



Universidade de Santiago de Compostela
e Universidade de Vigo

Curso Académico 2012/2013



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

UNIVERSIDAD DE VIGO

Facultad de Química

Departamento de Química Orgánica

Máster en Química Avanzada

Trabajo Fin de Máster

**Preparación de Micelas PIC dendríticas
sensibles a pH: estudio de su estabilidad,
citotoxicidad e internalización celular.**

Noelia M^a Guldrís Pensado

Julio de 2013

D. RICARDO RIGUERA VEGA, Catedrático Titular del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela, y D. EDUARDO FERNÁNDEZ MEGÍA, Profesor Titular de la Universidad de Santiago de Compostela.

INFORMAN: Que Doña Noelia M^a Guldrís Pensado realizó el trabajo titulado **‘Preparación de micelas PIC dendríticas sensibles a pH: estudio de su estabilidad, citotoxicidad e internalización celular’** bajo nuestra dirección en el Departamento d Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela, dedicando a su ejecución un tiempo superior al mínimo legal requerido; autorizando, por lo tanto, a su presentación como Proyecto Fin de Máster del Máster Interuniversitario de Química Avanzada.

Santiago de Compostela, 09 de Julio de 2013.

Asdo. Ricargo Riguera Vega

Eduardo Fernández Megía

Abreviaturas y acrónimos

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
δ	Desplazamiento químico
Boc	<i>Tert-butoxycarbonyl</i>
BTEAC	Cloruro de amonio trietilbencílico
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
CMC	Constante Micelar Crítica
CME	Endocitosis Mediada por Clatrina
CuAAC	<i>Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dd	Doble doblete
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMF	N,N-dimetilformamida
DSC	<i>N,N-disuccinimidil carbonate</i>
EDC	<i>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide</i>
EPR	<i>Enhanced Permeation and Retention</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GATG	<i>Gallic Acid Triethylene Glycol</i>
H	Hora
HOBt	<i>1-Hydroxybenzotriazol</i>
Hz	<i>Hertz</i>
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
K	Kelvin
KDa	KiloDalton
LALLS	<i>Low Angle Laser Light Scattering</i>
m	Multiplete
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
min	Minuto
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
NP	Nanopartícula
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PEG	<i>Poly(ethylenglycol)</i>
PIC	<i>Polyion Complex</i>
P(Asp)	<i>Polyaspartic acid</i>
PLL	<i>Poly-L-lysine</i>
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singulete
s a	Singulete ancho
t	Triplete
TOF	<i>Time of flight</i>

t.a.
UV-Vis

Temperatura ambiente
Ultravioleta-Visible

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a D. Ricardo Riguera Vega y D. Eduardo Fernández Megía por aceptarme para realizar este proyecto, así como por la orientación, supervisión y enseñanza recibida.

Por otra parte, al CIQUS, Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares, por ofrecerme un contrato laboral que apoya mi labor investigadora.

También a D. Anxo Vidal, profesor del Departamento de Fisiología, y a D^a Atenea Soto, estudiante predoctoral, tanto por sus recomendaciones como por facilitarme sus instalaciones para realizar el ensayo de MTT.

Del mismo modo, a D. José Manuel Martínez Costas, profesor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, por su ayuda con los estudios de internalización celular con fluorescencia.

A todos mis compañeros de laboratorio, por la ayuda y el compañerismo recibido.

A mis amigos y familia, por el cariño y apoyo constante.

Índice

1	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	8
1.1	Dendrímeros	9
1.2	Micelas poliméricas	10
1.2.1	Micelas PIC poliméricas	11
1.2.2	Micelas PIC de copolímero de bloque dendrítico	12
1.3	Aplicaciones en nanomedicina	13
1.3.1	Sistemas de transporte de fármacos.....	14
1.3.2	Biocompatibilidad: proceso de PEGuilación.....	14
1.3.3	Efecto EPR.....	15
1.4	Funcionalización de nanosistemas	16
1.4.1	CuAAC	17
1.5	Citotoxicidad	18
1.5.1	Integridad de la membrana celular	19
1.5.2	Ensayos colorimétricos basados en sales de tetrazolio	20
1.6	Estudios de internalización	22
1.6.1	Membrana plasmática.....	23
1.6.2	Mecanismos de endocitosis	24
1.6.3	Tráfico endocítico	25
2	OBJETIVOS	27
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	28
3.1	Procedimiento General.....	29
3.2	Síntesis de 4-((trimetil-silil)-etnil)benzoato de etilo.....	31
3.3	Síntesis de ácido 4-etnilbenzoico.....	32
3.4	Síntesis de sulfato de 1-pent-4-inilo	33
3.5	Síntesis de PEG ₅₀₀₀ -[G1]-N ₃	34
3.6	Síntesis de PEG ₅₀₀₀ -[G1]-NH ₂ ·HCl	35
3.7	Síntesis de PEG ₅₀₀₀ -[G2]-N ₃	36
3.8	Síntesis de PEG ₅₀₀₀ -[G2]-NH ₂ ·HCl	37
3.9	Síntesis de PEG ₅₀₀₀ -[G3]-N ₃	38
3.10	Síntesis de PEG ₅₀₀₀ -[G3]-PhCOONa	39
3.11	Síntesis de PEG ₅₀₀₀ -[G3]-PhSO ₃ Na.....	40

3.12	Síntesis de PEG ₅₀₀₀ -[G3]-OSO ₃ Na	41
3.13	Síntesis de PEG ₅₀₀₀ -[G3]-COONa	42
3.14	Síntesis de Propargil 7-hidroxi-4-metil-3-cumarilamida	43
3.15	Síntesis PEG ₅₀₀₀ -[G3]-HMCA-N ₃	44
3.16	Síntesis de PEG ₅₀₀₀ -[G3]-HMCA-PhCOO ₂ Na	45
3.17	Síntesis de PLL-Alexa 488	46
3.18	Micelas PIC	47
3.19	Reticulación de micela PIC	48
3.20	Cuantificación de polilisina libre	49
3.21	Test de citotoxicidad	50
3.22	Estudios de internalización	51
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1	Síntesis del copolímero de bloque dendrítico:	53
4.1.1	Reacción CuAAC:.....	54
4.2	Micelas PIC.....	56
4.2.1	Preparación de micelas PIC:	56
4.2.2	Polilisinias con diferentes pesos moleculares	58
4.2.3	Rotura a pH=5.....	61
4.2.4	Medidas de AFM.....	62
4.2.5	Medidas de carga superficial: potencial ζ	62
4.2.6	Cuantificación de polilisina libre.....	63
4.3	Citotoxicidad	66
4.4	Estudios de internalización	67
4.4.1	Síntesis del copolímero de bloque fluorescente	67
4.4.2	Síntesis de PLL ₆₈ fluorescente.....	70
4.4.3	Fluorescence resonance energy transfer (FRET).....	71
4.4.4	Internalización celular	72
5	CONCLUSIONES	76

1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El desarrollo de nanoestructuras poliméricas biocompatibles y con aplicaciones biomédicas ha despertado el interés de la comunidad científica en las últimas décadas. Como consecuencia de esto, se han empleado gran diversidad de compuestos: polisacáridos, ácidos nucleicos, péptidos, polímeros lineales, dendrímeros, etc. para construir nuevas plataformas con propiedades mejoradas, como incremento en la solubilidad, aparición de multivalencia, aumento de la estabilidad... Se detallan a continuación las características principales de algunos de estos nuevos materiales.

1.1 Dendrímeros

Los dendrímeros (del griego 'dendron'- árbol) son polímeros que se caracterizan por ser altamente ramificados, pero a su vez monodispersos. La arquitectura en la que se disponen es una estructura topológica muy extendida en la Naturaleza, puede observarse tanto en sistemas abióticos (rayos, cristales de nieve, etc.) como en estructuras biológicas (raíces de las plantas, sistemas vasculares, neuronas).

Los dendrímeros se caracterizan por tener un núcleo central o 'core' del que crecen las distintas unidades ramificadas o 'dendrones', como se muestra en la Figura 1. La generación viene dada por el número de puntos de ramificación desde el núcleo a la periferia. Estas unidades ramificadas están perfectamente definidas, y no son una distribución probabilística, como sucede en el caso de polímeros ramificados. Esta diferencia se debe al método de síntesis de los dendrímeros, que consta de procesos consecutivos de activación y crecimiento, con lo que se consigue la formación controlada de nuevos enlaces.

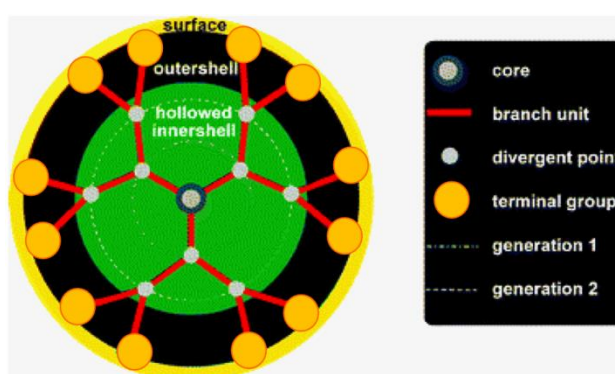


Figura 1: Esquema de la estructura de un dendrímero.

Existen dos métodos generales en la síntesis de dendrímeros, la ruta divergente y la ruta convergente. La primera en utilizarse fue la ruta divergente,

empleada en 1978 por Vögtle y colaboradores,¹ en la que se empieza la síntesis desde el núcleo hacia la periferia. Tiene como inconveniente la difícil purificación de los productos, en caso de conversión incompleta, por ser éstos muy semejantes en polaridad, tamaño y masa molecular. Por tanto, se necesitan rendimientos cuantitativos para obtener un dendrímero monodisperso.

En el caso de la síntesis convergente, que se realizó por primera vez en 1990 por Fréchet y colaboradores², la estrategia a seguir es la opuesta, es decir, se construyen las unidades ramificadas y posteriormente se unen al núcleo o 'core'. Este método permite mejorar la purificación de los productos, sin embargo, debido a impedimentos estéricos no pueden sintetizarse dendrímeros de elevadas generaciones siguiendo este método. Por estos motivos, ambas rutas han de utilizarse de manera complementaria según el objetivo perseguido.

La estructura dendrítica fue estudiada por primera vez en 1983 por De Gennes y Herve³, mediante un estudio teórico computacional. Este estudio se basó en el hecho de que el número de ramas en un dendrímero se incrementa exponencialmente con el número de generaciones, mientras que el radio del dendrímero se incrementa sólo linealmente. En resumen, este estudio concluyó que los dendrímeros han de tener densidades menores en el centro que en la superficie. Sin embargo, posteriormente Lescanec y Muthukuman⁴ formularon otro estudio en el que aseguraban que el máximo de densidad se encuentra en el centro de la molécula, contrariamente a lo afirmado por De Gennes y Herve. A partir de entonces, diversos estudios experimentales han demostrado la teoría formulada con Lescanec y Muthukuman era la correcta. Por ejemplo, este grupo de investigación⁵ realizó un estudio de este tipo, empleando polietilenglicol (PEG) en el copolímero dendrítico, que concluye que estos dendrímeros presentan un núcleo compacto y con mayor densidad que los grupos terminales, situados en la periferia. Para esta determinación se midieron los tiempos de relajación T_1 y T_2 mediante RMN.

1.2 Micelas poliméricas

Una micela puede definirse como la autoasociación de moléculas que poseen características antagonistas: hidrofóbicas, causadas por grupos arilo o alquilo; e hidrofílicas, debidas a grupos polares, que pueden ser de naturaleza iónica o no iónica. Como consecuencia de esto, cuando se encuentran en disolución se produce una reorganización cooperativa para minimizar contactos desfavorables entre la parte hidrofóbica e hidrofílica, que tiene como resultado la formación de una micela. Al

¹ Buhleier, E.; Wehner, W.; Vogtle, F. *Synthesis* **1978**, 2, 155.

² Hawker, C.; Fréchet, J. M. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1010-1013.

³ De Gennes, P. G.; Herve, H. *J. Phys., Lett.* **1983**, 44, 351.

⁴ Lescanec, R. L.; Muthukumar, M. *Macromolecules* **1990**, 23, 2280.

⁵ Fernandez-Megia, E.; Correa, J.; Riguera, R. *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 3104-3111.

mismo tiempo, se consigue maximizar los contactos entre moléculas de disolvente en el exterior de la micela, lo cual conlleva una ganancia entrópica favorable. Para que en un sistema anfifílico pueda producirse una asociación cooperativa, que tenga como resultado la formación de una micela, es necesaria una concentración mínima, conocida como *Critical Micellization Concentration* (CMC).

Los copolímeros de bloque, formados por dos o más polímeros de características diferentes unidos covalentemente, son sistemas anfifílicos, donde la parte hidrófoba e hidrofílica son de carácter polimérico con características fisicoquímicas diferenciadas. Es por esto que pueden formar micelas de varias morfologías, dependiendo de varios parámetros, como el disolvente y la concentración empleados. Se encuentran muchos ejemplos en bibliografía⁶ de copolímeros de bloque que forman micelas, como es el caso de copolímeros formados a partir de polietilenglicol, polimetil metacrilato, poliestireno, etc.

Las micelas formadas a partir de copolímeros de bloque presentan algunas diferencias frente a aquellas formadas por sistemas no poliméricos. Una de las ventajas más destacadas es la disminución de la CMC, que es del orden de mil veces inferior. Además, las micelas formadas por copolímeros de bloque presentan una estabilidad termodinámica y cinética superior, ya que las interacciones son mayores en número en un sistema polimérico. No obstante, el estudio de la dinámica de las micelas de copolímeros de bloque presenta algunas dificultades, como el grado de pureza y la polidispersión del polímero, problemas intrínsecos de sistemas poliméricos.

1.2.1 Micelas PIC poliméricas

El campo de estudio de micelas de copolímero de bloque ha evolucionado en la última década, desde que Kataoka⁷ y Kabanov⁸ propusieron estudios de formación de micelas por interacción electrostática. La estrategia consistió en mezclar dos copolímeros de bloque de carga opuesta, formados por polietilenglicol y un polímero cargado, dando lugar a la formación de micelas, que fueron llamadas Polyion Complex (PIC).

En este primer estudio⁷, las micelas PIC fueron preparadas en medio acuoso, mezclando copolímero de bloque formado por polietilenglicol y polilisina (PEG-*b*-P(Lys)), cargado positivamente, con copolímero de bloque de polietilenglicol y poliaspártico (PEG-*b*-P(Asp)), cargado negativamente, en relación de cargas 1:1. Se comprobó la formación de micelas por medición mediante DLS, sin observarse formación de agregados secundarios, una distribución de tamaños pequeña y estabilidad después de un mes de almacenaje.

⁶ Riess, G. *Prog. Polym. Sci.* **2003**, 28, 1107.

⁷ Harada, A.; Kataoka, K. *Macromolecules*, **1995**, 28, 5294.

⁸ Kabanov, A. V.; Bronich, T. K.; Kabanov, V. A.; Yu K., Eisenberg, A. *Macromolecules*, **1996**, 29, 6797.

La estructura de una micela PIC⁹ consta de dos partes fundamentales: núcleo o 'core' y corona o 'shell'. En el núcleo, se posicionan las cadenas que están interactuando electrostáticamente, en el caso anteriormente citado, las cadenas de lisina y aspártico, que forman parte del copolímero. Éstas se encuentran rodeadas por los segmentos de polietilén glicol, que constituye la parte hidrofílica y se encuentran en contacto con la disolución acuosa. Todo esto constituye una conformación como se detalla en la siguiente Figura 2:

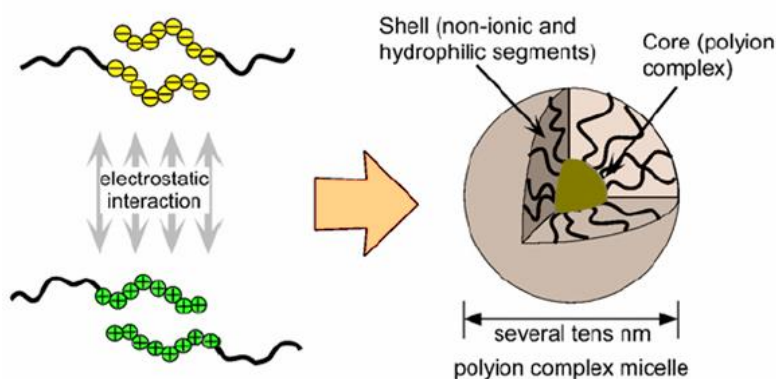


Figura 2: Esquema de la estructura de una micela PIC. Adaptada de referencia 9.

La estructura en la que se conforman estas micelas está estrechamente relacionada con las características que manifiestan. Por ejemplo, se encontró que el pK_a del segmento de polilisina en el copolímero presentaba un valor ligeramente inferior (alrededor de 0.49 unidades), que para un homopolímero de lisina. Esto fue atribuido¹⁰ a una interacción intramolecular entre el segmento de PEG y el segmento de P(Lys), que tendría lugar para estabilizar la α -hélice de la polilisina. Por otra parte, estas micelas PIC mostraron bajos indicios de agregación, gracias a las cadenas de PEG hidrofílicas, que se encuentran en el exterior de la micela, alejando las nanopartículas y minimizando su interacción.

Como cabría esperar, se encontró que estas micelas PIC presentaban alta sensibilidad a la fuerza iónica¹¹, ya que ésta produce un apantallamiento de las cargas, y por tanto, se pierde la interacción electrostática que origina la formación micelar. Esto constituye un problema para la aplicación de estas micelas como sistemas de liberación de fármacos, ya que las hace inestables en medio fisiológico.

1.2.2 Micelas PIC de copolímero de bloque dendrítico

Recientemente, Kataoka y colaboradores^{12,13} han diseñado micelas PIC constituidas por un copolímero de bloque y un dendrímero cuya superficie se

⁹ Lee, Y.; Kataoka, K. *Soft Matter* 2009, 5, 3810.

