de atenuación frente a la DOX libre de 11.1×, 7.7× y 4.5× para las micelas de ALG_{21}, ALG_{168} y ALG_{389} respectivamente (Figura 4.3B). Este comportamiento también se observó a través del estudio de la liberación de DOX de las micelas a pH 5.0 simulando condiciones de endosoma/lisosoma (Figura 4.3C). Tras 72 h, la mayor liberación del fármaco se

obtuvo para las micelas de menor DP y por tanto menos compactas, mientras que la menor liberación se produjo con las micelas más compactas de ALG_{21} (50% liberación para ALG_{389}, 39% para ALG_{168} y 25% para ALG_{21}). La liberación de DOX de las micelas también se estudió en 90% de FBS a 37 °C obteniéndose la misma tendencia, después de 24 h se observó la mayor liberación para las micelas de mayor DP mientras que las micelas formadas con polisacáridos de menor peso molecular liberaron menos DOX (10% para ALG_{21}, 15% para ALG_{168} y 22% para ALG_{389}). En conjunto, todos estos resultados confirmaron que el peso molecular del polisacárido es determinante para las propiedades de compactación, estabilidad y liberación de las micelas PIC dendríticas.

Una vez se estudiaron las micelas PIC con polisacáridos y el efecto del peso molecular sobre sus propiedades se estudió en células A549 su posible explotación como DDS capaces de controlar la cinética de liberación intracelular del fármaco y su citotoxicidad.

Se estudiaron las micelas por citometría de flujo y se observó que para las células tratadas con DOX libre y las micelas de ALG_{21}, ALG_{168} y ALG_{389} cargadas de DOX durante 1 h se obtuvieron intensidades de fluorescencia y porcentajes de células positivas muy similares de entre 85 y 88% (Figura 4.4A). A pesar de que la DOX presenta una ruta de internalización celular diferente a la de las micelas, se sabe que su pequeño tamaño y su hidrofobicidad facilitan su internalización por difusión pasiva. Se estudió el tráfico intracelular de los sistemas frente a la DOX libre mediante microscopía de fluorescencia tras 1 h de incubación en células A549. Mientras que la DOX libre se pudo detectar en núcleo por la colocalización con Hoechst, las micelas colocalizaron con LysoTracker Green, claro indicativo de la internalización del sistema intacto por endocitosis (Figura 4.4B).

Con los datos de liberación de DOX previamente descritos se decidió estudiar a tiempos más largos el tráfico intracelular de las micelas. Tras 5 h de incubación adicional se observó que la DOX en las micelas con polisacáridos de menor DP y por tanto más compactas (ALG_{21} y ALG_{168}) permanecía en endosoma/lisosoma, mientras que, para las micelas menos compactas de ALG_{389}, se pudo observar colocalización en el núcleo celular (Figura 4.4B).

Finalmente, se explotó este control sobre la cinética de liberación de las micelas para ajustar la citotoxicidad *in vitro* de las micelas en función del peso molecular del polisacárido. Para ello se llevaron a cabo estudios de MTT en células A549 a 48 h, obteniéndose valores de IC_{50} dependientes del peso molecular del ALG siendo 3.55 μM para ALG_{21}, 1.75 μM para ALG_{168} y 1.17 μM para ALG_{389} (Figura 4.4C).

Como ya se ha comentado, la regulación del tamaño de las micelas PIC sigue siendo un factor limitante importante para el desarrollo de implantes locales o modelos protocelulares. En el capítulo 3 decidimos explorar la regulación del tamaño de estos sistemas a través del control de la proporción de PEG en la mezcla de los componentes empleados en su preparación.

Aprovechando que la estructura *core*-corona es capaz de confinar los componentes cargados en el *core*, se propuso regular el tamaño de micelas PIC derivadas de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ y PLL mediante el empleo de proporciones variables de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ y el dendrímero no PEGuilado 3[G2]-$PhCO_2Na$, ambos con idéntica

estructura y número de grupos terminales. Manteniendo una relación estequiométrica de cargas y siempre que el componente PEGuilado mantuviera su preferencia por situarse en la corona de las micelas, consideramos la posibilidad de incrementar de forma sustancial el tamaño de micelas PIC mediante una reducción progresiva de la proporción entre PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ y 3[G2]-$PhCO_2Na$. La interacción de 3[G2]-$PhCO_2Na$ y PLL_{101} quedaría confinada y estabilizada en el *core* gracias a la corona de PEG, lo que permitiría la formación de estructuras de mayor tamaño (Figura 5.1).

Para ello se sintetizó el copolímero de bloque PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ siguiendo un procedimiento previamente descrito por nuestro grupo de investigación (Figura 7.1 y Esquema 4.1). De forma similar, el dendrímero aniónico 3[G2]-$PhCO_2Na$ se sintetizó a partir de 3[G2]-N_3 (Figura 7.2C) mediante una reacción CuAAC entre sus azidas terminales y ácido 4-etinilbenzoico, tras lo que se evaluó la preparación de micelas con diferentes proporciones de PEG. Para ello se añadió una cantidad fija de PLL_{101} en disolución sobre mezclas PEG-[G3]-$PhCO_2Na$/3[G2]-$PhCO_2Na$ de proporción variable, manteniéndose una relación estequiométrica de cargas. Las micelas resultantes, preparadas en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl, se analizaron por DLS y tras el análisis se observó que a medida que disminuye la proporción de PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ aumentando la de 3[G2]-$PhCO_2Na$, el tamaño varía desde 38 nm para un 100% de PEG hasta aproximadamente 850 nm para el 0.5% con bajos valores de PDI en todos los casos (Figura 5.2). Cuando se probó a reducir aún más la cantidad de PEG condujo a la agregación y/o precipitación del sistema, indicativo de la importancia del PEG en la superficie de las micelas a la hora de proporcionar estabilidad coloidal.

Esta gran variación en el tamaño confirma la hipótesis de partida por la cual es posible incrementar el tamaño de micelas PIC mediante una regulación del porcentaje de PEG a través del confinamiento de los componentes cargados en su *core*. Como se puede ver en la variación del radio de las micelas con el porcentaje de PEG (Figura 5.2D), el tamaño sufre una reducción lenta en el rango 20-100% PEG, que posteriormente se acelera de forma drástica a menores porcentajes de PEG. La relación entre el porcentaje de PEG y los radios obtenidos experimentalmente se ajusta perfectamente a una curva exponencial de orden -1.32 respecto al radio de las micelas ($\%PEG = A \cdot r^{-1.32}$). Esta ecuación mostrada en la Figura 5.2D constituye una herramienta extremadamente útil para la obtención de micelas a la carta de cualquier tamaño comprendido entre 40 y 850 nm mediante selección del porcentaje de PEG adecuado.

La posibilidad de formar micelas con un rango de tamaños tan amplio y en un solo paso, junto a la capacidad de predecir su tamaño en función de la proporción de componente PEGuilado nos animó a analizar en profundidad el modelo de agregación propuesto y a desarrollar ecuaciones que permitiesen predecir la variación teórica del número de partículas (*N*) y la superficie total de las mismas (*S*) en función del porcentaje de PEG. Para se asumió que las micelas presentan una estructura esférica y que el volumen total de *cores* (*V*, compuesto por los componentes cargados) es independiente de la cantidad de PEG en superficie. También se consideró que el volumen de la corona de PEG es despreciable frente al de la micela, algo perfectamente asumible a medida que aumenta el tamaño de las micelas. Teniendo esto en cuenta se desarrollaron una serie de ecuaciones que

relacionan los valores de *N*, *S* y *D* (densidad de PEG en la superficie de las micelas) con el radio (*r*) y, por consiguiente, el porcentaje de PEG de las micelas (Ecuaciones 5.3, 5.6 y 5.8).

El análisis de las ecuaciones permite predecir que la disminución del porcentaje de PEG resulta en una drástica reducción del número de partículas (*N*), que es proporcional al cubo de la relación de radio. Respecto a la superficie de partículas, a pesar de que al disminuir el porcentaje de PEG se incrementa el tamaño de las micelas y, consiguientemente, su superficie con el cuadrado del radio, la superficie total de partículas disminuye proporcionalmente a la relación de radios debido a la dependencia de *N* con el cubo de los radios. También se obtuvo una ecuación para determinar la variación de la densidad de PEG (*D*) en la superficie de las micelas en función de los radios y las cantidades de componente PEGuilado empleado, que se definió como la ratio entre el número de moles de PEG utilizados en la su preparación y la superficie total de micelas.

Partiendo de los tamaños obtenidos por DLS, se utilizaron estas ecuaciones para obtener los valores relativos de *N*, *S* y *D* para cada porcentaje de PEG (Figura 5.3 azul). En un primer análisis, se observa que tanto *N*, como *S* y *D* disminuyen de forma exponencial al reducir el porcentaje de PEG, con órdenes cercanos a 2.4 para *N*, a 0.7 para *S* y a 0.4 para *D*. Que estas variaciones sigan las tendencias predichas, apoya el modelo de agregación propuesto. Sin embargo, el apoyo más firme al modelo se obtuvo cuando el valor de %PEG en las ecuaciones mostradas en la Figura 5.3 se sustituyó por la ecuación de la Figura 5.2D que relaciona %PEG con los valores experimentales de *r* obtenidos por DLS (%PEG = A · $r^{-1.32}$), obteniéndose que la N relativa es inversamente proporcional al cubo del radio ($r^{-3.17}$), mientras que las *S* y *D* relativas son inversamente proporcionales al radio ($r^{-0.92}$) en coincidencia muy cercana con las predicciones mostradas para estas variaciones.

Con respecto a la variación de la *D* relativa con el porcentaje de PEG (Figura 5.3C, línea azul), a medida que este decrece y el tamaño de las micelas aumenta, la densidad de PEG en la superficie disminuye de forma exponencial. Este hecho explica que las micelas formadas con %PEG inferiores a 0.5 terminen agregando en disolución, ya que la densidad de PEG es tan baja que no es capaz de proporcionar suficiente estabilidad coloidal.

Con la intención de confirmar las tendencias obtenidas a partir de los datos de DLS se analizó toda la serie de micelas mediante SLS y se determinaron sus pesos moleculares, con lo que se pudo calcular de forma absoluta los valores de *N*, *S* y *D*. En las medidas de las muestras de 100 y 80% de PEG se detectó la presencia de una segunda caída del vector de dispersión *q*, correspondiente con una población de partículas diferente a las micelas e invisibles por DLS. Para evitar una determinación de peso molecular errónea, ambas muestras fueron filtradas a través de un filtro de nylon de 0.45 µm antes de la realización de las medidas. Tras la eliminación de estas especies, se pudo confirmar por UV-Vis que su proporción en las disoluciones originales era inferior al 3% de la masa total de muestra. Con estos datos de peso molecular y sabiendo la concentración de los componentes se determinó el número de agregación de cada componente por micela, así como el número de micelas (*N*) que, junto con los radios determinados por DLS, sirvieron para la determinación de *S* y *D* usando las ecuaciones anteriormente descritas (Tabla 5.2).

Estos datos se representaron frente al porcentaje de PEG (en rojo, Figura 5.3) y se compararon con las tendencias relativas obtenidas en base a los datos de DLS (en azul). Ambas series de datos se superponen perfectamente en el rango 0.5-60% de PEG, lo que confirma ahora con medidas absolutas el modelo propuesto. Sin embargo, en el caso de las micelas de 80 y 100% de PEG se puede apreciar una desviación en la tendencia de los datos absolutos, que podría explicarse bien porque estas micelas no sean completamente esféricas o porque presentan PEG en el interior del *core*, lo que las haría apartarse del modelo propuesto. Con la intención de aclarar este punto, pretendemos estudiar la esfericidad de estas micelas en función del porcentaje de PEG a través de la relación entre el radio de giro (R_g) y el radio hidrodinámico.

A continuación, se llevó a cabo un estudio morfológico de los sistemas mediante cryo-TEM para confirmar la naturaleza micelar de estos ensamblados PIC. Se seleccionaron siete porcentajes de PEG correspondientes a micelas con tamaños representativos de toda la serie. El análisis por cryo-TEM reveló la presencia de estructuras esféricas compactas con diámetros medios coincidentes con los obtenidos por DLS (Figuras 5.4A-G). No obstante, existe una mínima diferencia entre el tamaño de DLS frente al determinado por cyro-TEM (Figura 5.4H). Para las micelas de menor tamaño, se ha descrito que habitualmente las cadenas de PEG se vuelven invisibles al haz de electrones que utiliza esta técnica, lo que provoca una aparente reducción en el tamaño. En el caso de las micelas con mayores tamaños para que las imágenes puedan tener un contraste adecuado, el espesor del hielo no puede ser muy grande, por lo que las partículas con tamaños mayores que el propio espesor del hielo (aproximadamente 1 µm) son retenidas fuera de la rejilla en el proceso de vitrificación.

También se llevó a cabo una caracterización más exhaustiva de las micelas midiendo el potencial z de toda la serie y se observó que aquellas que tenían mayores cantidades de PEG presentaban valores cercanos a cero. Pero a medida que se reduce la densidad de PEG se puede observar una clara tendencia a volverse más negativo (Figura 5.2C). Este dato refuerza la tendencia en la variación de la densidad de PEG sobre la superficie de las micelas obtenida en los cálculos previos, puesto que a medida que se reduce la densidad de PEG, la carga del *core* queda más expuesta.

No obstante, estos datos podrían deberse a la presencia de especies libres que no formen parte de la micela. Para descartar esta posibilidad, se llevó a cabo la cuantificación de la cantidad de PLL_{101} libre en disolución tras la formación de las micelas y se observó que en todos los casos analizados se obtuvieron eficiencias mayores del 98%. Además, se realizó un experimento control para confirmar que todo el PEG-[G3]-$PhCO_2Na$ y el 3[G2]-$PhCO_2Na$ forman parte de la micela sometiendo a las del 5% a un proceso de ultracentrifugación, eliminación del sobrenadante y resuspensión. Mediante este proceso cualquier especie aniónica libre en disolución es eliminada con el sobrenadante mientras que la micela queda depositada en la parte inferior, pudiendo resuspenderla y volver a medir su potencial z que, al no observarse variaciones significativas en su valor, se descartó la presencia de especies aniónicas libres.

Puesto que la hipótesis inicial se basa en que este tipo de sistemas presentan una estructura *core*-corona, se decidió llevar a cabo un último experimento para analizar la estructura de las micelas de mayor tamaño. Para ello se formó una micela con 0.5%

de FITC-PEG-[G3]-$PhCO_2Na$, que incorpora una fluoresceína en el extremo terminal del PEG, y una PLL_{101} funcionalizada con Cy5. Tras el análisis de estas micelas marcadas fluorescentemente mediante microscopía confocal se pudo comprobar que el PEG (verde) se encuentra formando parte de la corona mientras que la PLL (rojo) junto con el 3[G2]-$PhCO_2Na$ están confinados en el *core* de la micela (Figura 5.5).