¹⁰ Harada, A.; Cammas, S.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. *Macromolecules*, **1996**, 29, 3227-3231

¹¹ Kakizawa, Y.; Harada, A.; Kataoka, K. *J Am Chem Soc*, **1999**, 121, 11247.

¹² Nishiyama, N.; Woo-Dong, J.; Kataoka, K. *New J. Chem.*, **2007**, 31, 1074.

encuentra cargada. Con esta modificación, han conseguido unas micelas PIC más estables a la fuerza iónica, lo cual puede ser explicado si tenemos en cuenta que un dendrímero constituye un polímero mucho más rígido que en el caso de un homopolímero, esto se traduce en una menor ganancia entrópica en el caso de la disociación de la micela en el dendrímero. Además, se encontró que los enlaces carboxílicos del dendrímero, formaban enlaces de hidrógeno con las aminas de la polilisina, contribuyendo a su estabilidad, que tuvo como resultado micelas PIC estables a concentraciones salinas del orden de diez veces la concentración salina fisiológica.

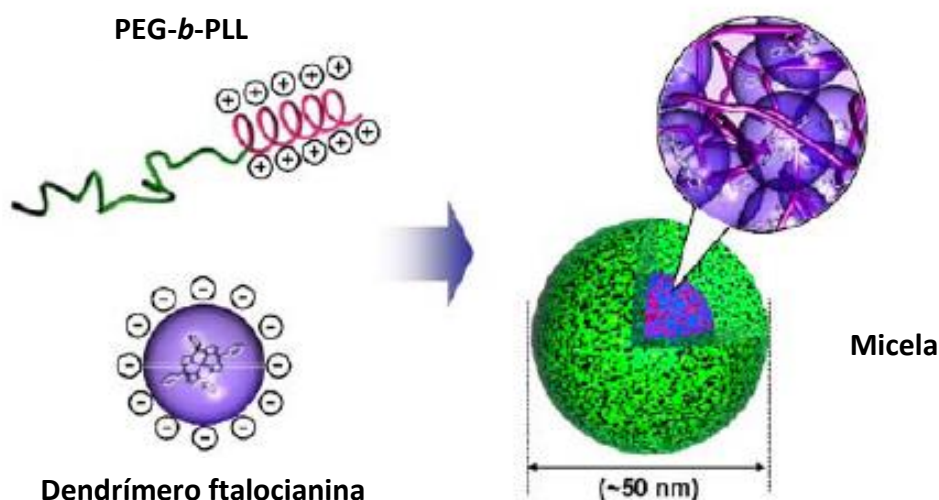


Figura 3: Micela PIC formada a partir de copolímero de PEG-PLL y dendrímero. Adaptado de referencia 13.

Recientemente, este grupo de investigación¹⁴ ha preparado micelas PIC con un copolímero de bloque, compuesto por PEG y dendrímero de GATG, y polilisina. Esta estrategia de adjuntar directamente la unidad de PEG al dendrímero presenta como ventaja una síntesis más sencilla, permitiendo purificaciones mediante precipitación, lo cual evita cromatografías laboriosas asociadas a la síntesis dendrímeros. En cuanto a la estabilidad, frente a concentración salina de estas micelas, resulta comparable que para el caso anteriormente citado.

1.3 Aplicaciones en nanomedicina

Todos los sistemas anteriormente descritos, tanto los dendrímeros como las micelas PIC, han despertado desde su origen, gran interés por constituir sistemas muy interesantes para su uso en nanomedicina. La nanomedicina es un campo interdisciplinar que tiene como objetivo el empleo de herramientas que provienen de

¹³ Jang, W.; Nakagishi, Y.; Nishiyama, N.; Kawauchi, S.; Morimoto, Y.; Kikuchi, M.; Kataoka, K.; J. *Control. Release*, **2006**, 113, 73–79.

¹⁴ Sousa-Herves, A.; Fernandez-Megia, E.; Riguera, R.; *ChemComm*, **2008**, 3136–3138.

colaboradores¹⁵ modificaron covalentemente varios enzimas con PEG, y obtuvieron resultados inesperados. Se produjo una mejora en la farmacocinética¹⁶ y farmacodinámica¹⁷ del enzima empleado como fármaco, una mejora en la solubilidad, se limitó la toxicidad y se redujo la eliminación renal. Esto último, fue consecuencia del aumento de masa, ya que los riñones filtran los compuestos en función de su tamaño, de manera que las moléculas pequeñas se eliminan más rápidamente. Además, se demostró que cada unidad de etilenglicol se encontraba unida fuertemente a dos o tres moléculas de agua, hecho que explica que las proteínas unidas a PEG sean del orden de cinco a diez veces más voluminosas que aquellas proteínas solubles del mismo peso molecular. Gracias a esta propiedad del PEG se evita el reconocimiento celular del fármaco, ya que los anticuerpos no pueden unirse al PEG por problemas estéricos.

El PEG resulta inocuo en sistemas vivos y fue aprobado por Food and Drug Administration (FDA) para ser empleado en cosméticos, comida y fármacos. Este proceso de adjuntar unidades de PEG, conocido actualmente como PEGuilación, ha sido comúnmente empleado para mejorar las propiedades de péptidos, polisacáridos y otras moléculas. Por ejemplo, se emplea para fármacos ya conocidos, como es el caso de la insulina¹⁸, pero también está presente en el desarrollo de nuevos sistemas, como liposomas¹⁹ e hidrogeles²⁰.

1.3.3 Efecto EPR

El efecto EPR, del inglés Enhanced Permeability and Retention, es un fenómeno único para tumores sólidos, que está relacionado con las diferencias anatómicas y fisiopatológicas que existen con respecto a tejidos normales. Fue en 1986 cuando Matsumura y Maeda²¹ describieron este efecto en detalle, sus estudios determinaron un aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos de tumores sólidos, debido a que estos tejidos presentan defectos en su arquitectura como consecuencia de un crecimiento rápido y de la necesidad de un abastecimiento de oxígeno y nutrientes muy elevado. Además, el sistema linfático del área tumoral actúa más lentamente, de manera que estos efectos de permeabilidad y retención originan una acumulación de macromoléculas en regiones tumorales. Posteriormente, se ha encontrado que esta acumulación es del orden de diez a doscientas veces mayor en áreas tumorales que en tejidos sanos, según el tipo de tejido y compuesto ensayado.

¹⁵ Davis, F. F. et al. *Enzyme Eng.*, **1978**, 4, 169–173.

¹⁶ Farmacocinética: procesos que sufre un fármaco en un sistema vivo, referido a su absorción, distribución, metabolismo y excreción.

¹⁷ Farmacodinámica: efecto que ejerce un fármaco sobre el organismo, referido a aspectos fisiológicos y bioquímicos.

¹⁸ Hinds, K. D.; Skim, S. W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 505–530.

¹⁹ Park, J. W. *Breast Cancer Res.* **2002**, 4, 95–99.

²⁰ Rieger, J.; Grazon, C.; Charleux, B.; Alaimo, D.; Jerome, C. *Polymer Chemistry* **2009**, 47(9), 2373–2390.

²¹ Matsumura, Y.; Maeda, H.; *Cancer Res.* **1986**, 46, 6387–6392.

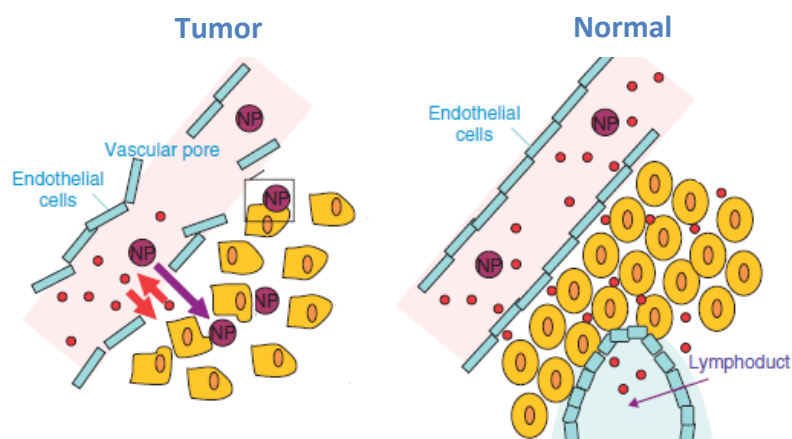


Figura 5: Diferencia estructurales entre tejidos tumorales y sanos²². Permeabilidad de nanopartículas en tejidos tumorales gracias a EPR. Figura adaptada de referencia 22.

Este efecto se puede utilizar para lograr un transporte selectivo de fármacos hacia tumores, si estos se encuentran unidos a moléculas de elevado peso molecular. Esta estrategia ya es empleada en algunos fármacos antitumorales como es el caso de Doxil[®], que es un liposoma peguilado que encapsula a la sustancia activa doxorubicina. En la actualidad, se están desarrollando sistemas de transporte de fármacos de origen polimérico, ya que estos son capaces de aumentar el tiempo de vida medio en circulación del fármaco.

1.4 Funcionalización de nanosistemas

El descubrimiento de fenómenos como EPR y PEGuilación, han permitido un avance significativo hacia el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos, que han desencadenado la necesidad de optimizar rutas sintéticas que logren estructuras de alto peso molecular. Fue en 2001, cuando Sharpless y colaboradores introdujeron el concepto de 'química click'²³, cuya idea pionera consistió en centrar la atención en sintetizar moléculas con las propiedades deseadas, más que con estructuras complejas. El propósito de la 'química click' es encontrar nuevos caminos para la preparación de materiales útiles, a partir de compuestos fácilmente accesibles y con transformaciones químicas extremadamente eficientes.

Con el objetivo de establecer una nueva familia de reacciones, los autores describieron una serie de requisitos para que pueda calificarse de click a una reacción: "ser modular, de amplio alcance, con elevados rendimientos, generar únicamente productos inofensivos que puedan ser eliminados por métodos no cromatográficos, y ser estereoespecífica (aunque no necesariamente enantioselectiva). Las características

²² Adiseshaiah, P. P.; Hall, J. B.; McNeil, S. E. *Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2010**, 2, 99-112.

²³ Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Inter. Ed.* **2001**, 40, 2004.

requeridas incluyen condiciones de reacción sencillas (idealmente no debe ser sensible al oxígeno y al agua), reactivos y materiales de partida fácilmente disponibles, no usar disolventes o utilizar un disolvente benigno (como agua) o fácilmente eliminable, y la extracción del producto de reacción debe ser sencilla. La purificación -si es necesaria- debe realizarse obligatoriamente mediante métodos no cromatográficos, como por ejemplo cristalización o destilación, y el producto de reacción debe ser estable en condiciones fisiológicas".

1.4.1 CuAAC

Existen una serie de reacciones que cumplen estas características, una de las más conocidas y empleadas para la funcionalización de sistemas liberadores de fármacos, es la *Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*, CuAAC. Esta reacción fue empleada por primera vez para funcionalizar dendrímeros en 2004, en un trabajo resultado de la colaboración entre Hawker, Voit, Fréchet, Sharpless y Fokin²⁴.

Los dendrímeros representan una de las arquitecturas más interesantes para sistemas liberadores de fármacos, ya que gracias a su multivalencia inherente permiten la posibilidad de localizar selectivamente diversas moléculas funcionales (como por ejemplo, fármacos o sondas de imagen).

El empleo de la CuAAC en dendrímeros se llevó a cabo con carbohidratos, nucleósidos, péptidos y moléculas no naturales, resultando ser mucho más eficiente que procedimientos tradicionales (acoplamiento mediante enlaces amida o sulfatación). Además, se consiguió una funcionalización homogénea de los grupos de la periferia del dendrímero.

La CuAAC²⁵ es una variante de la reacción térmica AAC (Azide-alkyne cycloaddition) que permitió bajar la energía de activación de la cicloadición, traduciéndose esto en tiempos de reacción más cortos a temperatura ambiente. Pero además, el proceso resultó ser regioespecífico, obteniéndose únicamente 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos:

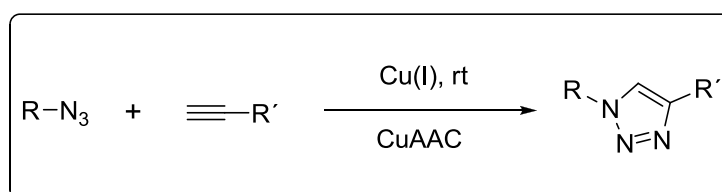


Figura 6: Reacción de cicloadición catalizada por cobre. Adaptado de referencia 25.

Sin embargo, el empleo de la CuAAC ha tenido como principal inconveniente el uso de cobre, ya que este presenta diversos problemas de biocompatibilidad. Se ha

²⁴ Wu, P.; Feldman, A.K.; Nugent, A.K.; Hawker, C.J.; Scheel, A.; Voit, B. *Angew Chem*, **2004**; 43:3928–32.

²⁵ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.

demostrado que el sistema catalítico $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}$ promueve la generación de ROS (Reactive Oxygen Species), que son responsables de dañar biomoléculas. Esto genera una limitación de la CuAAC para emplearla con proteínas y ácidos nucleicos. No obstante, la funcionalización de estos sistemas mediante otro método lleva consigo la necesidad de una purificación problemática o incluso imposible.

Por este motivo, una de las estrategias para superar este inconveniente ha sido emplear la CuAAC con ligandos quelatantes de Cu^{I} , para prevenir la formación de ROS. Existen varios ligandos empleados para este fin, como es el caso de TBTA, THPTA y BPDS. Con el uso de estos ligandos y en ausencia de oxígeno, se logra un ratio óptimo entre la estabilización de Cu^{I} y la conversión de cicloadición.

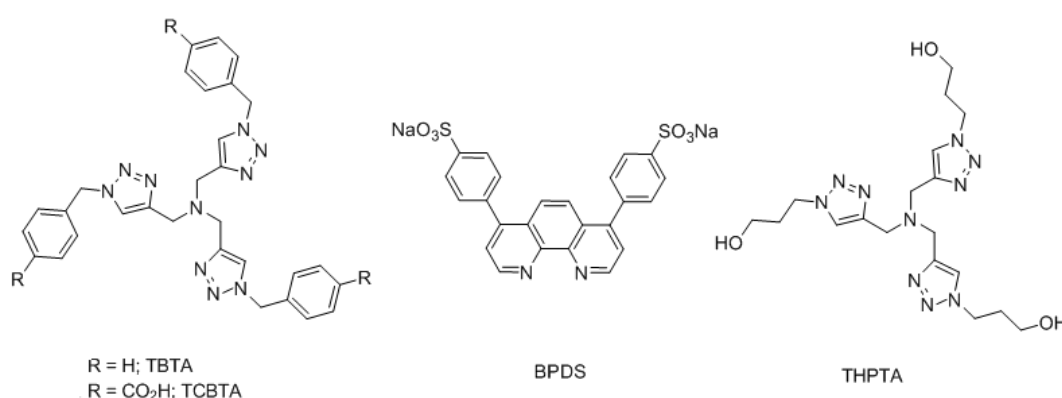
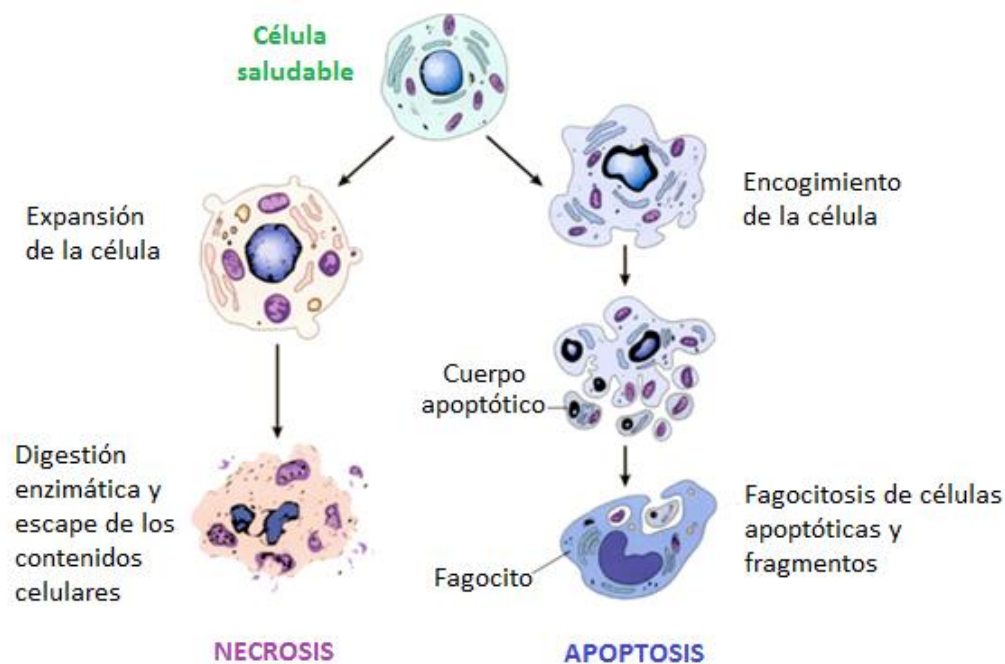


Figura 7: Estructura de TBTA, THPTA y BPDS.

1.5 Citotoxicidad

La citotoxicidad (del griego *kytos*, célula y citotoxicidad) se refiere a la capacidad de un agente de causar un efecto destructivo en células. Un agente citotóxico puede ser tanto un compuesto de naturaleza química, como un sistema biológico, este es el caso de células del sistema inmune. Existen varios procesos por los cuales una célula sufre los efectos de un agente citotóxico: necrosis, parada del crecimiento y división, y apoptosis²⁶. El proceso de muerte conocido como necrosis está ocasionado por lisis celular, es decir, la membrana de la célula sufre una rápida dilatación, que origina la pérdida de su integridad física y, como consecuencia, la liberación de sus componentes al exterior. En cambio, la apoptosis es la muerte programada de la célula, es decir, la célula pone en marcha una maquinaria metabólica que genera cambios en ésta: retracción citoplasmática, condensación del núcleo, fragmentación regular del ADN y formación de cuerpos apoptóticos.