En el capítulo 4 se explotó la multivalencia de los dendrímeros y la experiencia de nuestro grupo de investigación con affidendrons para sintetizar un aptadendrímero. Los aptadendrímeros son conjugados que incorporan aptámeros, biomoléculas de reconocimiento con estructuras de ácidos nucleicos, sobre la superficie de un dendrímero para mejorar la especificidad y afinidad que el aptámero monovalente tiene por sus receptores. Se escogió el aptámero G-*quadruplex* (G4) AT11, una versión modificada de AS1411 que es capaz de reconocer a la proteína nucleolina (NCL) sobreexpresada en células cancerosas. Tras la unión al receptor, el AS1411 puede interferir en las funciones oncogénicas de la célula y ha demostrado la capacidad de inducir respuestas duraderas en pacientes con cánceres intratables.

La bioconjugación del aptámero AT11 sobre la superficie del dendrímero de cuarta generación 2[G4]-N_3 se llevó a cabo a través de una reacción SPAAC entre los grupos azida del dendrímero y un grupo DBCO previamente incorporado sobre el aptámero. Para la funcionalización del AT11 con un grupo DBCO se partió de una versión del aptámero modificada con un grupo amino terminal (AT11-NH_2) sobre el que se hizo reaccionar un exceso de una cadena de PEG_{13} que incorpora un éster activo y un DBCO sobre sus extremos (DBCO-PEG_{13}-NHS). La longitud de la cadena de PEG se eligió para aumentar la hidrofilia del conjugado final, así como la distancia entre el dendrímero y el aptámero, evitando posibles problemas de impedimento estérico sobre la superficie del dendrímero y dotando al aptámero de una mayor flexibilidad. El exceso de DBCO-PEG_{13}-NHS se purificó por diálisis y se obtuvo el conjugado AT11-PEG_{13}-DBCO con un rendimiento del 89% (Figura 6.2A). Se confirmó la completa funcionalización del aptámero mediante espectroscopía UV-Vis usando sus absorciones características a 280 y 309 nm. Este aptámero modificado se empleó para la bioconjugación con el dendrímero 2[G4]-N_3 a través de una SPAAC en DMSO a 37 ºC. El seguimiento de la reacción se realizó mediante PAGE usando una escalera de concentraciones de AT11-PEG_{13}-DBCO libre y comparándolo con la mezcla de reacción hasta que no se detectó aptámero libre (Figura S6.2).

Se probó la incorporación de distintas cantidades de AT11, en concreto 8, 17 y 34 aptámeros por dendrímero. Los productos obtenidos de la incorporación de 8 y 17 aptámeros presentaron problemas de agregación y baja solubilidad, mientras que el aptadendrímero con 34 unidades de AT11 fue perfectamente soluble y no mostró agregados. Es por esto que, decidimos fijar en 34 los aptámeros por dendrímero para continuar con el estudio. Además, se marcó el aptadendrímero con un fluoróforo de cianina-5 acoplado a un DBCO (Cy5-DBCO) usando también una reacción SPAAC para su posterior estudio *in vitro*. Tras la purificación por ultrafiltración (Amicon, MWCO 3 kDa) para la eliminación de cualquier resto de Cy5 que no hubiese reaccionado, se obtuvo el aptadendrímero 2[G4]-$(N_3)_{127}$/$(AT11)_{34}$/$(Cy5)_1$ con un rendimiento del 97% (Figura 6.2B) sobre el que se determinó una carga de Cy5 de 1 usando de nuevo espectroscopía UV-Vis (Figura S6.3). Además, se comprobó la presencia de Cy5 por espectroscopía de fluorescencia (Figura S6.4).

Una vez realizada la síntesis del aptadendrímero, se comprobó mediante espectroscopía CD la capacidad del AT11 conjugado sobre la superficie del dendrímero de formar la estructura G-*quadruplex* (G4). El análisis del espectro de CD mostró un perfil característico de la topología de este tipo de estructuras con bandas positivas y negativas a 260 y 240 nm, respectivamente. Se observó también la aparición de una banda extra en torno a los 280 nm, que puede explicarse por la generación de un centro quiral en la conjugación de AT11 (Figura S6.5).

Se evaluó también el tamaño y la carga del conjugado final mediante medidas de DLS y LDA, obteniéndose un tamaño de 3.1 nm (Figura S6.6) y un potencial zeta de -22.2 mV. El tamaño y el carácter aniónico del aptadendrímero coincide con el descrito para sistemas similares y resulta adecuado para la internalización celular. Además, el potencial zeta negativo confirma la incorporación del aptámero sobre la superficie del dendrímero ya que el AT11 presenta carga negativa debida a los grupos fosfato mientras que el dendrímero presenta una estructura con carga neutra.

En colaboración con el grupo de la profesora Carla Cruz, se estudió la complejación de un fármaco antitumoral a estos aptadendrímeros, así como su capacidad de internalización celular y citotoxicidad. Se evaluó la carga y la interacción del ligando C_8 (*acridine orange*) que actúa como fármaco anticancerígeno y estabilizador de la estructura G4 del AT11. Se llevó a cabo un estudio de *molecular docking* en el que se determinó que el C_8 interactúa favorablemente con la estructura G4 del AT11 (Figura 6.3). También se observaron interacciones con la estructura de la unidad de repetición dendrítica GATG (Figura S6.7). A continuación, se llevó a cabo la encapsulación del ligando C_8 en el aptadendrímero y no se observaron cambios en el tamaño ni en la carga del conjugado final. La eficiencia de encapsulación se determinó por fluorescencia, obteniéndose un 98%. Además, se comprobó su encapsulación a través de estudios de anisotropía de fluorescencia, revelando que el volumen hidrodinámico de C_8 aumentó en presencia del aptadendrímero a la vez que la velocidad de rotación disminuye en comparación con el ligando libre. Se evaluó el perfil de liberación de C_8 del aptadendrímero durante 48 h en buffer fosfato 20 mM pH = 6.9 suplementado con 65 mM de KCl. Se observó una mayor y más rápida liberación a partir de las 4 h de estudio, obteniéndose una completa liberación a las 12 h (Figura 6.6).

Para los ensayos *in vitro*, se llevó a cabo un primer estudio de la viabilidad celular en dos líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3 y DU-145) y una línea celular no cancerosa (PNT1A). Se determinó mediante el ensayo MTT, incubando AT11, C_8-AT11, aptadendrímero y C_8-aptadendrímero durante 3 días. El aptadendrímero presentó mayores citotoxicidades que el aptámero AT11 libre en todas las líneas celulares. En cuanto al conjugado C_8-aptadendrímero, se observó una toxicidad similar tanto para las células cancerosas como para las no malignas, lo que apunta a una falta de selectividad del sistema (Figura 6.7).

Para la evaluación de la internalización celular se realizó un primer estudio a 1 h en una la línea celular cancerosa, PC-3 y una sana, PNT1A. En ambas líneas celulares se observó una rápida internalización no mediada por nucleolina (NCL) al no colocalizar el aptadendrímero con un anticuerpo NCL. Puesto que en estudios anteriores de nuestros colaboradores fueron capaces de demostrar la colocalización de Cy5-AT11 y C_8-AT11 con NCL, nos planteamos un estudio para aclarar el mecanismo de

internalización del aptadendrímero. Se incubaron de nuevo las células con nuestro sistema a baja temperatura (4 °C), puesto que a bajas temperaturas las células reducen su metabolismo y la rigidez de la membrana aumenta, bloqueando así la internalización por difusión pasiva. La ausencia de fluorescencia de Cy5 en ambas líneas celulares demostró que la internalización no se basa en el transporte pasivo sino en otra vía. Además, un estudio posterior con LysoView 540 demostró la presencia del sistema en lisosoma. Se estudió también el efecto sobre la internalización de la conjugación del ligando C_8 sobre el aptadendrímero y no se observaron diferencias significativas.

Por último, se comparó la capacidad para la salida del aptadendrímero de lisosoma en células PC-3 y PNT1A, observándose que las células PC-3 parecen internalizar más fácilmente el aptadendrímero que las PNT1A. Además, a través de un análisis más detallado de los coeficientes de colocalización se detectó la presencia del aptadendrímero en etapas tardías de lisosoma, lo que puede indicar que el sistema no es liberado y tiende a degradarse en su interior (Figura 6.8).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido.

Ahora es el momento de comprender más, para temer menos.

Marie Curie

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8. CONCLUSIONES

En esta Tesis Doctoral se ha sintetizado un polímero terapéutico que incorpora DMHCA sobre el copolímero de bloque PEG-[G1]-N_3, generando una especie anfifílica capaz de formar micelas estables de tamaño nanométrico. El efecto terapéutico *in vivo* de estas micelas ha resultado en un incremento significativo de los niveles de ApoE y la consecuente reducción de la concentración de péptido *β*-amiloide en las zonas de interés, sin observarse incremento en los niveles de colesterol y triglicéridos.

Usando copolímeros de bloque PEG-dendrímero cargados se ha evaluado la formación y estabilidad de micelas PIC con polisacáridos de carga opuesta de diferentes pesos moleculares. Se ha demostrado que existe una dependencia entre la estabilidad de las micelas y el peso molecular de los polisacáridos, obteniéndose micelas más estables y con menores PDI con polisacáridos de menor peso molecular. Esta dependencia ha sido explotada para regular la encapsulación, liberación y citotoxicidad del fármaco antitumoral doxorrubicina.

Se ha demostrado la posibilidad de regular el tamaño de micelas PIC dendríticas entre 40 y 850 nm mediante control del porcentaje de PEGuilación del componente dendrítico cargado. A partir de los datos de los tamaños determinados por DLS se ha propuesto un modelo de agregación en el que el copolímero de bloque se sitúa en la corona de la micela, alrededor de un *core* compuesto por el dendrímero no PEGuilado y un poliaminoácido de carga opuesta. Este modelo permite predecir la variación en el número y superficie de micelas, y la densidad de PEG en superficie a lo largo de la serie, tendencias que han sido posteriormente confirmadas mediante estudios de SLS. Estos resultados combinados con un análisis por cryo-TEM y la demostración por microscopía confocal de la presencia de PEG solo en la corona de las micelas, ha permitido confirmar el modelo de agregación propuesto.

Por último, se ha sintetizado un aptadendrímero multivalente mediante una reacción SPAAC entre el dendrímero 2[G4]-N_3 y 34 unidades del aptámero AT11 funcionalizado con DBCO. Tras la reacción de conjugación, el aptámero ha demostrado mantener su capacidad de adoptar una estructura de G4-*quadruplex* y complejar el ligando C_8, una molécula con propiedades antitumorales, que posteriormente pudo ser liberada de forma sostenida. Se ha demostrado que la internalización celular del conjugado se produce por endocitosis no mediada por nucleolinas, que se traduce en un efecto citotóxico no selectivo en estudios con líneas celulares sanas y de cáncer de próstata.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Equipado con sus cinco sentidos, el hombre explora el universo
que lo rodea y a sus aventuras las llama ciencia.
Edwin Powell Hubble

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1: Liver X receptor activation with an intranasal polymer therapeutic prevents cognitive decline without altering lipid levels

Título	**Liver X receptor activation with an intranasal polymer therapeutic prevents cognitive decline without altering lipid levels**		
Revista	**ACS Nano**	Editorial	**American Chemical Society**
Año publicación	**2021**	DOI	**10.1021/acsnano.0c09159**
Volumen	**15**	Páginas	**4678-4687**
ISSN	**1936-0851**	EISSN	**1936-086X**
Factor de impacto	**18.027**	Cuartil	**Q1**

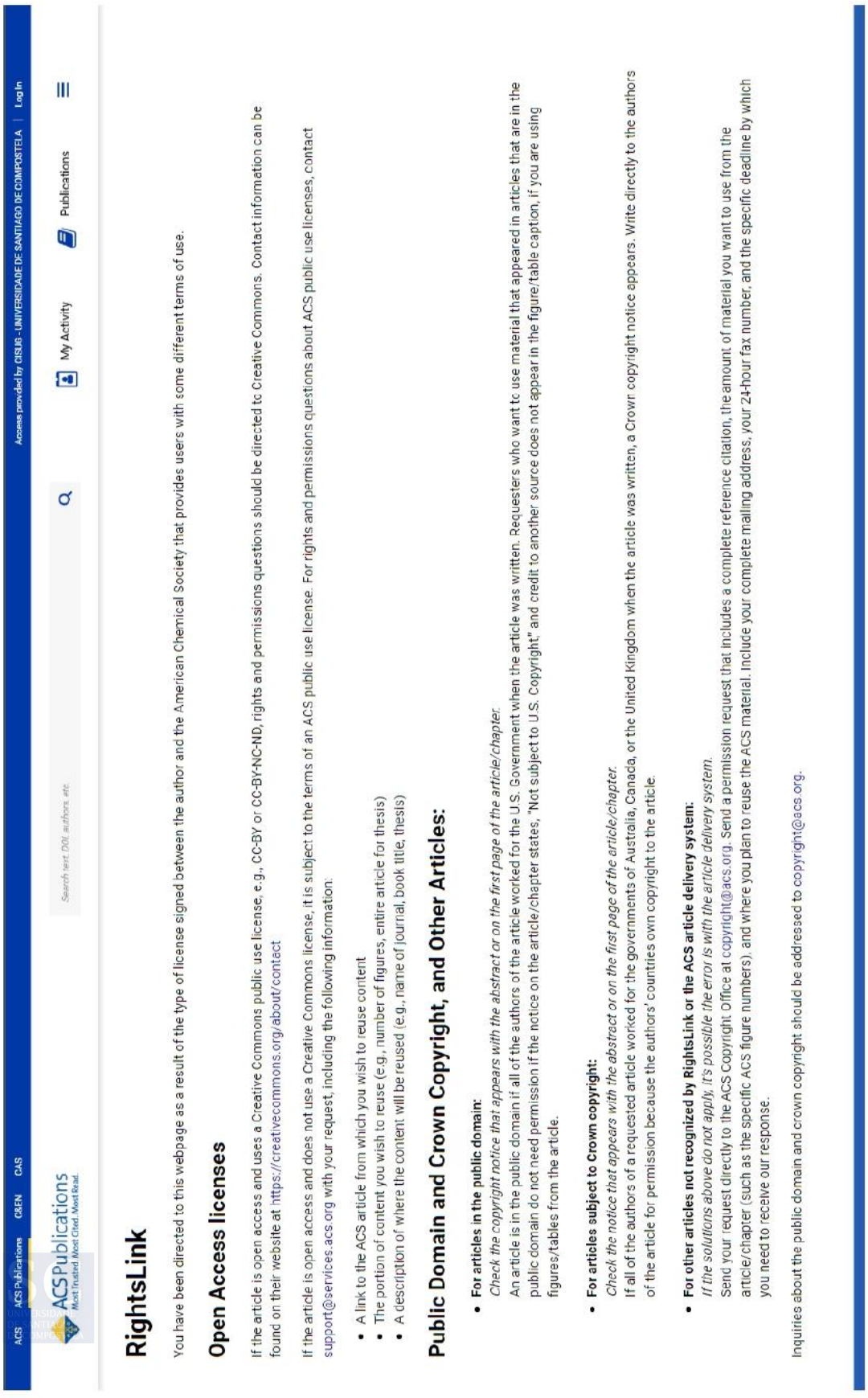
Autores	1. María Eugenia Navas Guimaraes[†,a] 2. Roi Lopez-Blanco[†,b] 3. Juan Correa[b] 4. Marcos Fernandez-Villamarin[b] 5. María Beatriz Bistué[c] 6. Pamela Martino-Adami[d] 7. Laura Morelli[d] 8. Vijay Kumar[e] 9. Michael F. Wempe[e] 10. A. C. Cuello[f] 11. Eduardo Fernandez-Megia[b]* 12. Martin A. Bruno[a]*
Filiación	[a]Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica de Cuyo, 5400 San Juan, Argentina; National Council of Scientific and Technical Research (CONICET), C1425FQB Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. [b]Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS) and Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain. [c]Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica de Cuyo, 5400 San Juan, Argentina [d]Laboratory of Brain Aging and Neurodegeneration, Fundación Instituto Leloir, C1405BWE Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina [e]School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Colorado, Aurora, Colorado 80045, United States [f]Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec H3G 1Y6, Canada
Contribución	[†]Primera autoría del artículo compartida. ▪ Conceptualización: ideas, formulación y diseño. ▪ Análisis, investigación y metodología: síntesis y caracterización de los conjugados de DMHCA. Estudio y caracterización de las micelas. Análisis de datos. ▪ Visualización: preparación y creación de datos, figuras, etc. ▪ Redacción: borrador inicial, revisión y edición.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Enlace revista: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c09159