²⁶ Robbins; Cotran; *Patología estructural y funcional*, 7ª edición, Barcelona, Elsevier Saunders, 13 p.



Esquema 1: Representación esquemática de las diferencias principales entre muerte celular por apoptosis y necrosis. Adaptado de Referencia 26.

La medición de la citotoxicidad es comúnmente empleada en la industria farmacéutica en ensayos preclínicos, tanto para testar que nuevos fármacos son inocuos, como para el caso contrario, es decir, que nuevos tratamientos dirigidos a células cancerosas presenten elevada toxicidad contra éstas. Existen diversos métodos que permiten medir la viabilidad celular y los efectos citotóxicos, como son testar la integridad de la membrana celular, realizar ensayos colorimétricos, luminiscentes o fluorescentes. Estos tres últimos siguen una estrategia común, basada en la transformación de un compuesto químico, por mediación de enzimas y/o cofactores presentes en la célula, en otro compuesto con características diferentes y cuantificables, bien sea mediante absorción, fluorescencia o luminiscencia, según el compuesto ensayado.

1.5.1 Integridad de la membrana celular

Testar la integridad de la membrana celular es uno de los criterios más clásicos que todavía se emplea en la actualidad. La técnica utiliza tintes, inofensivos para las células, y que son impermeables a la membrana celular. Por tanto, su entrada al interior celular queda restringida a una situación en la que la membrana haya sufrido daños, y por tanto, presente poros y defectos que permitan su entrada. Si esta situación se produce, el tinte se verá distribuido por el citoplasma de la célula y podrá observarse su color con ayuda de un microscopio.

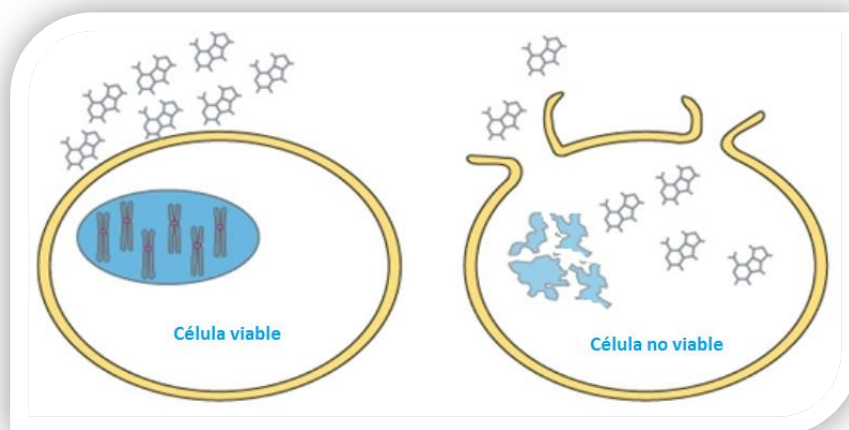


Figura 8: Esquema simplificado que muestra la diferencia de permeabilidad entre una membrana intacta, constituyente de una célula viva, y de una membrana dañada, correspondiente a una célula muerta.

La metodología de este ensayo es sencilla, se basa en contar el número de células que han sido teñidas, y que por tanto, no son viables. Sin embargo, conlleva una labor tediosa y que consume tiempo, razón por la cual, esta técnica resulta útil cuando se testa un sólo fármaco y a una dosis determinada. Algunos de los tintes más empleados con este propósito son azul tripán o yoduro de propidio.

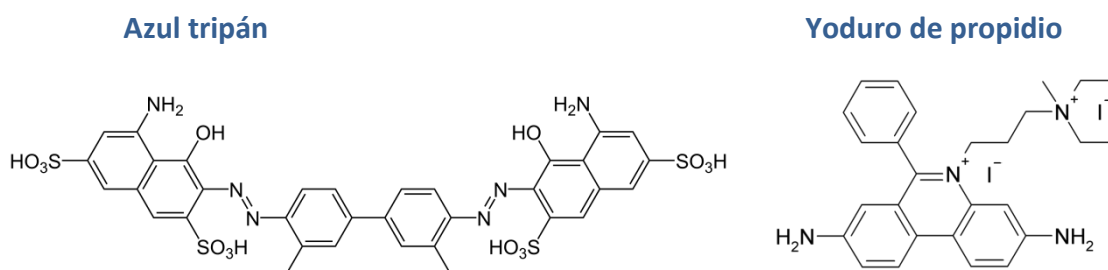


Figura 9: Estructura química de dos ejemplo de tintes empleados para comprobar la integridad de la membrana: azul tripán y yoduro de propidio.

1.5.2 Ensayos colorimétricos basados en sales de tetrazolio

Cuando el objetivo del ensayo implica testar varios compuestos y a varias dosis, resulta más conveniente recurrir a otras técnicas más automatizadas. Por ejemplo, el empleo de sales de tetrazolio, que se transforman a formazán en presencia de reductores, permite la cuantificación mediante absorbancia. Este hecho ha desencadenado el uso de métodos para la cuantificación de la proliferación celular siguiendo esta simple reacción química (Figura 10), ya que en presencia de una célula viva, y por tanto, metabólicamente activa, se produce la reducción de la sal de tetrazolio a formazán, mientras que en el caso de que la célula haya muerto, no se produce dicha transformación.

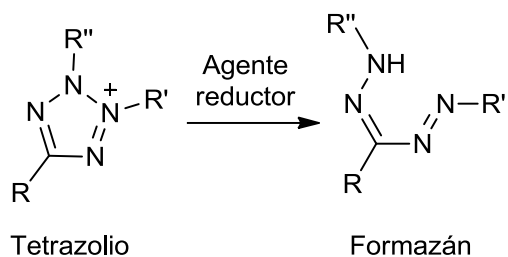
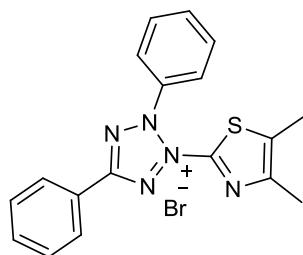


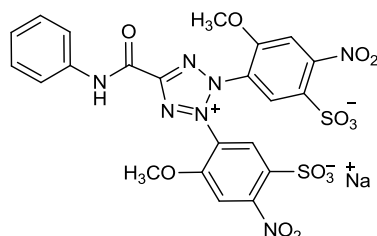
Figura 10: Transformación de tetrazolio a formazán en presencia de un agente reductor.

De esta manera, la absorbancia observada, después de tratar las células con sales de tetrazolio, se convierte en una medida proporcional a la viabilidad de la muestra ensayada. Actualmente, se conocen varios compuestos basados en sales de tetrazolio que se usan para este propósito, se detalla la estructura química de alguno de ellos a continuación:

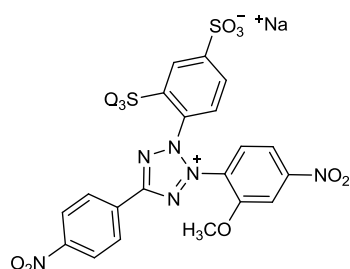
- MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio



- XTT: 2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)tetrazolio 5-carboxanilida



- WSTs (Water Soluble Tetrazolium Salt)



Todos estos compuestos son usados para ensayos de citotoxicidad aunque presentan algunas diferencias entre ellos. Por una parte, el MTT^{27,28}, reactivo clásico empleado en estos ensayos, presenta la ventaja de una fácil internalización en células. Esto es consecuencia de su carga positiva, lo que proporciona una interacción con los grupos fosfato de la membrana que promueve su entrada. Sin embargo, el producto de formazán que se obtiene del MTT es insoluble en medio acuoso, lo que obliga a añadir una disolución solubilizante al medio de cultivo. Como respuesta a este inconveniente, se diseñó el reactivo de XTT²⁹, que produce una sal de formazán soluble en agua. Sin embargo, en el caso de XTT no se consigue una buena internalización debido a que éste posee carga negativa, lo cual desfavorece su entrada. Por tanto, es imprescindible el empleo de un agente transportador de electrones, como el metasulfato de fenacina (PMS). De esta manera, la reducción del reactivo de tetrazolio es posible en el exterior de la célula, como se muestra en la Figura 11. Este agente transportador de electrones también es necesario para la familia de compuestos WST, que se diseñó para mejorar la solubilidad de la sal de tetrazolio, pero cuyo mecanismo de actuación es análogo al caso de XTT.

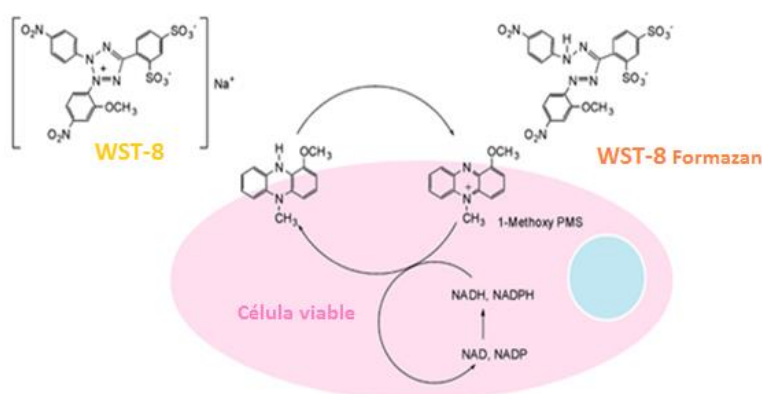


Figura 11: Mecanismo de reducción de la molécula de WST-8 auxiliado por PMS, que permite la transformación sin necesidad de internalización de WST-8.

1.6 Estudios de internalización

El creciente interés generado por la nanotecnología, en parte gracias a las herramientas que ésta ha desarrollado en el diseño de nanopartículas, ha hecho crucial el estudio del proceso de endocitosis desde un punto de vista diferente, es decir, teniendo en cuenta el proceso de internalización, no sólo de nutrientes, iones y macromoléculas, sino también de nuevos sistemas nanométricos³⁰. Las características

²⁷ Alley, M. C. et al., *Proc. Am. Assen. Cancer Res.*, **1986**, 27:389.

²⁸ Kratzke, R. A.; Krarner, B. S. *J Cell Biochem Suppl*, **1996**, 24:160-164.

²⁹ Scudiere, D. A.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T. H.; Currens, M. J.; Seniff, D.; Boyd, M. R. *Cancer Res*, **1988**, 48. 4827-4833.

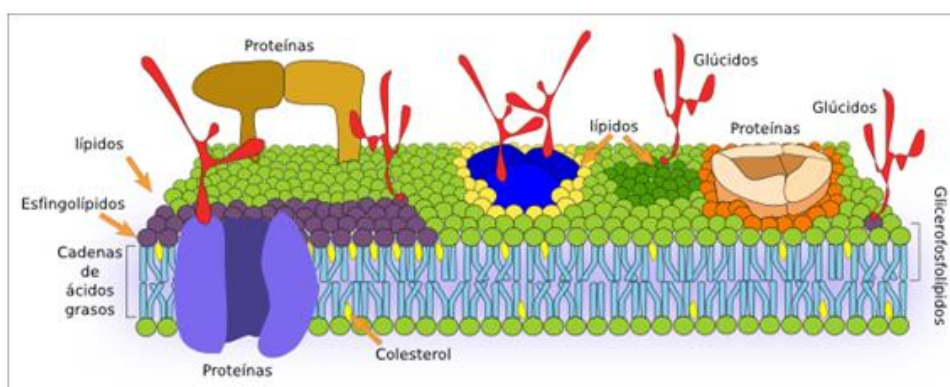
³⁰ Canton, I.; Battaglia, G. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2718–2739.

de una nanopartícula, como son el tamaño, forma y naturaleza química de su superficie, van a determinar el proceso de endocitosis.

La endocitosis es el término general referido al proceso por el que las células eucariotas³¹ internalizan moléculas y macromoléculas, a través de cambios en su membrana plasmática.

1.6.1 Membrana plasmática

La membrana plasmática es aquella membrana que delimita la célula del medio extracelular. Se caracteriza por su naturaleza anfifílica, es decir, su estructura está compuesta por dos partes de características opuestas, una parte hidrofóbica y otra hidrofílica, que originan el autoensamblaje en medio acuoso. Los componentes mayoritarios de la membrana plasmática son los fosfolípidos, aunque también existen otros componentes, como unidades de colesterol (que atribuyen rigidez a la estructura), canales proteicos (que permiten el paso selectivo de proteínas), y azúcares (que actúan como receptores)³². Se presenta una representación con los principales componentes de una membrana plasmática en Esquema 2. Este conjunto complejo de componentes otorga integridad mecánica a la célula y permite la homeostasis celular³³.



Esquema 2: Representación simplificada de los componentes básicos de una membrana plasmática de una célula eucariota. Adaptado de Referencia 32.

Las membranas constituyentes de otros orgánulos³⁴ de las células eucariotas, como el núcleo, mitocondrias, vacuolas o lisosomas, tienen también una composición basada en fosfolípidos, aunque difieren en los demás componentes, como las proteínas que los constituyen. La organización celular en diferentes compartimentos separados por una membrana lipídica resulta muy conveniente, ya que permite la simultaneidad de numerosos procesos metabólicos en el citoplasma, que de otra manera serían incompatibles.

³¹ Célula eucariota es aquella que posee el núcleo celular delimitado dentro de una doble capa lipídica.

³² Mader, S. S. *Biología*, 2007, 9ª edición, México, McGraw-Hill Companies, 84 – 93p.

³³ Homeostasis celular engloba los procesos destinados a conseguir el equilibrio celular, se conoce como autorregulación e incluye mecanismos control de la proliferación, diferenciación y supervivencia.

³⁴ En biología, se conoce como orgánulo celular a las diferentes estructuras que se contienen en el citoplasma celular, y que tienen una forma y función diferenciada.

La multitud de los componentes de la membrana plasmática, y que su comportamiento y funciones sea resultado de la conexión entre los mismos, hace que su estudio sea extremadamente complejo. Por este motivo, algunos detalles de los procesos de endocitosis todavía son ignorados.

1.6.2 Mecanismos de endocitosis

Existen varios mecanismos englobados dentro del término endocitosis que presentan diferencias significativas entre ellos. A continuación se detallan los mecanismos principales:

❖ **Endocitosis Mediada por Clatrina (CME):** es el tipo de endocitosis más ampliamente estudiado. El CME es el mecanismo habitual de entrada de nutrientes, señalización eficiente de receptores y reciclado de vesículas sinápticas³⁵ en células eucariotas. El mecanismo del CME se basa en la formación de invaginaciones de la membrana plasmática debido, fundamentalmente, a los cambios conformacionales de la proteína clatrina. Gracias al perfeccionamiento de técnicas de microscopía electrónica ha sido posible visualizar estas vesículas recubiertas de clatrina.

❖ **Endocitosis Mediada por Caveolas:** es un tipo de endocitosis independiente de clatrina muy importante en las funciones biológicas de regulación de lípidos, transporte vesicular y señalización celular. Por otra parte, se está estudiando su papel en el desarrollo de ciertas enfermedades como cáncer, diabetes e infección por virus. Las caveolas son invaginaciones de unos 50-80 nm que se encuentran en la membrana plasmática y están compuestas por caveolinas. Las caveolinas son proteínas de 21 KDa que se encuentran ancladas a la membrana plasmática por medio de una secuencia hidrofóbica.

❖ **Macropinocitosis:** es el mecanismo empleado por la célula para engullir grandes cantidades de fluido extracelular. En este caso, la membrana plasmática forma unas invaginaciones conocidas como vesículas pinocíticas, que son extensiones de la membrana plasmática en forma de láminas, que cuando se cierran, forma grandes orgánulos conocidos como macropinosomas (>200nm). La macropinocitosis está regulada por las proteínas globulares conocidas como actinas. En este mecanismo, la endocitosis no está mediada por la naturaleza de la sustancia internalizada ni por receptores, sino tan solo por la polimerización de la actina citosólica.

❖ **Fagocitosis:** este es un tipo de mecanismo endocítico solo presente en células especializadas, como células del sistema inmune (macrófagos, neutrófilos, monocitos, etc.), cuya función principal es internalizar patógenos, células muertas y restos celulares. En esta ocasión, la distorsión de la membrana plasmática está mediada por el reconocimiento de determinados receptores, es energéticamente

³⁵ Vesícula sináptica: pequeñas esferas formadas por parte de la membrana plasmática, ubicadas en el extremo de los axones en las neuronas del sistema nervioso.

costosa y origina la formación de un fagosoma, con forma y tamaño dictado por la naturaleza del material internalizado, que puede tener un tamaño de 5-10 μm .

Se muestra en la Figura 12 las diferencias en la forma y tamaño de las deformaciones de la membrana plasmática, según el mecanismo de endocitosis.

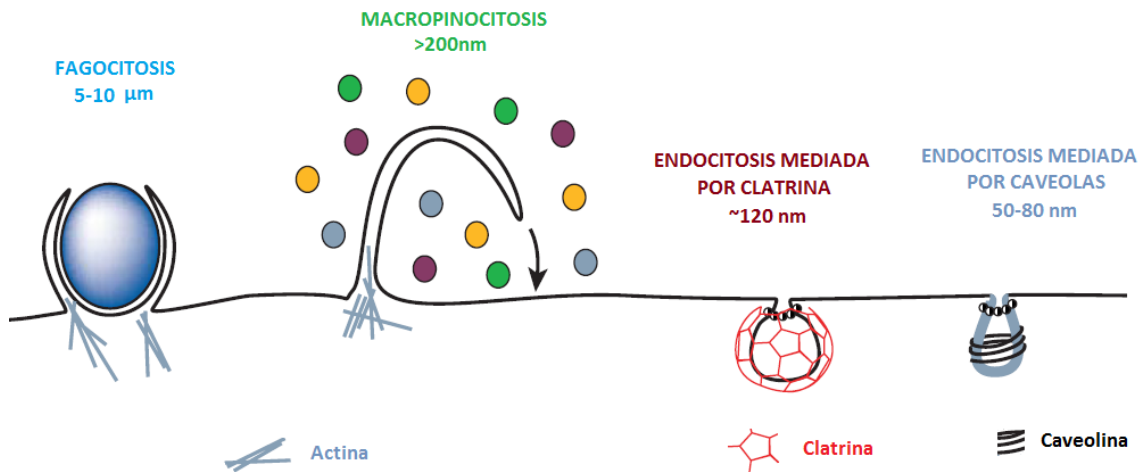


Figura 12: Representación de los diferentes mecanismos de endocitosis: fagocitosis, macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina o endocitosis mediada por caveolas.

1.6.3 Tráfico endocítico

El proceso de endocitosis no solo es complejo en cuanto al mecanismo de captación del agente exógeno, sino que además conlleva todo un despliegue metabólico. Como se ha explicado en el apartado anterior, el primer paso es la modelación de la membrana en una invaginación, que una vez formada se desprende como una vesícula al interior citosólico. A partir de ese momento, la vesícula sufre una serie de modificaciones que alteran su naturaleza y características.

En primer lugar, la vesícula se convierte en un endosoma temprano, en el que se va incrementando progresivamente la concentración de H_3O^+ , debido a la acción de diversas enzimas como GTPasas y quinasas. Este endosoma temprano es conducido a la red del trans Golgi, donde se unen diferentes proteínas al endosoma convirtiéndolo en un endosoma tardío, cuya principal característica es poseer un $\text{pH} \sim 5$. Transcurrido este punto, todos aquellos nutrientes, proteínas y orgánulos reciclables son devueltos al citosol, mientras que aquellas sustancias que no han sido liberadas sufren degradación enzimática. Esta degradación ocurre cuando el endosoma tardío se fusiona con el orgánulo conocido como lisosoma, el cual contiene proteasas, y que es el encargado de la digestión celular. Se muestra esta secuencia de acontecimientos en Figura 13, donde pueden observarse los cambios de pH , niveles de proteasas y concentraciones de diversos electrolitos según la etapa de la vesícula internalizada:

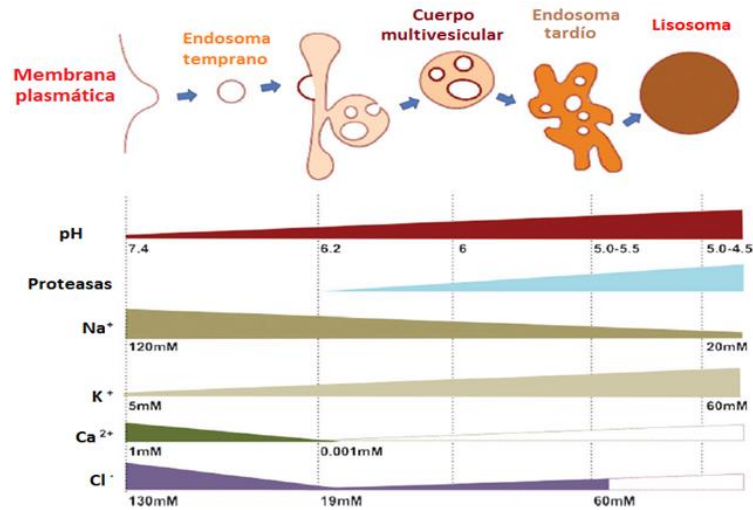


Figura 13: Esquema de los diferentes compartimentos endocíticos, los endosomas tempranos, los cuerpos multivesiculares, los endosomas tardíos y los lisosomas.

La degradación lisosomal es uno de los obstáculos que han de superar los sistemas de transporte de fármacos bioactivos, como las proteínas o los ácidos nucleicos. Resulta crucial la liberación de la sustancia activa del endosoma tardío antes de la llegada del lisosoma. Este concepto se conoce como escape endosomal. No obstante, existen ciertas aplicaciones que se benefician de la retención endosomal como técnicas de diagnosis e imagen.

Con el propósito de estudiar sistemas nanométricos que puedan ser internalizados en células por el proceso de endocitosis, se detalla a continuación el estudio de estabilidad, toxicidad e internalización celular de sistemas muy prometedores como transporte de fármacos: micelas PIC dendríticas.

2 OBJETIVOS

Preparación de micelas PIC de origen polimérico con estabilidad suficiente para su aplicación in vivo, por tratarse de sistemas muy interesantes para aplicaciones biomédicas, como sistemas de liberación de fármacos. Para ello se propone la síntesis de copolímero de bloque PEG-GATG con grupos azida en el extremo terminal de las cadenas de PEG, que permiten su posterior funcionalización mediante CuAAC.

Los objetivos específicos de este proyecto son:

1. Síntesis de tres generaciones de copolímero dendrítico $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-N}_3$, y su funcionalización mediante CuAAC.
2. Preparación de micelas PIC y estudio de su estabilidad atendiendo a dos factores diferentes: grupo funcional del copolímero del bloque y longitud de la cadena de polilisina.
3. Estudio de citotoxicidad mediante ensayo MTT de $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-CO}_2^-$, $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-PhCO}_2^-$, PLL_{60} y de la micela PIC entre $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-PhCO}_2^-$ y PLL_{68} .
4. Estudio de internalización celular mediante Microscopia de Fluorescencia de PLL_{68} , de $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-PhCO}_2^-$ y de la micela PIC entre $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-PhCO}_2^-$ y PLL_{68} .

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Procedimiento General

El ácido 3,4,5-tri-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etil)benzoico (**7**), MeO-PEG₅₀₀₀-NH₂ (**6**) y RGD-PEG-[G3]-PhCO₂⁻ (**28**) fueron preparados previamente en este grupo de investigación.

La azida sódica (NaN₃) fue comprada a Wako. El 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), 1-hidroxi benzotriazol (HOBt) y ácido 7-hidroxi-4-metil-3-cumarilacético (HMCA) fueron comprados a Sigma-Aldrich. El catalizador de Paladio/carbón activo (10 % Pd) y hidrobromuro de polilisina (PLL) fueron comprados a Fluka. La Alexa Flúor® 488 éster de succinimidilo fue comprada a invitrogen™.

El agua empleada fue de grado Milli-Q. Los demás disolventes empleados fueron de grado HPLC.

Los espectros de RMN se registraron en espectrómetros Bruker DPX 250 (250 MHz para ¹H y 63 MHz para ¹³C), Varian Mercury 300 (300 MHz para ¹H y 75 MHz para ¹³C) y Bruker AMX500 (500 MHz para ¹H). Para los espectros de RMN se emplearon CDCl₃, D₂O, DMSO y MeOD como disolventes, expresando los desplazamientos químicos en ppm (δ) utilizando tetrametilsilano (CDCl₃), la señal del HOD (D₂O), y la señal correspondiente al pico residual del disolvente (MeOD y DMSO), como referencia. Se utilizó el programa Mestre-C (*Mestrelab Research*) para el procesamiento de los espectros. Los espectros de FT-IR fueron registrados en Bruker IFS-66v (Csl) y en Varian 670-IR.

Los espectros de MALDI-TOF MS se registraron en un espectrómetro Bruker Autoflex MALDI-TOF.

Las medidas de DLS fueron realizadas en instrumento Malvern Nano ZS (Malvern Instruments, U.K.) operando a 633 nm con un ángulo de dispersión de 173°.

Para la cromatografía en capa fina se empleó gel de sílice 60F₂₅₄ Merck y las manchas se visualizaron bajo luz UV (254 nm) para aquellos compuestos que absorben a dicha longitud de onda, y también por el revelado al calor de los cromatofolios de capa fina previamente tratados con ácido fosfomolíbico.

Las ultrafiltraciones se llevaron a cabo utilizando una membrana Amicon® YM3 (MWCO 3KDa) y célula agitadora Millipore (47 mm diámetro) de acero inoxidable y vidrio borosilicatado.

Las muestras para imagen de AFM fueron preparadas depositando una disolución de micelas en PBS en obleas de silicio. Las medidas de AFM se realizaron usando un Multimode NanoScope V system (Veeco, Santa Barbara, CA) operando en modo de contacto (tapping mode). Tip Characteristics: 1-10 OHm-cm Phosphorus (n)

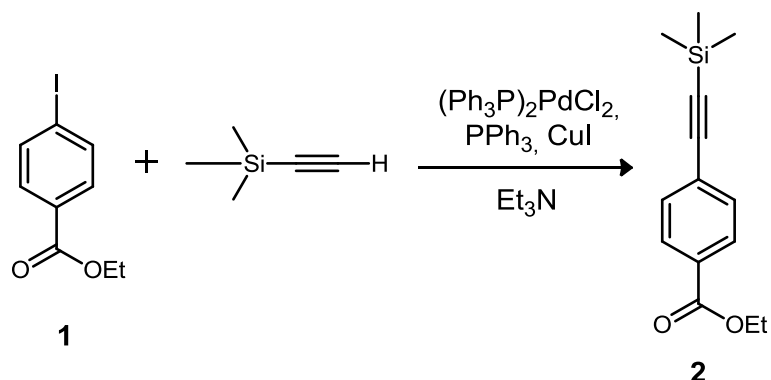
doped Si. Cantilever T: 3.5 - 4.5 μm . Frequency: 257-342 KHz. Tip ROC < 10 nm. Tip ROC Max: 12.5 nm.

Los valores de absorbancia y fluorescencia fueron medidos un lector de placas Berthold Tech. Mithras LB 940.

Las imágenes de microscopio se tomaron con una cámara digital Olympus DP-71 montada en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Las fotos no fluorescentes se tomaron con ópticas DIC (Differential Interference Contrast).

Los espectros de fluorescencia fueron registrados con un Espectrofluorímetro FluoroMax-3 de Jobin Yvon Horiba.

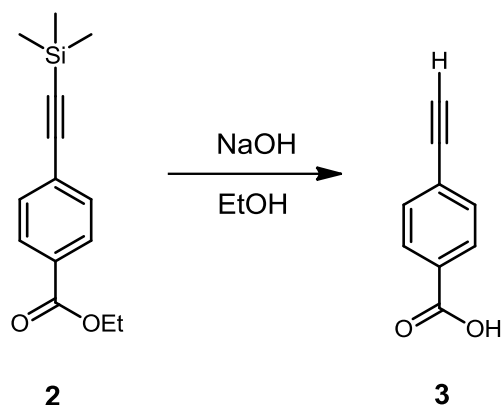
3.2 Síntesis de 4-((trimetil-silil)-etnil)benzoato de etilo



Se disolvió **1** (16.55 g, 59.95 mmol) con 75 mL de Et_3N seca, bajo atmósfera de argón. Se le añadió secuencialmente $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$ (168 g, 0.240 mmol), PPh_3 (252 mg, 0.960 mmol) y CuI (285 mg, 1.50 mmol). Por último, se añadió TMS acetileno (7.1 g, 71.94 mmol) y se dejó la reacción con agitación magnética durante 15h a t.a.. La purificación se realizó en columna de sílica gel empleando un gradiente de hexano: acetato de etilo hasta el 10%, obteniéndose **2** (14.6 g, 98.8%), como un aceite amarillo.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.94 (d, $J=8.52$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J=8.55$ Hz, 2H), 4.33 (q, $J=7.12$ Hz, 3H), 1.34 (t, $J=7.13$ Hz, 2H), 0.236 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 165.8, 131.7, 129.9, 129.2, 127.5, 104.1, 97.4, 60.1, 14.2, 0.3.

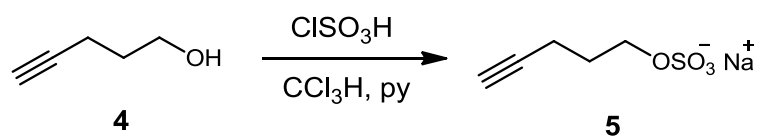
3.3 Síntesis de ácido 4-etinilbenzoico



Se disolvió **2** (11.27 g, 0.046 mol) con 30.7 mL de EtOH y se añadieron 45.7 mL de una disolución acuosa 1N de NaOH, se dejó la mezcla durante 2h a 0°C, bajo agitación magnética. Transcurrido ese tiempo, se puso a reflujo durante 4h. Se dejó enfriar a t.a. y se extrajo con Et₂O (2 veces), la fase acuosa se acidificó con HCl 1N, produciéndose la aparición de un precipitado rosa. Se extrajo la fase acuosa acidificada, con Et₂O, esta fase orgánica se lavó con H₂O (2 veces), se secó con Na₂SO₄ y se filtró. Se obtuvo **3** (6.68 g, 99.4%) como un sólido marrón, tras evaporación del disolvente.

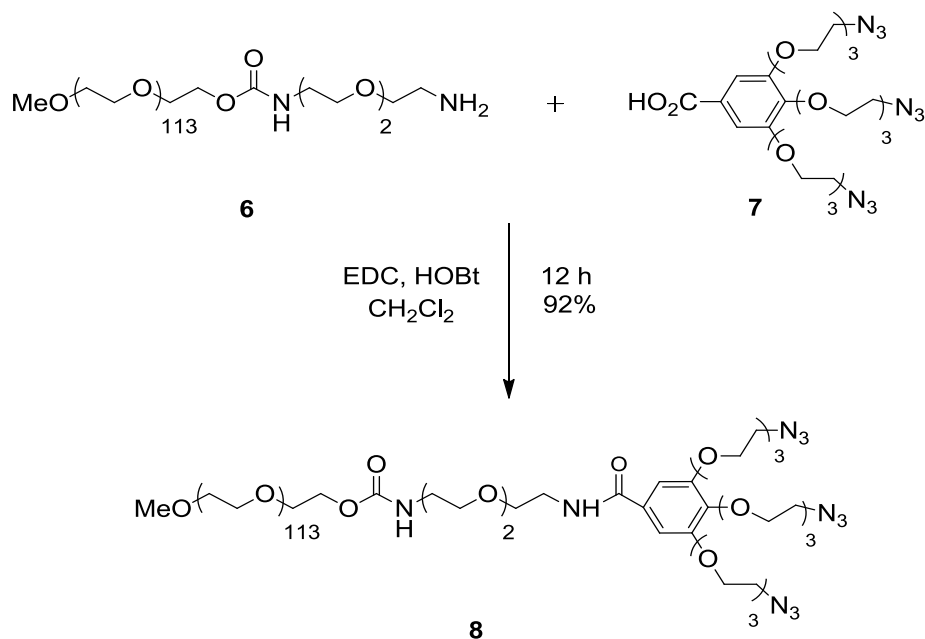
¹H RMN (300 MHz, MeOD) δ: 7.99 (d, J=8.61 Hz, 2H), 7.55 (d, J=8.55 Hz, 2H), 3.70 (s, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ: 169.1, 133.1, 132.0, 130.8, 128.4, 83.7, 81.7.

3.4 Síntesis de sulfato de 1-pent-4-inilo



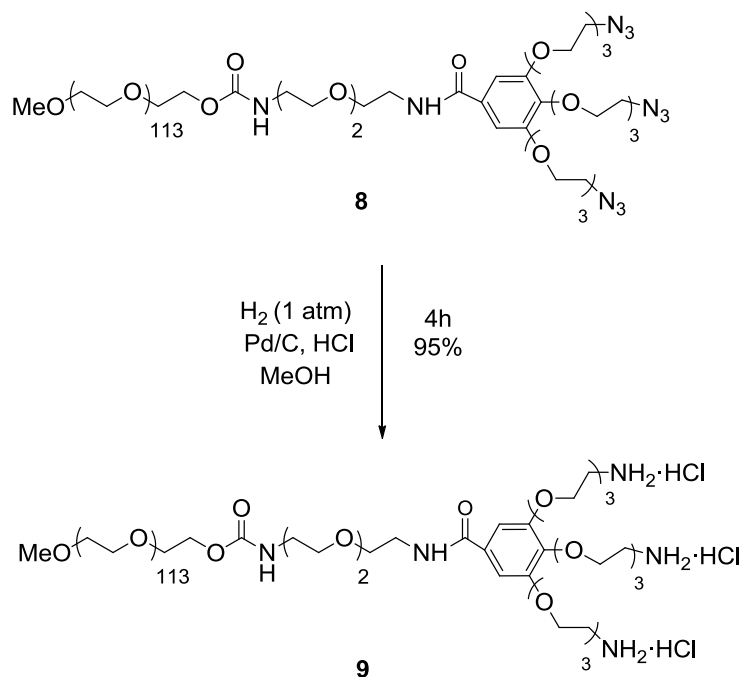
Se añadió el ácido clorosulfónico (395 μL , 5.94 mmol) gota a gota a una disolución de piridina (0.983 mL, 13.08 mmol) en CHCl_3 (5.4 mL) a 0°C . Después de 30 min bajo agitación magnética, se añadió **4** (553 μL , 5.94 mmol) y se dejó la reacción 4h a 0°C . Posteriormente, la reacción se llevó a temperatura ambiente y, tras permanecer 12h bajo agitación magnética, se extrajo con H_2O . La fase acuosa se trató con Na_2CO_3 saturado hasta que se detuvo el desprendimiento de CO_2 . La mezcla resultante se evaporó, se disolvió con EtOH caliente y se filtró para dar lugar a **5** (1.04 g, 95%).

^1H RMN (300 MHz, D_2O) δ : 4.22 (t, $J=6.10$ Hz, 2H), 2.41-2.36 (m, 3H), 1.95 (m, 2H), 1.21 (t, $J=7.2$ Hz, 1H) ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ : 86.7, 71.9, 69.9, 29.6, 16.3.