Permiso revista:



ACS Publications C&EN CAS — Access provided by CISUG - UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA | Log In

ACSPublications — Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Search text, DOI, authors, etc. — My Activity — Publications

RightsLink

You have been directed to this webpage as a result of the type of license signed between the author and the American Chemical Society that provides users with some different terms of use.

Open Access licenses

If the article is open access and uses a Creative Commons public use license, e.g., CC-BY or CC-BY-NC-ND, rights and permissions questions should be directed to Creative Commons. Contact information can be found on their website at https://creativecommons.org/about/contact

If the article is open access and does not use a Creative Commons license, it is subject to the terms of an ACS public use license. For rights and permissions questions about ACS public use licenses, contact support@services.acs.org with your request, including the following information:

- A link to the ACS article from which you wish to reuse content
- The portion of content you wish to reuse (e.g., number of figures, entire article for thesis)
- A description of where the content will be reused (e.g., name of journal, book title, thesis)

Public Domain and Crown Copyright, and Other Articles:

- **For articles in the public domain:**
  Check the copyright notice that appears with the abstract or on the first page of the article/chapter.
  An article is in the public domain if all of the authors of the article worked for the U.S. Government when the article was written. Requesters who want to use material that appeared in articles that are in the public domain do not need permission if the notice on the article/chapter states, "Not subject to U.S. Copyright," and credit to another source does not appear in the figure/table caption, if you are using figures/tables from the article.

- **For articles subject to Crown copyright:**
  Check the notice that appears with the abstract or on the first page of the article/chapter.
  If all of the authors of a requested article worked for the governments of Australia, Canada, or the United Kingdom when the article was written, a Crown copyright notice appears. Write directly to the authors of the article for permission because the authors' countries own copyright to the article.

- **For other articles not recognized by RightsLink or the ACS article delivery system:**
  If the solutions above do not apply, it's possible the error is with the article delivery system.
  Send your request directly to the ACS Copyright Office at copyright@acs.org. Send a permission request that includes a complete reference citation, the amount of material you want to use from the article/chapter (such as the specific ACS figure numbers), and where you plan to reuse the ACS material. Include your complete mailing address, your 24-hour fax number, and the specific deadline by which you need to receive our response.

Inquiries about the public domain and crown copyright should be addressed to copyright@acs.org.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

9.2. Anexo 2: Polysaccharides meet dendrimers to fine-tune the stability and release properties of polyion complex micelles

Título	**Polysaccharides meet dendrimers to fine-tune the stability and release properties of polyion complex micelles**		
Revista	**Polymer Chemistry**	Editorial	**Royal Society of Chemistry**
Año publicación	**2019**	DOI	**10.1039/c9py00727j**
Volumen	**10**	Páginas	**4709-4717**
ISSN	**1759-9954**	EISSN	**1759-9962**
Factor de impacto	**5.342**	Cuartil	**Q1**
Autores	1. Roi Lopez-Blanco 2. Marcos Fernandez-Villamarin 3. Sorel Jatunov 4. Ramon Novoa-Carballal 5. Eduardo Fernandez-Megia*		
Filiación	Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS) and Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.		
Contribución	▪ Conceptualización: ideas, formulación y diseño. ▪ Análisis, investigación y metodología: síntesis y caracterización de los copolímeros de bloque cargados. Estudio y caracterización de las micelas. Estudio de la encapsulación de un fármaco antitumoral fluorescente, estudios de fluorescencia. Análisis de datos. ▪ Visualización: preparación y creación de datos, figuras, etc. ▪ Redacción: borrador inicial, revisión y edición.		

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Enlace revista: https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/py/c9py00727j

Permiso revista:

CCC Marketplace

Order Number: 1287726
Order Date: 08 Nov 2022

Payment Information

Roi López Blanco
r.lopez.blanco@usc.es
Payment method: Invoice

Billing Address:
Mr. Roi López Blanco
CIQUS - Universidade de S antiago de Compostela
C/ Jenaro de la fuente, s/n, Campus Vida
Santiago De Compostela, 15705
Spain

+34 881815764
r.lopez.blanco@usc.es

Customer Location:
Mr. Roi López Blanco
CIQUS - Universidade de S antiago de Compostela
C/ Jenaro de la fuente, s/n, Campus Vida
Santiago De Compostela, 15705
Spain

Order Details

1. Polymer Chemistry

Billing Status: Open

Article: Polysaccharides Meet Dendrimers to Fine-tune the Stability and Release Properties of Polyion Complex Micelles

Order License ID	1287726-1	**Type of use**	Republish in a thesis/dissertation
Order detail status	Completed	**Publisher**	Royal Society of Chemistry
ISSN	1759-9954	**Portion**	Chapter/article

0,00 EUR
Republication Permission

LICENSED CONTENT

Publication Title	Polymer Chemistry	**Rightsholder**	Royal Society of Chemistry
Article Title	Polysaccharides Meet Dendrimers to Fine-tune the Stability and Release Properties of Polyion Complex Micelles	**Publication Type**	Journal
		Start Page	4709
		End Page	4717
		Issue	34
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain)	**Volume**	10
Date	01/01/2010		
Language	English		
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		

REQUEST DETAILS

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Portion Type	Chapter/article	**Rights Requested**	Main product
Page Range(s)	4709-4717	**Distribution**	U.K. and Commonwealth (excluding Canada)
Total Number of Pages	9	**Translation**	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print, Electronic	**Copies for the Disabled?**	No
Who Will Republish the Content?	Academic institution	**Minor Editing Privileges?**	No
Duration of Use	Current edition and up to 5 years	**Incidental Promotional Use?**	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	**Currency**	EUR