3.5 Síntesis de PEG₅₀₀₀-[G1]-N₃

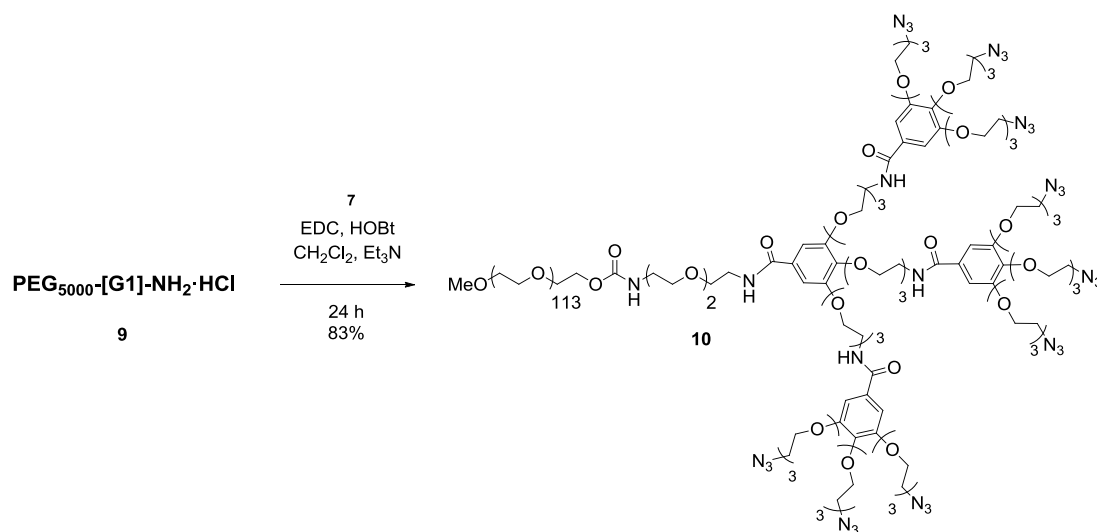
Se disolvió **6** (500 mg, 96.1 μmol) y **7** (64.1 mg, 99 μmol) bajo atmósfera de argón, en 5.0 mL de CH₂Cl₂ seco. Posteriormente, se adicionó HOBT (20.2 mg, 0.15 mmol) y EDC·HCl (28.7 mg, 0.15 mmol). Tras permanecer 12h a t.a., se evaporó el disolvente y el residuo resultante se precipitó de MeOH/ *i*-PrOH. Por último, la mezcla se filtró y se lavó 3 veces con *i*-PrOH y 3 veces con Et₂O. Se recogió **8** (515 mg, 92%) como un sólido blanco.

¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ : 7.23 (s, 2H), 4.35-4.27 (m, 6H), 4.18 (m, 2H), 4.01-3.5 (m, 488H), 3.5-3.44 (m, 6H), 3.41 (s, 3H), 3.29 (t, $J=5.0$, 2H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ : 166.8, 156.3, 152.3, 141.3, 129.6, 106.9, 72.3, 71.8, 70.9, 70.4, 69.9, 69.4, 68.9, 63.8, 58.9, 50.5, 40.6, 39.7. IR (KBr, cm⁻¹): 3263, 2889, 2107, 1655, 1113. MALDI-TOF MS (HABA, reflected mode): m/z calculado: M_p 5827.3 [M+Na]⁺, M_n 5768.6, M_w 5810.5; Encontrado: M_p 5786.8 [M+Na]⁺, M_n 5813, M_w 5842.

3.6 Síntesis de PEG₅₀₀₀-[G1]-NH₂·HCl

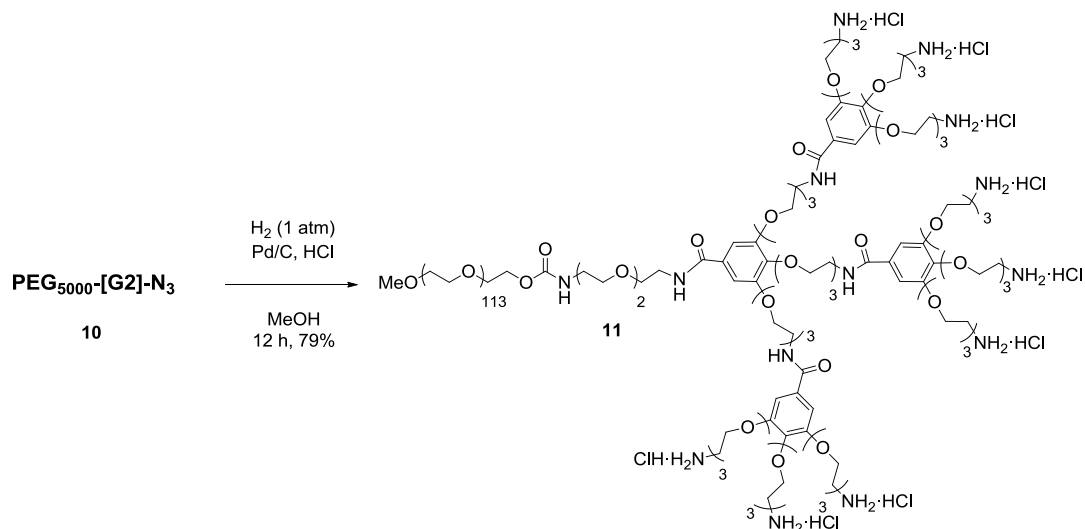
Se disolvió **8** (300 mg, 51.1 μmol) en 5.11 mL de MeOH desoxigenado. Se añadió Pd/C (60 mg, 20% en peso) y se colocó un globo con hidrógeno. Por último, se añadió HCl 3M (86 μl , 254 μmol). Tras 4h bajo agitación magnética se filtró la mezcla a través de Celita, lavando con MeOH, que posteriormente se evaporó. Se obtuvo **9** (286 mg, 95%) como un sólido amarillo.

^1H RMN (400 MHz, D_2O) δ : 7.21 (s, 2H), 4.38-4.13 (m, 8H), 4.01-3.50 (m, 488H), 3.40 (s, 3H), 3.29 (t, $J=4.90$, 2H), 3.23 (t, $J=5.0$, 6H). IR (KBr, cm^{-1}): 3467, 2895, 1116.

3.7 Síntesis de PEG₅₀₀₀-[G2]-N₃

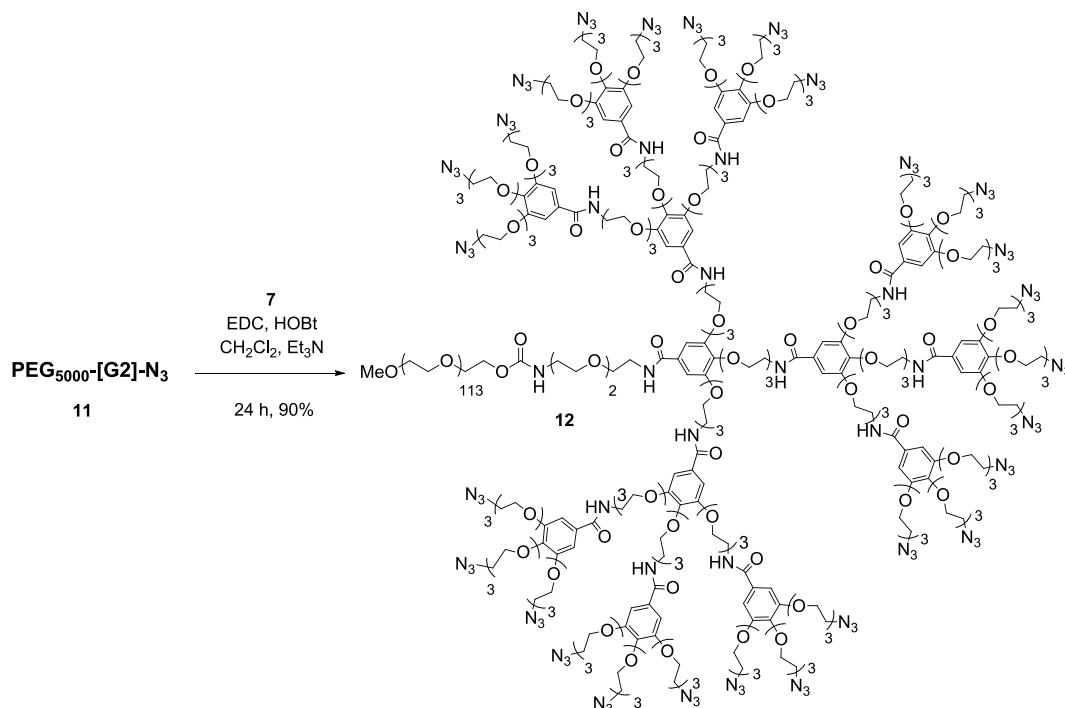
Se disolvió **9** (200 mg, 33.9 μ mol) y **7** (72.3 mg, 113 μ mol) bajo atmósfera de argón, en 1.03 mL de CH₂Cl₂ seco. Posteriormente, se añadió Et₃N (29 μ L, 0.205 mmol), HOBt (20.8 mg, 154 μ mol) y EDC·HCl (29.5 mg, 154 μ mol). Se dejó la reacción con agitación magnética durante 24h. Para su elaboración, se evaporó el disolvente en el rotavapor y el crudo obtenido se precipitó de MeOH/*i*-PrOH. Tras 4h en la nevera, la mezcla se filtró y se lavó 3 veces con *i*-PrOH y 3 veces con Et₂O. Se obtuvo **10** (216 mg, 83%) como un sólido blanco.

¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ : 7.21-7.04 (m, 8H), 4.40-4.05 (m, 26H), 4.01-3.51 (m, 566H), 3.51-3.41 (m, 18H), 3.40 (s, 3H), 3.29 (m, 2H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ : 166.9, 156.3, 152.4, 141.5, 129.4, 106.9, 72.4, 71.8, 70.8, 70.3, 70.0, 69.6, 69.0, 63.9, 59.0, 50.7, 40.7, 40.0. IR (KBr, cm⁻¹): 3260, 2887, 2106, 1653, 1114. MALDI-TOF MS (HABA, reflected mode): *m/z* calculado: M_p 7619.2 [M+Na]⁺, M_n 7560.4, M_w 7602.4; Encontrado: M_p 7575.0 [M+Na]⁺, M_n 7746, M_w 7827.

3.8 Síntesis de PEG₅₀₀₀-[G2]-NH₂·HCl

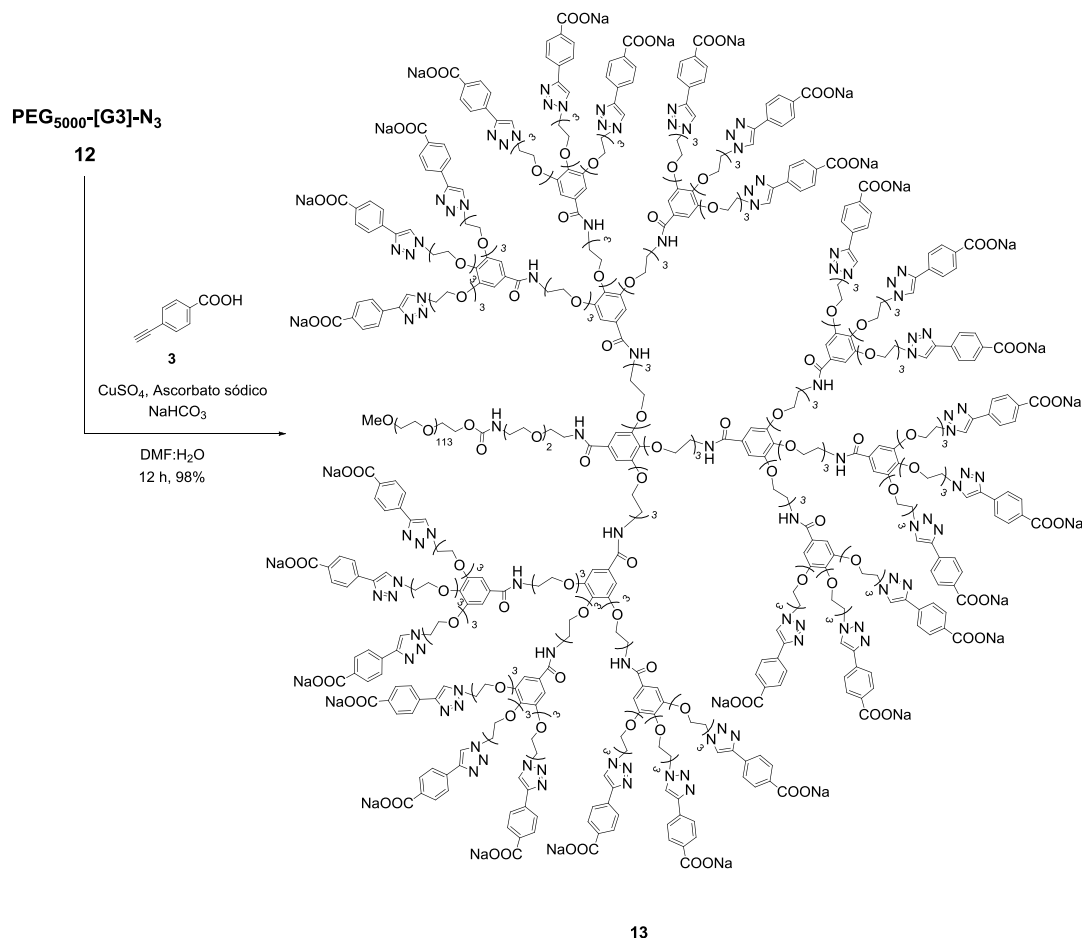
Se disolvió **10** (200 mg, 26.3 μmol) en 2.63 mL de MeOH y se desoxigenó la solución antes de añadir Pd/C (40 mg, 20% en peso). Se introdujo un globo con hidrógeno y por último, se añadió HCl 3M (131 μl , 394 μmol). Tras 12h bajo agitación magnética se filtró la mezcla a través de Celita lavando con MeOH, que posteriormente, se evaporó. Se obtuvo **11** (160.5 mg, 79.3%) como un sólido amarillo.

¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ : 7.20-7.02 (m, 8H), 4.38-4.02 (m, 26H), 4.02-3.48 (m, 566H), 3.40 (s, 3H), 3.29 (m, 20H). IR (KBr, cm⁻¹): 3464, 2891, 1116.

3.9 Síntesis de PEG₅₀₀₀-[G3]-N₃

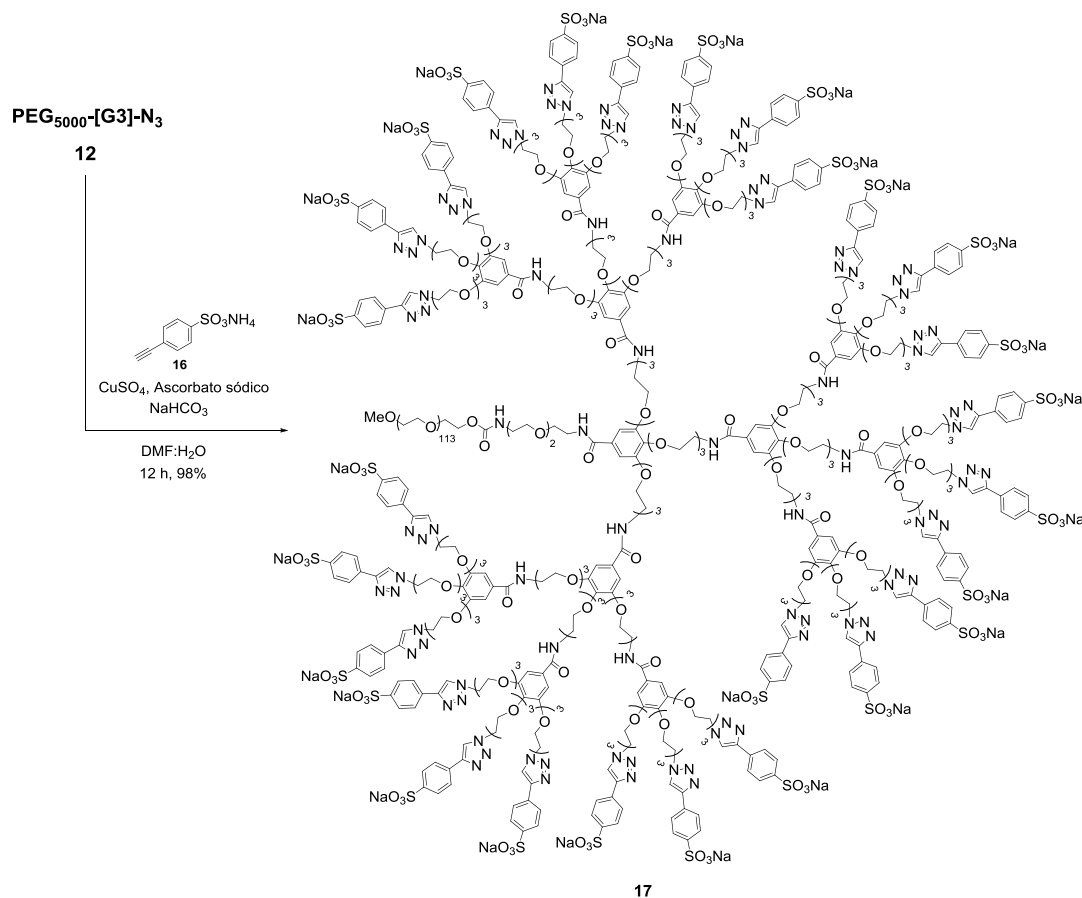
Se disolvió **11** (150 mg, 19.5 μmol) y **7** (123 mg, 193 μmol) bajo atmósfera de argón, en 1.75 mL de CH₂Cl₂ seco. Posteriormente se añadió Et₃N (49 μL , 350 μmol), HOBt (35.5 mg, 263 μmol) y EDC·HCl (50.3 mg, 263 μmol). Se dejó la reacción con agitación magnética durante 24h. Para su elaboración, se evaporó el disolvente en el rotavapor y el crudo obtenido se precipitó de MeOH/ *i*-PrOH. Tras 4h en la nevera, la mezcla se filtró y se lavó 3 veces con *i*-PrOH y 3 veces con Et₂O. El sólido fue disuelto en CH₂Cl₂ que se volvió a precipitar, esta vez de CH₂Cl₂/Et₂O. Se obtuvo **14** (227.5 mg, 90%) en forma de sólido blanco.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.14-7.05 (m, 26H), 4.32-4.07 (m, 80H), 3.98 -3.22 (m, 800H), 3.40-3.29 (m, 59H). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 167.1, 167.0, 152.7, 152.5, 152.3, 141.0, 129.6, 107.1, 106.9, 72.3, 70.7, 70.6, 70.5, 69.9, 69.8, 69.7, 68.9, 58.9, 50.9, 50.8, 50.7, 50.6, 39.8, 39.7. IR (KBr, cm⁻¹): 3275, 2871, 2106, 1652, 1110. MALDI-TOF MS (DHB, reflected mode): *m/z* calculado: M_p 12994.7 [M+Na]⁺, M_n 12935.9, M_w 12977.9; Encontrado: M_p 12438 [M+Na]⁺, M_n 12410.6, M_w 12457.0.