NEW WORK DETAILS

Title	Nanosistemas dendríticos para transporte de fármacos	**Institution Name**	CIQUS - Universidade de Santiago de Compostela
Instructor Name	Eduardo Fernandez Megia	**Expected Presentation Date**	2023-02-15

ADDITIONAL DETAILS

The Requesting Person/Organization to Appear on the License	Roi López Blanco

REUSE CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	Nanosistemas dendríticos para transporte de fármacos	**Title of the Article/Chapter the Portion Is From**	Polysaccharides Meet Dendrimers to Fine-tune the Stability and Release Properties of Polyion Complex Micelles
Editor of Portion(s)	Lopez-Blanco, Roi; Fernandez-Villamarin, Marcos; Jatunov, Sorel; Novoa-Carballal, Ramon; Fernandez-Megia, Eduardo	**Author of Portion(s)**	Lopez-Blanco, Roi; Fernandez-Villamarin, Marcos; Jatunov, Sorel; Novoa-Carballal, Ramon; Fernandez-Megia, Eduardo
Volume of Serial or Monograph	10		
Page or Page Range of Portion	4709-4717	**Issue, if Republishing an Article From a Serial**	34
		Publication Date of Portion	2019-01-01

Total Items: 1

Subtotal: 0,00 EUR

Order Total: 0,00 EUR

Marketplace Order General Terms and Conditions

The following terms and conditions ("General Terms"), together with any applicable Publisher Terms and Conditions, govern User's use of Works pursuant to the Licenses granted by Copyright Clearance Center, Inc.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

("CCC") on behalf of the applicable Rightsholders of such Works through CCC's applicable Marketplace transactional licensing services (each, a "Service").

1) **Definitions.** For purposes of these General Terms, the following definitions apply:

"License" is the licensed use the User obtains via the Marketplace platform in a particular licensing transaction, as set forth in the Order Confirmation.

"Order Confirmation" is the confirmation CCC provides to the User at the conclusion of each Marketplace transaction. "Order Confirmation Terms" are additional terms set forth on specific Order Confirmations not set forth in the General Terms that can include terms applicable to a particular CCC transactional licensing service and/or any Rightsholder-specific terms.

"Rightsholder(s)" are the holders of copyright rights in the Works for which a User obtains licenses via the Marketplace platform, which are displayed on specific Order Confirmations.

"Terms" means the terms and conditions set forth in these General Terms and any additional Order Confirmation Terms collectively.

"User" or "you" is the person or entity making the use granted under the relevant License. Where the person accepting the Terms on behalf of a User is a freelancer or other third party who the User authorized to accept the General Terms on the User's behalf, such person shall be deemed jointly a User for purposes of such Terms.

"Work(s)" are the copyright protected works described in relevant Order Confirmations.

2) **Description of Service.** CCC's Marketplace enables Users to obtain Licenses to use one or more Works in accordance with all relevant Terms. CCC grants Licenses as an agent on behalf of the copyright rightsholder identified in the relevant Order Confirmation.

3) **Applicability of Terms.** The Terms govern User's use of Works in connection with the relevant License. In the event of any conflict between General Terms and Order Confirmation Terms, the latter shall govern. User acknowledges that Rightsholders have complete discretion whether to grant any permission, and whether to place any limitations on any grant, and that CCC has no right to supersede or to modify any such discretionary act by a Rightsholder.

4) **Representations; Acceptance.** By using the Service, User represents and warrants that User has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all Terms.

5) **Scope of License; Limitations and Obligations.** All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The License provides only those rights expressly set forth in the terms and conveys no other rights in any Works

6) **General Payment Terms.** User may pay at time of checkout by credit card or choose to be invoiced. If the User chooses to be invoiced, the User shall: (i) remit payments in the manner identified on specific invoices, (ii) unless otherwise specifically stated in an Order Confirmation or separate written agreement, Users shall remit payments upon receipt of the relevant invoice from CCC, either by delivery or notification of availability of the invoice via the Marketplace platform, and (iii) if the User does not pay the invoice within 30 days of receipt, the User may incur a service charge of 1.5% per month or the maximum rate allowed by applicable law, whichever is less. While User may exercise the rights in the License immediately upon receiving the Order Confirmation, the License is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if CCC does not receive complete payment on a timely basis.

7) **General Limits on Use.** Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) involves only the rights set forth in the Terms and does not include subsequent or additional uses, (ii) is non-exclusive and non-transferable, and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Terms. Upon completion of the licensed use as set forth in the Order Confirmation, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit, or obscene. In addition, User

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

8) **Third Party Materials.** In the event that the material for which a License is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) that are identified in such material as having been used by permission (or a similar indicator), User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service, if available, or otherwise) for any of such third party materials; without a separate license, User may not use such third party materials via the License.

9) **Copyright Notice.** Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any License granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Used with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc." Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either on a cover page or in another location that any person, upon gaining access to the material which is the subject of a permission, shall see, or in the case of republication Licenses, immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.

10) **Indemnity.** User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs, and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein and in the Order Confirmation, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy, or other tangible or intangible property.

11) **Limitation of Liability.** UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL, OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OR BOTH OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for the relevant License. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors, and assigns.

12) **Limited Warranties.** THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS." CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS, OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

13) **Effect of Breach.** Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the License set forth in the Order Confirmation and/or the Terms, shall be a material breach of such License. Any breach not cured within 10 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such License without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

14) **Additional Terms for Specific Products and Services.** If a User is making one of the uses described in this Section 14, the additional terms and conditions apply:

a) ***Print Uses of Academic Course Content and Materials (photocopies for academic coursepacks or classroom handouts).*** For photocopies for academic coursepacks or classroom handouts the following

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

additional terms apply:

i) The copies and anthologies created under this License may be made and assembled by faculty members individually or at their request by on-campus bookstores or copy centers, or by off-campus copy shops and other similar entities.

ii) No License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied) (ii) permit "publishing ventures" where any particular anthology would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any Publisher Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the academic pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to no more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular anthology, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) in the case of a photocopy permission, no materials may be entered into electronic memory by User except in order to produce an identical copy of a Work before or during the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted. In the event that User shall choose to retain materials that are the subject of a photocopy permission in electronic memory for purposes of producing identical copies more than one day after such retention (but still within the scope of any permission granted), User must notify CCC of such fact in the applicable permission request and such retention shall constitute one copy actually sold for purposes of calculating permission fees due; and

F) any permission granted shall expire at the end of the class. No permission granted shall in any way include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied).

iv) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the academic pay-per-use Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any photocopies sold or by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this License for any reason.

b) ***Digital Pay-Per-Uses of Academic Course Content and Materials (e-coursepacks, electronic reserves, learning management systems, academic institution intranets).*** For uses in e-coursepacks, posts in electronic reserves, posts in learning management systems, or posts on academic institution intranets, the following additional terms apply:

i) The pay-per-uses subject to this Section 14(b) include:

A) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for text-based content,** which grants authorizations to import requested material in electronic format, and allows electronic access to this material to members of a designated college or university class, under the direction of an

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

instructor designated by the college or university, accessible only under appropriate electronic controls (e.g., password);

B) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for material consisting of photographs or other still images not embedded in text,** which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorization: to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above, including any necessary resizing, reformatting or modification of the resolution of such requested material (provided that such modification does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material, and provided that the resulting modified content is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms), but not including any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material;

C) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks or other academic distribution for audiovisual content,** which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorizations: (i) to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above; (ii) to display and perform the requested material to such members of such class in the physical classroom or remotely by means of streaming media or other video formats; and (iii) to "clip" or reformat the requested material for purposes of time or content management or ease of delivery, provided that such “clipping” or reformatting does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms. Unless expressly set forth in the relevant Order Conformation, the License does not authorize any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material.