3.10 Síntesis de PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCOONa

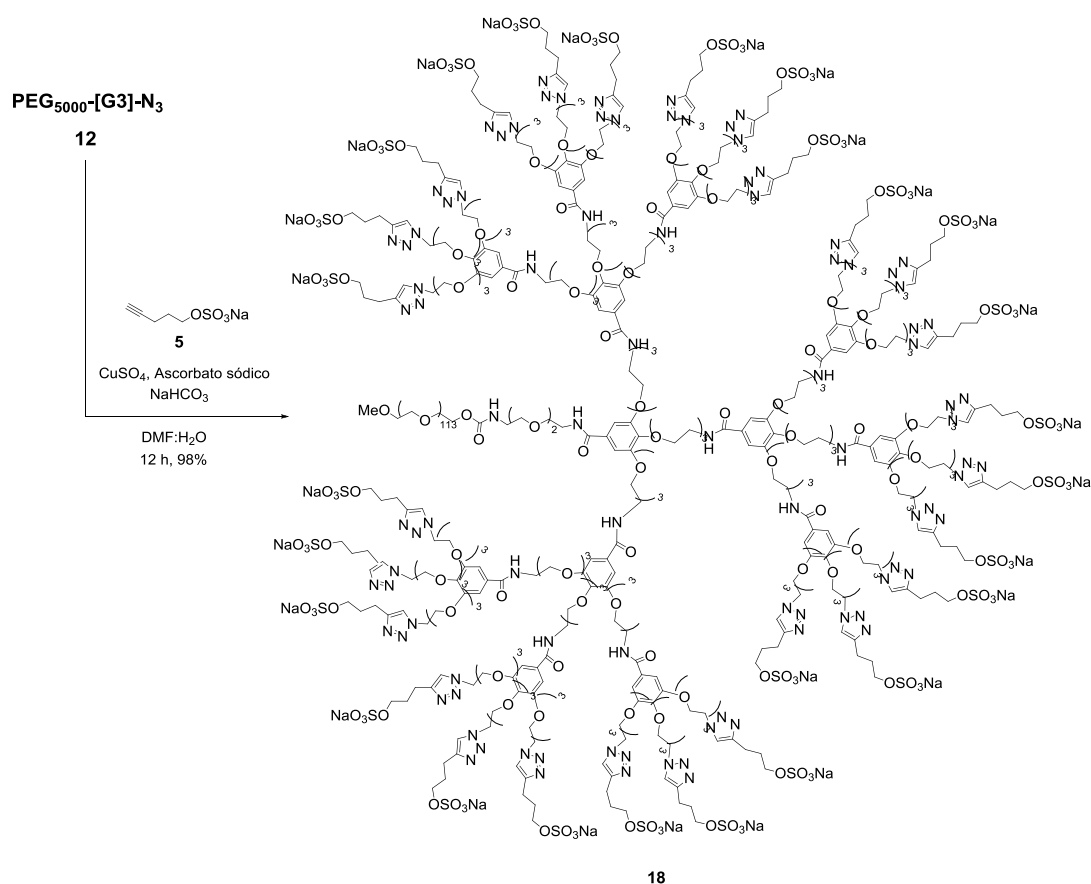
Se introdujo **12** (30.0 mg, 2.30 μmol) y **3** (12.2 mg, 125 μmol) en un balón, donde fueron disueltos con 0.31 mL de DMF y 0.25 mL de H₂O. Posteriormente, se añadió NaHCO₃ (21 mg, 0.25 mmol) y disoluciones acuosas de de CuSO₄ (31.2 μL , 3.11 μmol) y ascorbato sódico (31.2 μL , 15.5 μmol). Se dejó bajo agitación magnética durante 12 h, y se ultrafiltró el crudo de reacción (Amicon[®] YM3). Se concentró y se obtuvo **13** (37.0 mg, 99%) como un sólido amarillo.

¹H RMN (500 MHz, D₂O) δ : 8.10-8.02 (m, 27H), 7.85-7.77 (m, 54H), 7.58-7.47 (m, 54H), 6.86-6.78 (m, 26H), 4.50-4.40 (m, 54H), 3.91-3.38 (m, 885H). IR (KBr, cm⁻¹): 3422 (N-H), 2875 (C-H), 1589 (COO⁻), 1112 (C-O).

3.11 Síntesis de PEG₅₀₀₀-[G3]-PhSO₃Na

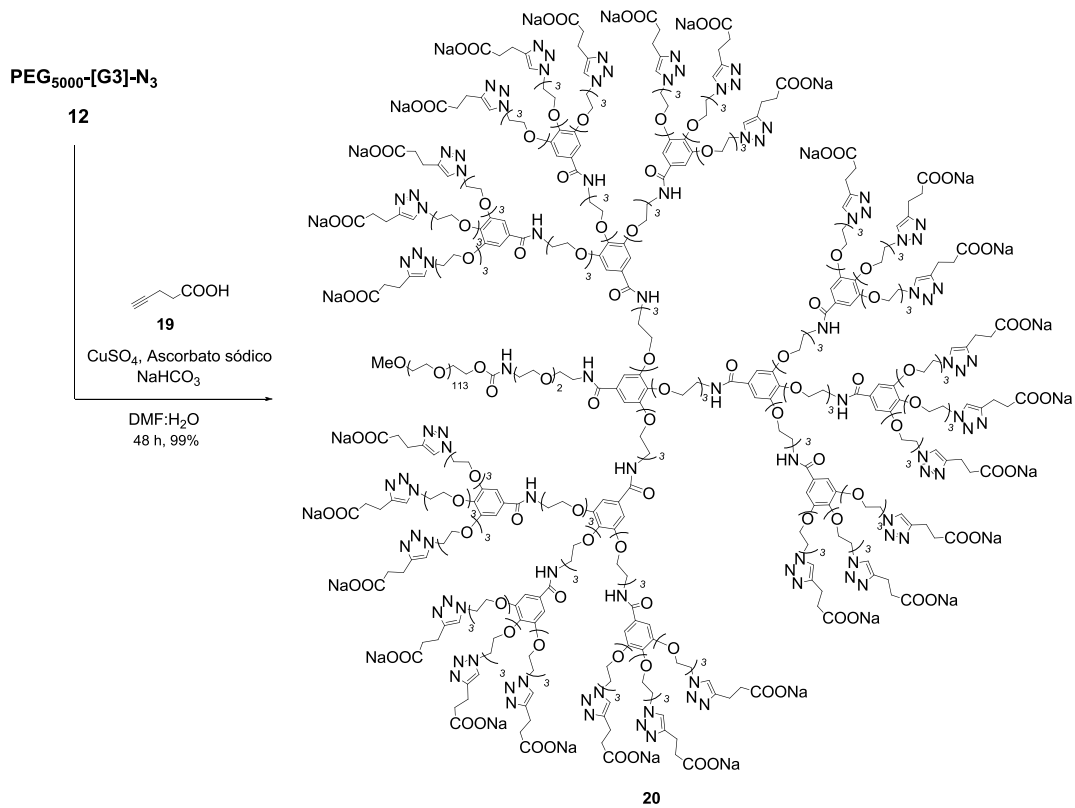
Se introdujo **12** (15.0 mg, 1.15 μmol) y 4-etinilfenil sulfonato **16** (12.4 mg, 62 μmol) en un balón, donde fueron disueltos con 0.16 mL de DMF y 0.13 mL de H₂O. Posteriormente, se añadió CuSO₄ en disolución acuosa (15.6 μL , 1.56 μmol) y ascorbato sódico (15.6 μL , 7.80 μmol). Se dejó bajo agitación magnética durante 12 h, y se procedió al ultrafiltrado del crudo de reacción (Amicon[®] YM3). Se concentró y se obtuvo **17** (21.7 mg, 99%) como un sólido blanco.

¹H RMN (500 MHz, D₂O) δ : 8.15-8.08 (m, 27H), 7.75-7.67 (m, 54H), 7.65-7.55 (m, 54H), 6.91-6.81 (m, 26H), 4.51-4.44 (m, 54H), 3.91-3.38 (m, 885H). IR (KBr, cm⁻¹): 3444 (N-H), 2874 (C-H), 1583 (COO⁻), 1124 (C-O).

3.12 Síntesis de PEG₅₀₀₀-[G3]-OSO₃Na

Se introdujo **12** (30.0 mg, 2.31 μmol) y 4-pentilil sulfato **5** (34.8 mg, 187 μmol) en un balón, donde fueron disueltos con 0.31 mL de DMF y 0.25 mL de H₂O. Posteriormente, se añadió CuSO₄ en disolución acuosa (31.2 μL , 3.12 μmol) y ascorbato sódico (31.2 μL , 15.6 μmol). Se dejó bajo agitación magnética durante 12 h, y se ultrafiltró del crudo de reacción (Amicon[®] YM3). Se concentró y se obtuvo como un sólido **18** (40.8 mg, 98%).

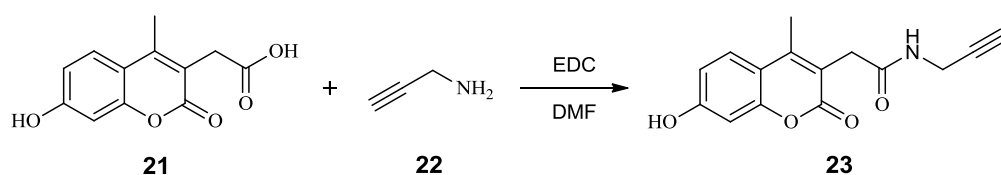
¹H RMN (500 MHz, D₂O) δ : 7.84-7.77 (m, 27H), 7.17-7.08 (m, 26H), 4.57-4.51 (m, 54H), 4.21-4.07 (m, 80H), 4.06-3.99 (m, 54H), 3.94-3.53 (m, 800H), 3.43 (s, 3H), 3.28-3.23 (m, 2H), 2.77-2.68 (m, 54H), 2.02-1.92 (m, 54H). IR (KBr, cm⁻¹): 3444 (N-H), 2874 (C-H), 1583 (COO⁻), 1124 (C-O).

3.13 Síntesis de PEG₅₀₀₀-[G3]-COONa

Se introdujo **12** (30.0 mg, 2.30 μmol) y **19** (12.2 mg, 125 μmol) en un balón, donde fueron disueltos con 0.31 mL de DMF y 0.25 mL de H_2O . Posteriormente, se añadió NaHCO_3 (21 mg, 0.25 mmol) y disoluciones acuosas de CuSO_4 (31.2 μL , 3.11 μmol) y ascorbato sódico (31.2 μL , 15.5 μmol). Se dejó bajo agitación magnética durante 48 h, y se ultrafiltró el crudo de reacción (Amicon[®] YM3) lavando con agua MilliQ. Se concentró y se obtuvo **20** (37.0 mg, 99%) como un sólido blanco.

^1H RMN (D_2O) δ : 7.80-7.76 (m, 27H), 7.63-7.42 (m, 26H), 4.61-4.47 (m, 54H), 4.24-4.02 (m, 80H), 3.97-3.50 (m, 800H), 3.43 (s, 3H), 3.28-3.22 (m, 2H), 2.96-2.86 (m, 54H), 2.55-2.47 (m, 54H). IR (KBr, cm^{-1}): 3392 (N-H), 2871 (C-H), 1581 (COO^-), 1117 (C-O).

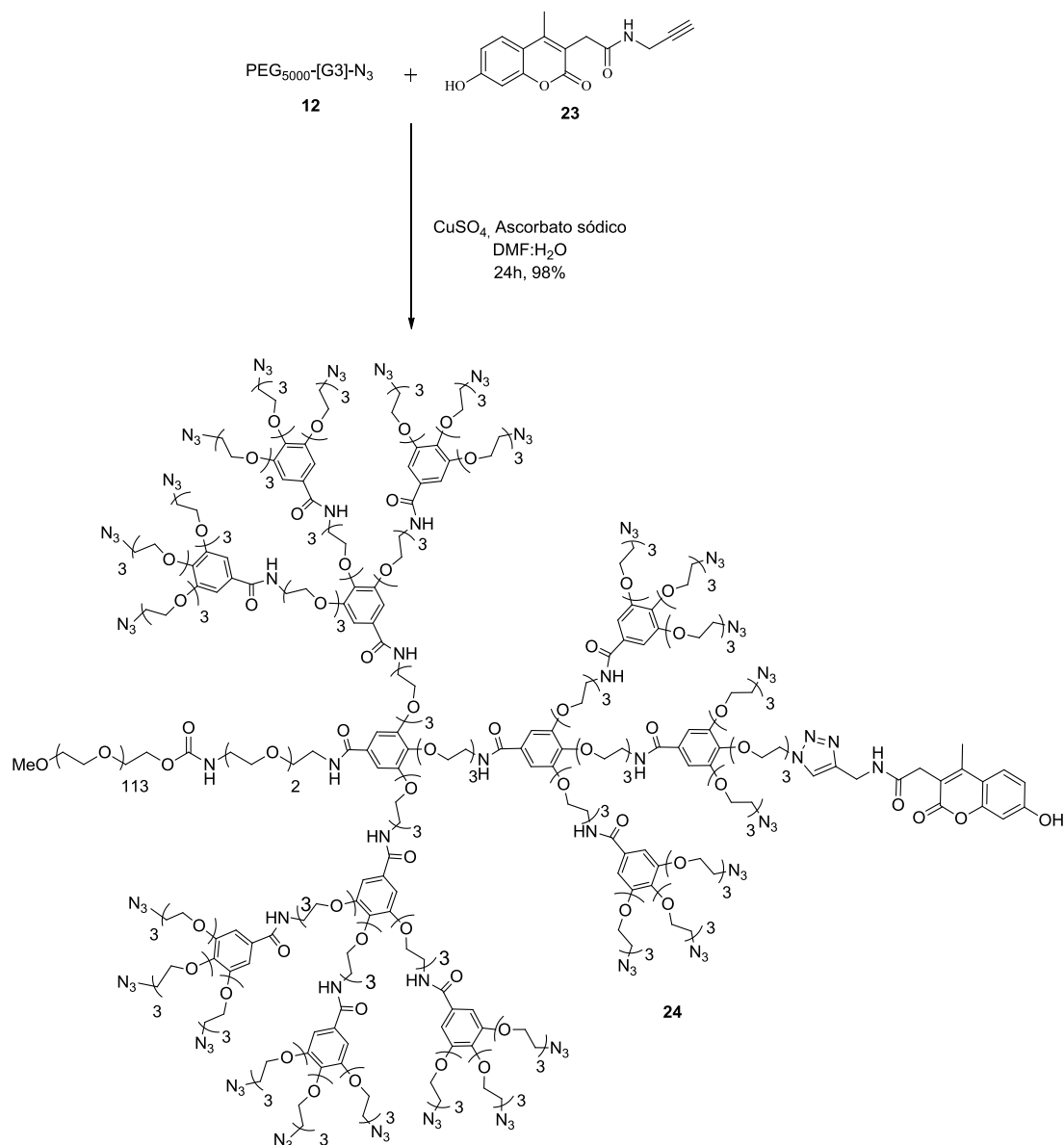
3.14 Síntesis de Propargil 7-hidroxi-4-metil-3-cumarilamida



Se introdujeron ácido 7-hidroxi-4-metil-3-cumarilacético (HMCA) **21** (30 mg, 0.129 mmol) y EDC (30.7 mg, 0.160 mmol) en un balón bajo atmósfera de argón. Se disolvieron con 2.58 mL de DMF y posteriormente se añadió propargilamina **22** (10.26 μ L, 0.160 mmol). El crudo de reacción se purificó mediante MPLC en gradiente CH_2Cl_2 - $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (5%), obteniéndose **23** (13.3 mg, 38%).