ii) Unless expressly set forth in the relevant Order Confirmation, no License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied or, in the case of Works subject to Sections 14(b)(1)(B) or (C) above, as described in such Sections) (ii) permit "publishing ventures" where any particular course materials would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any further limitations determined in the Rightsholder Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the electronic course content pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to not more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular materials, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) electronic access to material which is the subject of an electronic-use permission must be limited by means of electronic password, student identification or other control permitting access solely to students and instructors in the class;

F) User must ensure (through use of an electronic cover page or other appropriate means) that any person, upon gaining electronic access to the material, which is the subject of a permission, shall see:

- a proper copyright notice, identifying the Rightsholder in whose name CCC has granted permission,
- a statement to the effect that such copy was made pursuant to permission,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- a statement identifying the class to which the material applies and notifying the reader that the material has been made available electronically solely for use in the class, and
- a statement to the effect that the material may not be further distributed to any person outside the class, whether by copying or by transmission and whether electronically or in paper form, and User must also ensure that such cover page or other means will print out in the event that the person accessing the material chooses to print out the material or any part thereof.

G) any permission granted shall expire at the end of the class and, absent some other form of authorization, User is thereupon required to delete the applicable material from any electronic storage or to block electronic access to the applicable material.

iv) Uses of separate portions of a Work, even if they are to be included in the same course material or the same university or college class, require separate permissions under the electronic course content pay-per-use Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User is limited to use completed no later than the end of the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted.

v) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the electronic course content Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any electronic copies used by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this license for any reason.

c) ***Pay-Per-Use Permissions for Certain Reproductions (Academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting) (Non-academic internal/external business uses and commercial document delivery).*** The License expressly excludes the uses listed in Section (c)(i)-(v) below (which must be subject to separate license from the applicable Rightsholder) for: academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting; and non-academic internal/external business uses and commercial document delivery.

i) electronic storage of any reproduction (whether in plain-text, PDF, or any other format) other than on a transitory basis;

ii) the input of Works or reproductions thereof into any computerized database;

iii) reproduction of an entire Work (cover-to-cover copying) except where the Work is a single article;

iv) reproduction for resale to anyone other than a specific customer of User;

v) republication in any different form. Please obtain authorizations for these uses through other CCC services or directly from the rightsholder.

Any license granted is further limited as set forth in any restrictions included in the Order Confirmation and/or in these Terms.

d) ***Electronic Reproductions in Online Environments (Non-Academic-email, intranet, internet and extranet).*** For "electronic reproductions", which generally includes e-mail use (including instant messaging or other electronic transmission to a defined group of recipients) or posting on an intranet, extranet or Intranet site (including any display or performance incidental thereto), the following additional terms apply:

i) Unless otherwise set forth in the Order Confirmation, the License is limited to use completed within 30 days for any use on the Internet, 60 days for any use on an intranet or extranet and one year for any other use, all as measured from the "republication date" as identified in the Order Confirmation, if any, and otherwise from the date of the Order Confirmation.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ii) User may not make or permit any alterations to the Work, unless expressly set forth in the Order Confirmation (after request by User and approval by Rightsholder); provided, however, that a Work consisting of photographs or other still images not embedded in text may, if necessary, be resized, reformatted or have its resolution modified without additional express permission, and a Work consisting of audiovisual content may, if necessary, be "clipped" or reformatted for purposes of time or content management or ease of delivery (provided that any such resizing, reformatting, resolution modification or “clipping” does not alter the underlying editorial content or meaning of the Work used, and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular License described in the Order Confirmation and the Terms.

15) **Miscellaneous.**

a) User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to the Terms, and that Rightsholder may make changes or additions to the Rightsholder Terms. Such updated Terms will replace the prior terms and conditions in the order workflow and shall be effective as to any subsequent Licenses but shall not apply to Licenses already granted and paid for under a prior set of terms.

b) Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online at www.copyright.com/about/privacy-policy/.

c) The License is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the License or any rights granted thereunder; provided, however, that, where applicable, User may assign such License in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in any new material which includes the Work(s) licensed under this Service.

d) No amendment or waiver of any Terms is binding unless set forth in writing and signed by the appropriate parties, including, where applicable, the Rightsholder. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by or on behalf of the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the License described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any Terms set forth in the Order Confirmation, and/or in CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.

e) The License described in the Order Confirmation shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such License shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9.3. Anexo 3: Gallic acid-triethylene glycol aptadendrimers synthesis, biophysical characterization and cellular evaluation

Título	**Gallic acid-triethylene glycol aptadendrimers synthesis, biophysical characterization and cellular evaluation**		
Revista	**Pharmaceutics**	Editorial	**MDPI**
Año publicación	**2022**	DOI	**10.3390/pharmaceutics14112456**
Volumen	**14**	Páginas	**2456-2472**
ISSN	**N/A**	EISSN	**1999-4923**
Factor de impacto	**6.525 (Año 2021)**	Cuartil	**Q1**

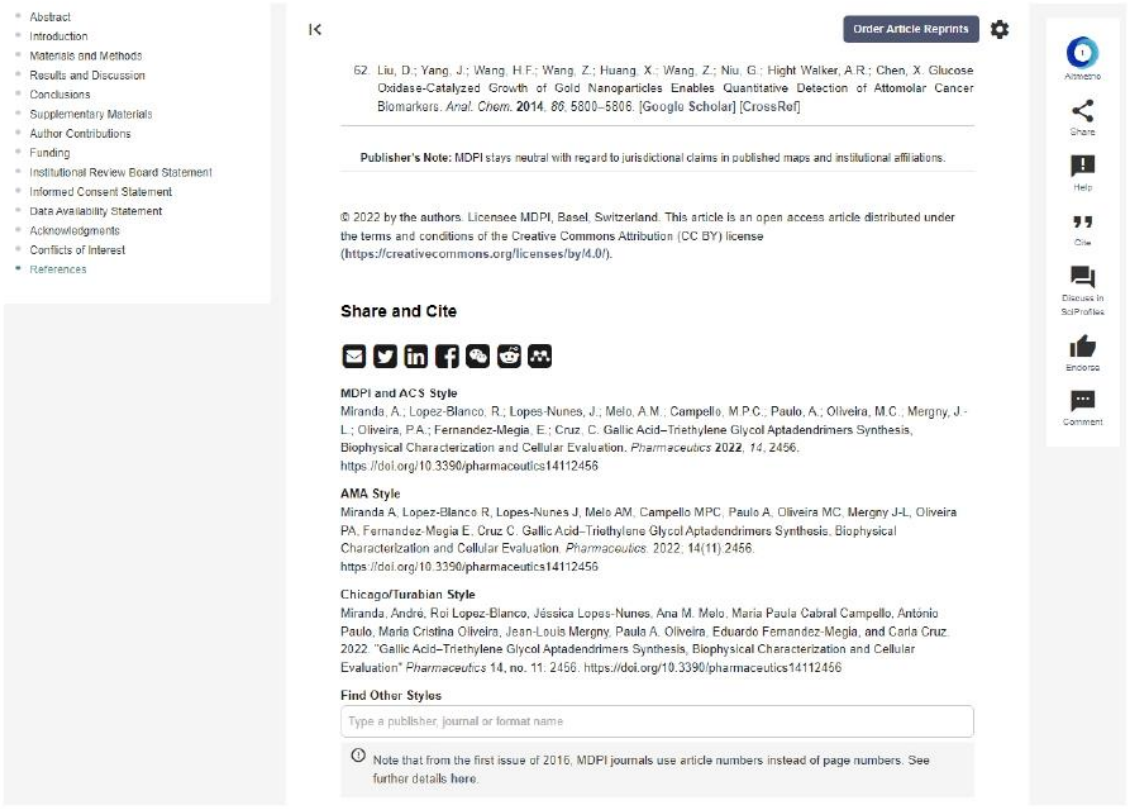
Autores	1. André Miranda[a] 2. Roi Lopez-Blanco[b] 3. Jéssica Lopes-Nunes[a] 4. Ana M. Melo[c,d] 5. Maria Paula Cabral Campello[e,f] 6. António Paulo[e,f] 7. Maria Cristina Oliveira[e,f] 8. Jean-Louis Mergny[g] 9. Paula A. Oliveira[h] 10. Eduardo Fernandez-Megia[b]* 11. Carla Cruz[a,i]*
Filiación	[a]CICS-UBI–Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6201-506 Covilhã, Portugal. [b]Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS) and Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain. [c]iBB–Institute for Bioengineering and Biosciences, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal. [d]Associate Laboratory i4HB–Institute for Health and Bioeconomy at Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal. [e]Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Estrada Nacional 10 (km 139.7), 2695-066 Bobadela, Portugal. [f]Departamento de Engenharia e Ciências Nucleares, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Estrada Nacional 10 (km 139.7), 2695-066 Bobadela, Portugal [g]Laboratoire d'Optique et Biosciences, Ecole Polytechnique, CNRS, INSERM, Institut Polytechnique de Paris, 91128 Palaiseau, France. [h]Centre for Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences (CITAB), Inov4Agro, University of Trás-os-Montes and Alto Douro (UTAD), Quinta de Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal. [i]Departamento de Química, Universidade da Beira Interior, Rua Marquês de Ávila e Bolama, 6201-001 Covilhã, Portugal
Contribución	▪ Conceptualización: ideas, formulación y diseño. ▪ Análisis, investigación y metodología: síntesis y caracterización de los aptadendrímeros. ▪ Visualización: preparación y creación de datos, figuras, etc. ▪ Redacción: borrador inicial, revisión y edición.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Enlace revista: https://www.mdpi.com/1999-4923/14/11/2456