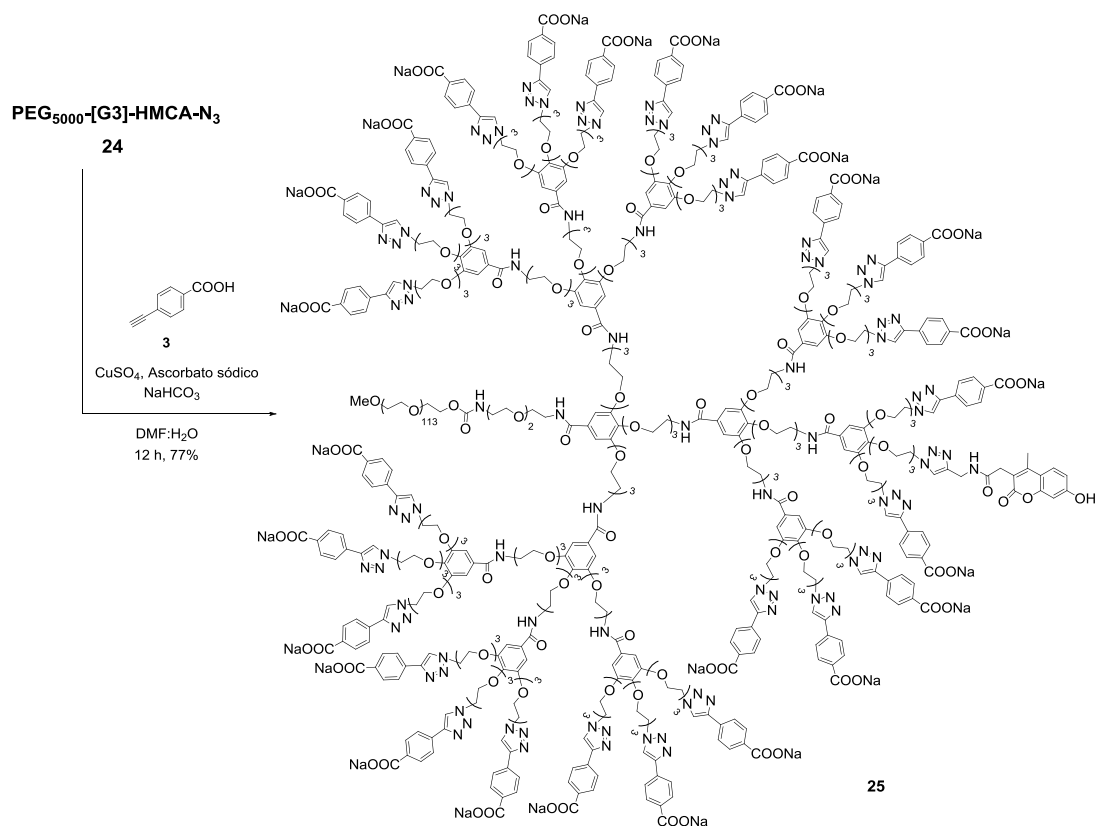
^1H RMN (D_2O) δ : 7.60 (d, $J=8.80$ Hz, 2H), 6.78 (dd, $J_1=8.80$ Hz, $J_2=2.40$ Hz, 2H), 6.67 (d, $J=2.30$, 2H), 3.91 (d, $J=2.41$, 2H), 3.60 (s, 1H), 2.55 (t, $J=2.55$ Hz, 1H), 2.37 (s, 3H).

HR ESI-MS m/z : Calculado $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NNaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 294.0737; Encontrado 294.0739.

3.15 Síntesis PEG₅₀₀₀-[G3]-HMCA-N₃

Se introdujo **12** (29.2 mg, 2.24 μ mol) en un balón, donde fue con 0.31 mL de DMF y 0.29 mL de H₂O. Posteriormente, se añadieron disoluciones acuosas de **23** (182 μ L, 3.36 μ mol), CuSO₄ (31.2 μ L, 3.11 μ mol) y ascorbato sódico (31.2 μ L, 15.5 μ mol). Se dejó bajo agitación magnética durante 48 h, y se ultrafiltró el crudo de reacción (Amicon[®] YM3) lavando con agua MilliQ. Se concentró y se obtuvo **24** (29.5 mg, 98%) como un sólido.

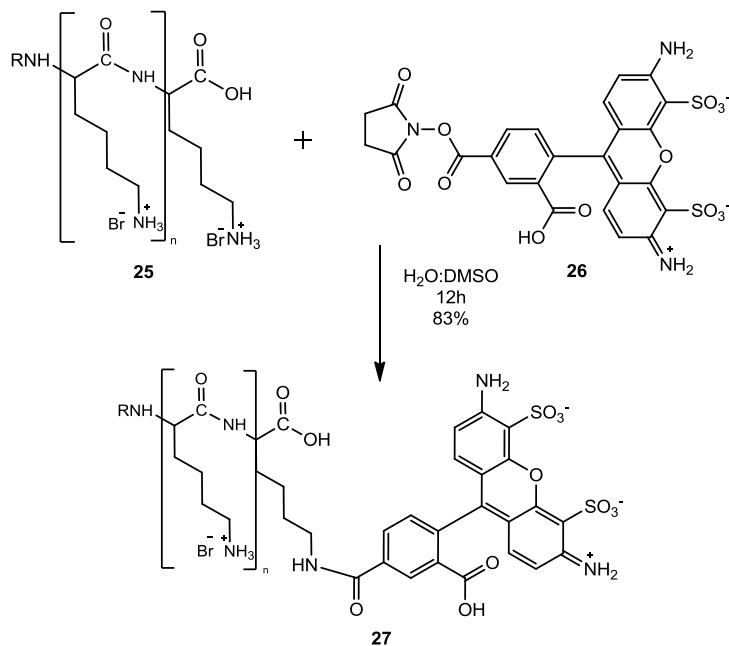
¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.45 (sa, 14H), 7.84 (s, 1.2H), .7.63-7.52 (m, 1.2H), 6.82-6.73 (m, 1.2H), 4.50-4.43 (m, 2.4H), 4.30-4.24 (m, 24H), 4.18-4.00 (m, 80H), 3.82-3.24 (m, 858H), 2.31-2.23 (m, 3.6H).

3.16 Síntesis de PEG₅₀₀₀-[G3]-HMCA-PhCO₂Na

Se introdujo **22** (11.8 mg, 0.888 μmol) y **3** (10.5 mg, 72 μmol) en un balón, donde fueron disueltos con 240 μL de DMF y 96 μL de H₂O. Posteriormente, se añadió NaHCO₃ (8.1 mg, 96 μmol) y disoluciones acuosas de CuSO₄ (12 μL , 1.19 μmol) y ascorbato sódico (12 μL , 6.00 μmol). Se dejó bajo agitación magnética durante 12 h, y se ultrafiltró el crudo de reacción (Amicon® YM3). Se concentró y se obtuvo **23** (12.1 mg, 77%) como un sólido amarillento.

¹H RMN (500 MHz, D₂O) δ : 8.12-8.03 (m, 27H), 7.85-7.74 (m, 52H), 7.59-7.47 (m, 52H), 6.86-6.77 (m, 26H), 4.50-4.39 (m, 54H), 3.91-3.37 (m, 885H). IR (KBr, cm⁻¹): 3422 (N-H), 2875 (C-H), 1589 (COO⁻), 1112 (C-O).

3.17 Síntesis de PLL-Alexa 488



Se introdujo en un balón PLL·HBr (800 μ L, 0.32 μ mol, $M_n=12485$) en disolución acuosa 0.1M de NaHCO₃ pH=8.5. A continuación, se añadió Alexa Flúor® 488 éster de succinimidilo **25** (40 μ L, 0.64 μ mol) disuelto en DMSO seco, que se mantuvo bajo agitación magnética a t.a. durante 12h. La mezcla de reacción se purificó con filtros de centrifugación Amicon® Ultra-4 (MWCO 3000 Da) lavando con agua MilliQ y disolución 0.01M de HBr, para dar la PLL etiquetada **27** (3.6 mg, 83%). Un grado de funcionalización de 0.6 para la PLL etiquetada, fue determinado mediante la absorbancia a 494 nm ($\epsilon_{495}=73000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

3.18 Micelas PIC

PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCOONa (**13**), PEG₅₀₀₀-[G3]-COONa (**20**), PEG₅₀₀₀-[G3]-PhOSO₃Na (**17**) y PEG₅₀₀₀-[G3]-OSO₃Na (**18**) se disolvieron separadamente en una mezcla de Na₂HPO₄ 10 mM/NaOH 0.1 M (15% v/v). Hidrobromuro de Poli-L-lisina (Mw= 14158, GP=68) se disolvió en una solución de NaH₂PO₄ 10 mM. Todas las disoluciones se filtraron a través de filtros de nylon de 0.45 µm. Las micelas PIC se prepararon mezclando las disoluciones de copolímero de bloque aniónico y polilisina en relación de cargas 1:1, para dar disoluciones de pH=7.4, que se dejaron envejecer durante un mínimo de 30 minutos, antes de su análisis.

3.19 Reticulación de micela PIC

Se preparó 1 mL de la micela PIC (1.37 mg/mL) formada entre PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCOONa (**13**) y PLL₆₈, como se detalla en el apartado anterior. Se dejó estabilizar durante 1h bajo agitación magnética, y se añadió EDC (30.6 μ L, 50 mg/mL en disolución acuosa). Se dejó la mezcla durante 2h y, posteriormente, se dializaron las micelas resultantes con PBS 10 mM a pH=7.4 durante 12h.

3.20 Cuantificación de polilisina libre

La cuantificación de polilisina libre en disolución, se realizó siguiendo la derivatización mediante OPA³⁶. Para ello se preparó la micela y se dejó envejecer durante 1h. Posteriormente, se procedió a su ultracentrifugación (3h, 50000 rpm) y el sobrenadante se diluyó con 0.4M de ácido bórico a pH=9.7. De esta disolución, se situaron 50 μ L en una placa de 96 pocillos donde se le añadieron 50 μ L de una disolución fluorimétrica de ensayo (0.04% (w/v) o-ftaldehido, 0.1% (v/v) éter dietílico, 0.2% (v/v) β -mercaptoetanol en ácido bórico). La fluorescencia se midió en un lector placas (Berthold Tech. Mithras LB 940) siendo 355 nm, la longitud de onda de excitación, y 460 nm, la longitud de onda de emisión. El contenido de PLL se calculó extrapolando los valores de fluorescencia a la recta de calibrado preparada con disoluciones patrón. Finalmente, el porcentaje de PLL libre se calculó teniendo en cuenta el total de PLL presente para la formación de la micela.

³⁶ Benson JR, Hare PE. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975;72(2):619-22.

3.21 Test de citotoxicidad

La viabilidad de células A549 se determinó usando el método clásico³⁷ conocido como MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol). En resumen, se incubaron 4000 células por pocillo, en una placa de 96 pocillos, con 100 μ L de DMEM completo (10% de SFB, 1% de Penicilina/Estreptomicina y Glutamina) a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Transcurridas 24h, se sustituyó el medio existente por medio que contenía los componentes a testar, disueltos a diferentes concentraciones. Se dejó un tiempo de incubación de 24h, tras el cual se adicionaron 10 μ L de MTT (de una disolución 5mg/mL en suero) a cada pocillo. Tras permanecer 4h a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂, se añadieron 100 μ L de disolución solubilizante de MTT (SDS 10%, 0.01M HCl en agua MilliQ). La absorbancia fue medida a 620 nm en un lector de placas (Berthold Tech. Mithras LB 940).

³⁷ Mosmann, T. J. *Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.

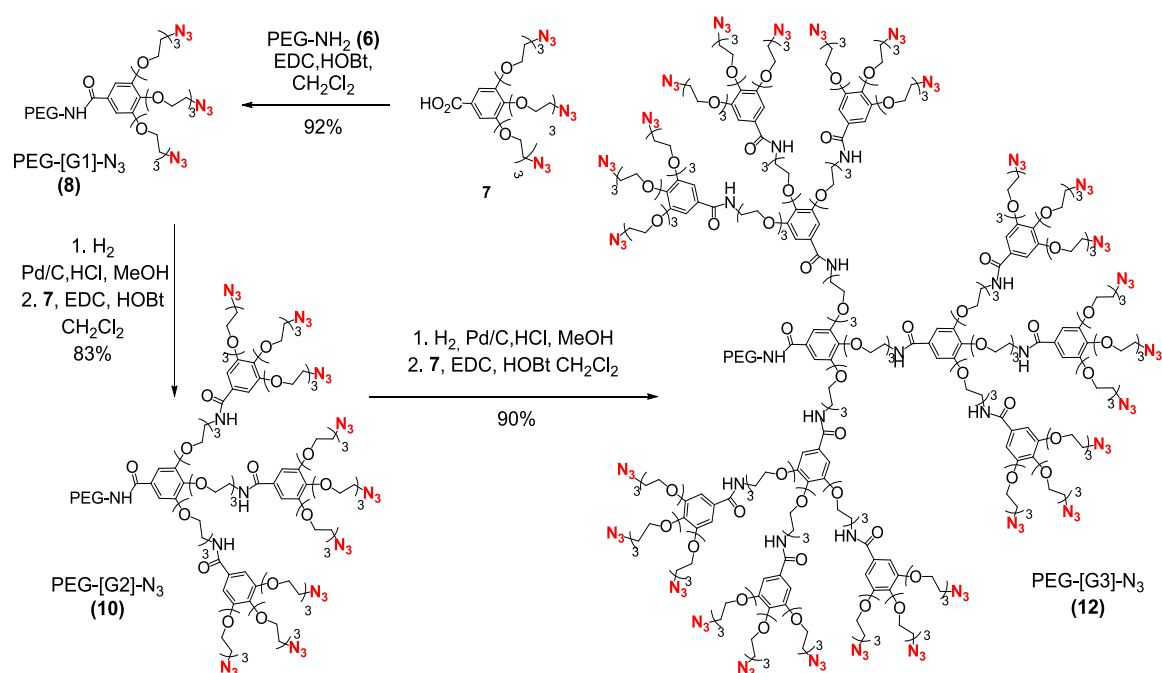
3.22 Estudios de internalización

La monitorización de los compuestos fluorescentes **25** y **27** se llevó a cabo en células A549 en DMEM completo a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Para eliminar las moléculas no unidas a las células, éstas se lavaron tres veces con PBS pH=7.4. Después de la incubación con los compuestos a ensayar y el posterior lavado, las células A549 se mantuvieron en DMEM a 37°C en atmósfera de 5% CO₂, y se observaron a los tiempos indicados. Los orgánulos ácidos fueron teñidos con LysoTracker Red® a una concentración de 50 nM, durante 30 min a 37°C en atmósfera de 5% CO₂.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Síntesis del copolímero de bloque dendrítico:

La síntesis del copolímero de bloque **8**, **10** y **12** se llevó a cabo siguiendo una ruta divergente, es decir, el crecimiento de la fracción dendrítica se realizó desde el punto focal hacia la periferia. Fueron sintetizadas tres generaciones azido-dendríticas G1, G2 y G3; construidas mediante reacciones sucesivas de hidrogenación (activación) y acoplamiento peptídico (crecimiento), que se resumen en el Esquema 3.



Esquema 3: Preparación de PEG₅₀₀₀-[G1]-N₃, PEG₅₀₀₀-[G2]-N₃ y PEG₅₀₀₀-[G3]-N₃.

La preparación del copolímero de bloque dendrítico³⁸ **12** comenzó con el acoplamiento peptídico entre PEG₅₀₀₀-NH₂ (**6**) y el ácido **7**³⁹ (Et₃N, EDC, HOBT, CH₂Cl₂), dando lugar al copolímero de bloque PEG₅₀₀₀-[G1]-N₃ (**8**), que se purificó por precipitación (92%). El compuesto fue identificado por ¹H RMN, por la aparición en el espectro de las señales correspondientes a los protones aromáticos (7.25 ppm) y los protones metilénicos en α al grupo azida (3.53-3.48 ppm), a la vez que desaparecieron los protones en α al grupo amino (3.05-2.95 ppm).

Para la síntesis del copolímero de bloque PEG₅₀₀₀-[G2]-N₃ (**10**), los grupos azida terminales de **8** se redujeron mediante hidrogenación catalítica (Pd/C 20%, HCl, MeOH, 1 atm H₂, 4h) para dar lugar al correspondiente PEG₅₀₀₀-[G1]-NH₃Cl (**9**) (95%). Este producto se identificó por ¹H RMN en D₂O, mostrándose la total desaparición del multiplete a 3.43-3.39 ppm asignable a los protones metilénicos α a la azida, a la vez

³⁸ Fernandez-Megia, E.; Correa, J.; Riguera, R. *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 3104-3111.

³⁹ Amaral S., Fernandez-Villamarin M., Correa J., Riguera R., Fernandez-Megia E., *Org. Lett.* **2011**, 4522-4525.

que se observó la aparición de un multiplete a 3.25-3.21 ppm, propio de protones metilénicos α a aminas primarias protonadas, como se muestra en la Figura 14:

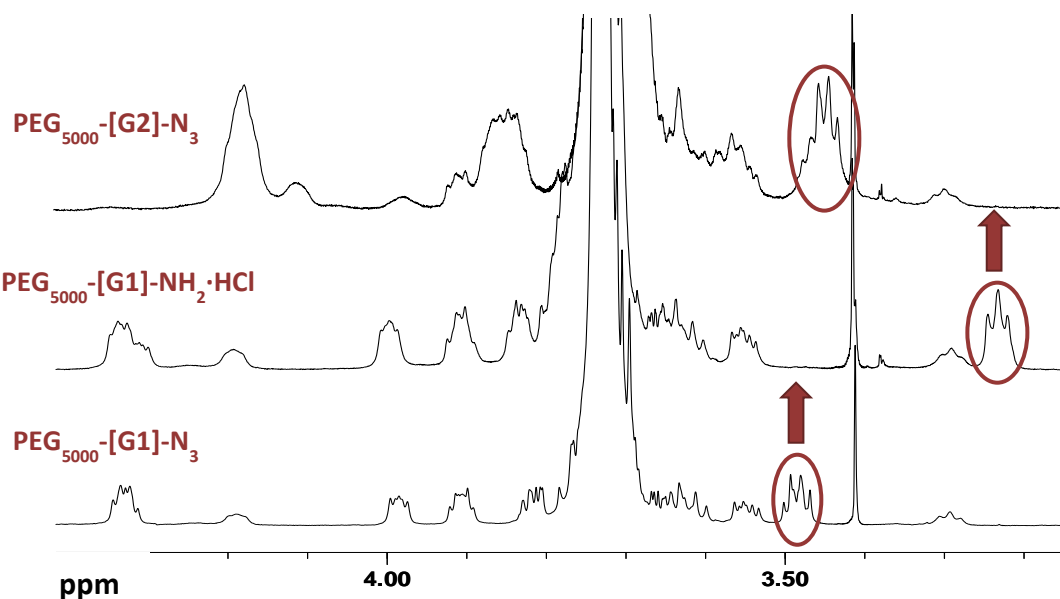


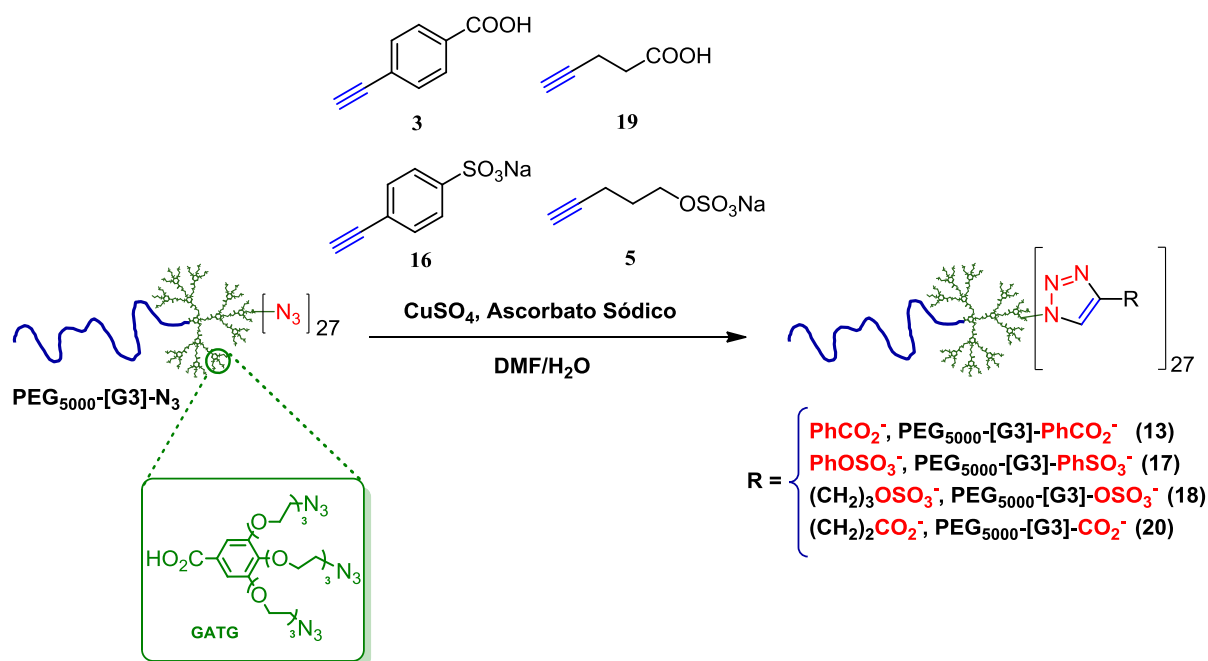
Figura 14: ^1H RMN en D_2O de los compuestos $\text{PEG}_{5000}\text{-[G1]-NH}_2\cdot\text{HCl}$ y $\text{PEG}_{5000}\text{-[G1]-N}_3$.