Permiso revista:



- Abstract
- Introduction
- Materials and Methods
- Results and Discussion
- Conclusions
- Supplementary Materials
- Author Contributions
- Funding
- Institutional Review Board Statement
- Informed Consent Statement
- Data Availability Statement
- Acknowledgments
- Conflicts of Interest
- References

Order Article Reprints

62. Liu, D.; Yang, J.; Wang, H.F.; Wang, Z.; Huang, X.; Wang, Z.; Niu, G.; Hight Walker, A.R.; Chen, X. Glucose Oxidase-Catalyzed Growth of Gold Nanoparticles Enables Quantitative Detection of Attomolar Cancer Biomarkers. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5800–5806. [Google Scholar] [CrossRef]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Share and Cite

MDPI and ACS Style
Miranda, A.; Lopez-Blanco, R.; Lopes-Nunes, J.; Melo, A.M.; Campello, M.P.C.; Paulo, A.; Oliveira, M.C.; Mergny, J.-L.; Oliveira, P.A.; Fernandez-Megia, E.; Cruz, C. Gallic Acid–Triethylene Glycol Aptadendrimers Synthesis, Biophysical Characterization and Cellular Evaluation. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2456. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112456

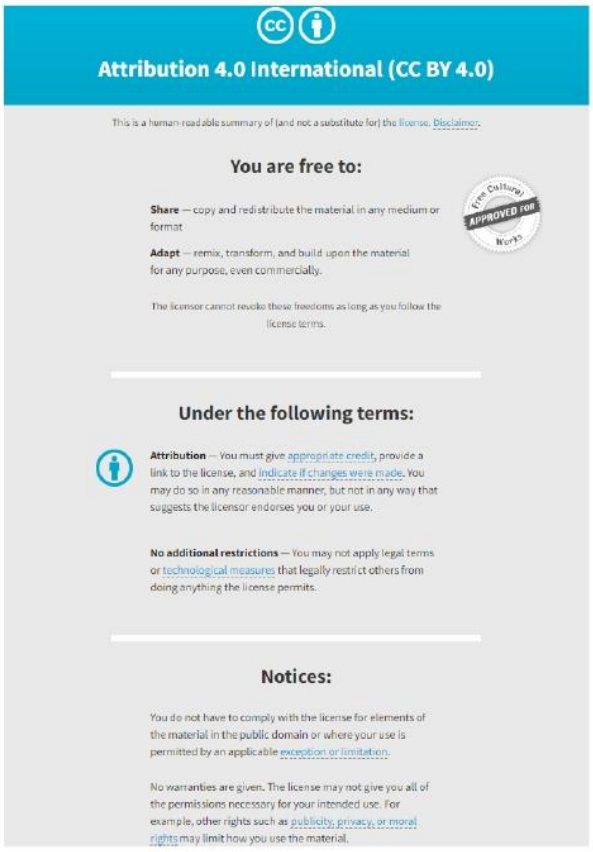
AMA Style
Miranda A, Lopez-Blanco R, Lopes-Nunes J, Melo AM, Campello MPC, Paulo A, Oliveira MC, Mergny J-L, Oliveira PA, Fernandez-Megia E, Cruz C. Gallic Acid–Triethylene Glycol Aptadendrimers Synthesis, Biophysical Characterization and Cellular Evaluation. *Pharmaceutics*. 2022; 14(11):2456. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112456

Chicago/Turabian Style
Miranda, André, Roi Lopez-Blanco, Jéssica Lopes-Nunes, Ana M. Melo, Maria Paula Cabral Campello, António Paulo, Maria Cristina Oliveira, Jean-Louis Mergny, Paula A. Oliveira, Eduardo Fernandez-Megia, and Carla Cruz. 2022. "Gallic Acid–Triethylene Glycol Aptadendrimers Synthesis, Biophysical Characterization and Cellular Evaluation" *Pharmaceutics* 14, no. 11: 2456. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112456

Find Other Styles

Type a publisher, journal or format name

Note that from the first issue of 2016, MDPI journals use article numbers instead of page numbers. See further details here.



Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

This is a human-readable summary of (and not a substitute for) the license. Disclaimer.

You are free to:

Share — copy and redistribute the material in any medium or format

Adapt — remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

The licensor cannot revoke these freedoms as long as you follow the license terms.

Under the following terms:

Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use.

No additional restrictions — You may not apply legal terms or technological measures that legally restrict others from doing anything the license permits.

Notices:

You do not have to comply with the license for elements of the material in the public domain or where your use is permitted by an applicable exception or limitation.

No warranties are given. The license may not give you all of the permissions necessary for your intended use. For example, other rights such as publicity, privacy, or moral rights may limit how you use the material.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A medida que aumenta la esperanza de vida aparecen nuevos retos en la medicina que requieren tratamientos más complejos capaces de mejorar la solubilidad de los medicamentos, superar barreras biológicas y, desarrollar formulaciones más eficientes y de acción más prolongada. El uso de dendrímeros ha supuesto un importante avance debido a su gran potencial. Por si solos pueden usarse como sistemas de transporte o unidos a otras moléculas, formar parte de sistemas más complejos como micelas o vesículas. Esta tesis doctoral se centrará en la síntesis de dendrímeros y copolímeros de bloque dendrítico, así como en la preparación y caracterización de nanosistemas dendríticos, la encapsulación de fármacos o biomoléculas y el estudio in vitro e in vivo de sus propiedades.