Además, se realizó un espectro IR para comprobar la desaparición de la banda correspondiente al grupo azida a 2100 cm^{-1} . A continuación, mediante acoplamiento peptídico con la unidad de repetición **7**, se obtuvo el copolímero de bloque dendrítico $\text{PEG}_{5000}\text{-[G2]-N}_3$ (**10**). La síntesis del compuesto $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-N}_3$ se consiguió usando la misma secuencia: hidrogenación de los grupos azida de **10**, seguida del acoplamiento de la unidad de repetición GATG. El compuesto **12** se obtuvo en un 90% de rendimiento y mostró las señales esperadas en sus espectros de ^1H RMN (D_2O) e IR.

Todos los compuestos **8**, **10** y **12** correspondientes a G1, G2 y G3, respectivamente, se purificaron por precipitación en *i*-PrOH/MeOH. Además, en el caso del compuesto **12**, se procedió a precipitarlo también de CH_2Cl_2 /éter dietílico.

4.1.1 Reacción CuAAC:

La etapa final en la síntesis del copolímero dendrítico aniónico fue la funcionalización del copolímero de bloque mediante reacción de cicloadición [3+2] azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC). Esta reacción se llevó a cabo para $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-N}_3$ con ácido 4-etinilbenzoico (**3**), ácido 4-pentinoico (**19**), el sulfato **5** y 4-etinilfenil sulfonato (**16**). En todos los casos, el procedimiento fue idéntico, disolviendo el $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-N}_3$ y el ácido o sulfato correspondiente en $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ 1:1. Para el caso de la funcionalización con los ácidos carboxílicos, se añadió también NaHCO_3 para mantener pH básico y favorecer la cinética de la CuAAC. Como precatalizadores de esta reacción se emplearon, en todos los casos, el sulfato de cobre y ascorbato sódico, que reaccionaron para dar lugar a la especie activa Cu^{I} .



Esquema 4: Funcionalización de $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-N}_3$ con grupos aniónicos mediante CuAAC.

La purificación de los productos se llevó a cabo mediante ultrafiltración con membranas de celulosa regenerada (Amicon[®] YM3). La caracterización de los productos de reacción se realizó por ^1H RMN en D_2O gracias a la aparición de las señales aromáticas correspondientes al triazol (δ 8 ppm), y la desaparición de la señal a δ 3.4 ppm correspondiente a los protones en α al grupo azida. Además, la funcionalización completa se confirmó mediante un espectro IR, para descartar la presencia de grupos azida, mediante la desaparición de la señal a 2100 cm^{-1} , como se muestra en la Figura 15:

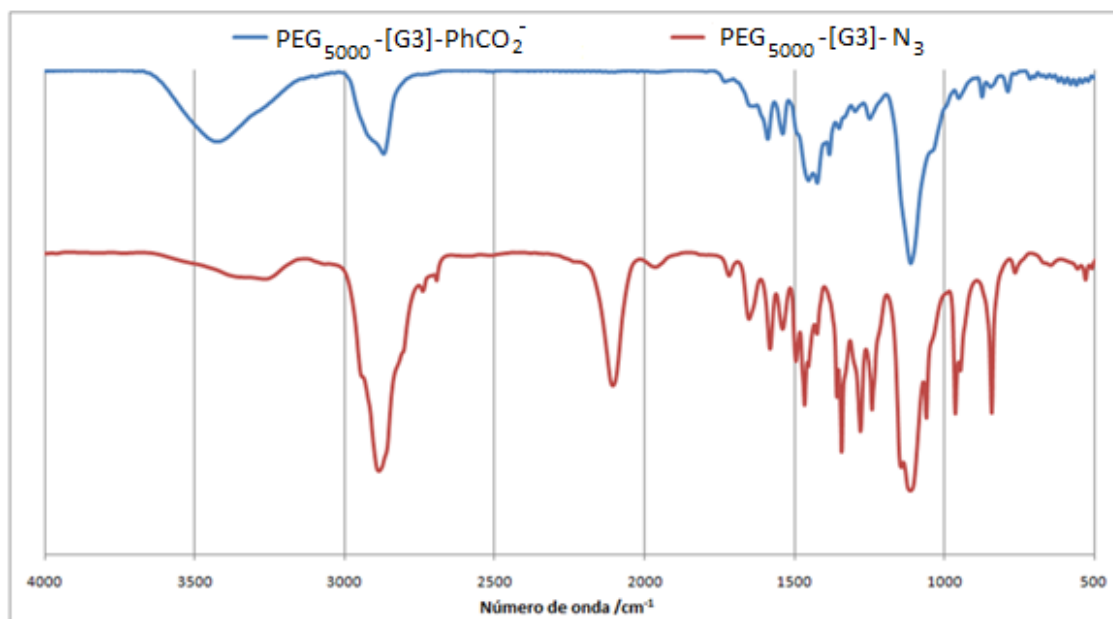


Figura 15: Espectro IR de $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-PhCO}_2^-$ y $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-N}_3$.

4.2 Micelas PIC

Las micelas PIC son un tipo de micelas formadas por la atracción electrostática entre dos o más componentes poliméricos. En los últimos años, las micelas poliméricas han despertado gran interés como vehículos para el transporte de fármacos. Sin embargo, estas micelas presentan como principal limitación su estabilidad en condiciones fisiológicas ($\text{pH}=7.4$, 37°C y 150 mM NaCl), principalmente debido a la concentración salina. Las micelas PIC son sensibles a la fuerza iónica, ya que la presencia de sales origina la pérdida de la interacción electrostática entre los componentes y causa la rotura micelar. Para superar esta limitación, se detalla a continuación un estudio de la formación y estabilidad de micelas PIC, en las que uno de los constituyentes es un copolímero de bloque dendrítico.

4.2.1 Preparación de micelas PIC:

Las micelas PIC fueron preparadas mediante la mezcla de los copolímeros dendríticos aniónicos (**13**, **17**, **18** y **20**) con polilisina (PLL), en una relación de cargas 1:1. Esta relación de cargas fue determinada por el grado de funcionalización del dendrímico (veintisiete grupos cargados) y las cantidades equivalentes de monómero de polilisina, asumiendo una ionización completa en ambos casos. Para garantizar este hecho, el copolímero dendrítico aniónico se disolvió en una mezcla $10\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ (85% v/v) y $\text{NaOH } 0.1\text{M}$ (15% v/v), dando lugar a una disolución con $\text{pH}=12$, mientras que la polilisina se disolvió en $10\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH}=5$). Ambas disoluciones son filtradas a través de filtros de nylon de $0.45\ \mu\text{m}$, para eliminar partículas de polvo, antes de proceder a mezclarlas bajo agitación magnética.

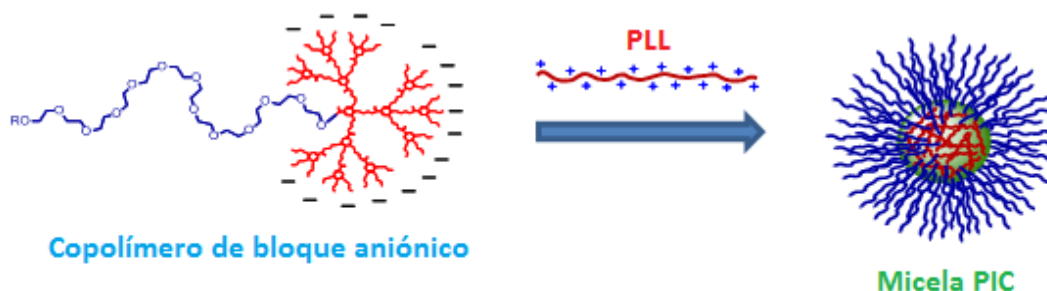


Figura 16: Representación de la formación de una micela PIC, compuesta por la interacción electrostática entre PLL y el copolímero dendrítico aniónico.

El proceso de formación y rotura de las partículas se evaluó mediante medidas de DLS (Dynamic Light Scattering). Se observó que en aquellos histogramas pertenecientes tanto a los copolímeros dendríticos aniónicos, como a la polilisina, existían especies de tamaños siempre inferiores a 10 nm, y con polidispersiones muy altas. Sin embargo, una vez formada la micela en las condiciones mencionadas, los histogramas mostraban especies de diámetros entre 20 y 30 nm, según las especies empleadas, y con una polidispersión menor a 0.2, en todos los casos.

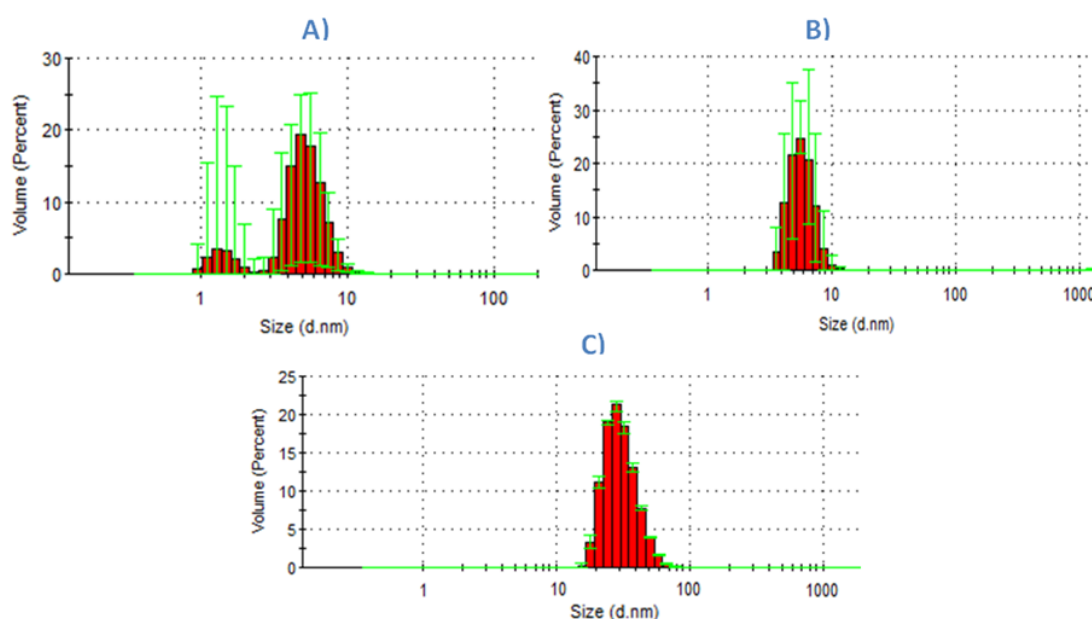


Figura 17: A) Histogramas de DLS de la disolución de PLL₆₈ en 10 mM NaH₂PO₄, PDI=0.640; B) Disolución de PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ en 10 mM Na₂HPO₄ y 15% 0.1 M NaOH, PDI=0.916; C) Micela de PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₆₈, d= 33nm, PDI=0.060.

Como se ha dicho anteriormente, la estabilidad de las micelas PIC es un factor determinante en su aplicación como sistemas de transporte de fármacos. Por tanto, fue necesario evaluar la estabilidad de las micelas formadas. Para ello se procedió a someterlas a concentraciones crecientes de cloruro de sodio, ya que aumentando la

fuerza iónica del medio se produce el apantallamiento de cargas y con ello, se pierde la interacción electrostática responsable de la organización de la micela PIC.

El procedimiento empleado consistió en estudiar los histogramas de las micelas sometidas a diversas concentraciones de cloruro de sodio, en busca de la aparición de especies menores a 10 nm, pertenecientes al copolímero de bloque y a la polilisina libre. Siguiendo este método, se observó una diferencia muy notoria entre las micelas preparadas a partir de PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PEG₅₀₀₀-[G3]-CO₂⁻, ya que para el caso de las primeras se observó su completa desorganización a 750 mM NaCl. En cambio, aquellas micelas obtenidas con PEG₅₀₀₀-[G3]-CO₂⁻ presentaron rotura inmediata al someterlas a 150 mM NaCl.

Este hecho se atribuye a la presencia de los anillos aromáticos presentes en PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻, que originan una estabilización adicional por efecto hidrofóbico. Este efecto también fue observado en micelas formadas por PEG₅₀₀₀-[G3]-OSO₃⁻ y PEG₅₀₀₀-[G3]-PhSO₃⁻, ya que las micelas de sulfato fueron estables hasta 150 mM NaCl mientras que las de sulfonato aguantaron perfectamente 1000 mM de NaCl. Puede observarse esto en la Figura 18, donde los histogramas de DLS de PEG₅₀₀₀-[G3]-OSO₃⁻ a 200 mM de NaCl muestran la existencia de especies menores a 10 nm, signo de rotura; mientras que para el caso de las micelas formadas con PEG₅₀₀₀-[G3]-PhSO₃⁻, la micela permanece intacta a una concentración de 1000 mM de NaCl.

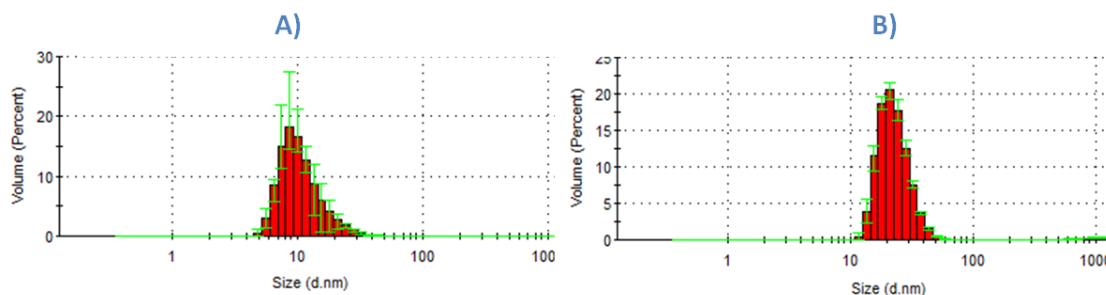


Figura 18: Histogramas de DLS de A) la micela formada por PEG₅₀₀₀-[G3]-OSO₃⁻ y PLL₆₈ a 200 mM de NaCl durante 1h; B) Histogramas de DLS de la micela de PEG₅₀₀₀-[G3]-PhOSO₃⁻ y PLL₆₈ a 1000 mM de NaCl durante 1 h.

Por tanto, queda probado que la introducción de un anillo aromático, en el grupo funcional elegido, proporciona una estabilización extra, que puede ayudar a solventar uno de los principales problemas de micelas PIC: el apantallamiento de cargas al incrementar la fuerza iónica.

4.2.2 Polilisinias con diferentes pesos moleculares

El siguiente estudio de estabilidad, se realizó con micelas PIC preparadas con PEG₅₀₀₀-[G3]-CO₂⁻ y PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y polilisinias de diferentes pesos moleculares, con el propósito de evaluar el efecto de la longitud del polímero de polilisina. Para ello, se utilizaron dos polilisinias diferentes a la empleada habitualmente (Mw= 14158,

GP=68): una de mayor peso molecular ($M_w = 43852$, GP=210) y otra de menor peso molecular ($M_w = 8395$, GP=40). El procedimiento empleado consistió en preparar micelas PIC con las distintas PLL y someter estas partículas a la misma fuerza iónica para comprobar si se observaba un comportamiento diferente según la PLL empleada.

En un primer experimento, se prepararon micelas con $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-CO}_2^-$ y ambas polilisinas. Se observó una pequeña diferencia del tamaño de la micela según la polilisina empleada. Para la PLL_{40} se obtuvieron partículas con un diámetro de ~ 16 nm mientras que para PLL_{68} las partículas fueron de ~ 21 nm y para PLL_{210} de ~ 23 nm. Así, parece que el hecho de aumentar el peso molecular de la polilisina empleada, aumenta ligeramente el tamaño de la micela.

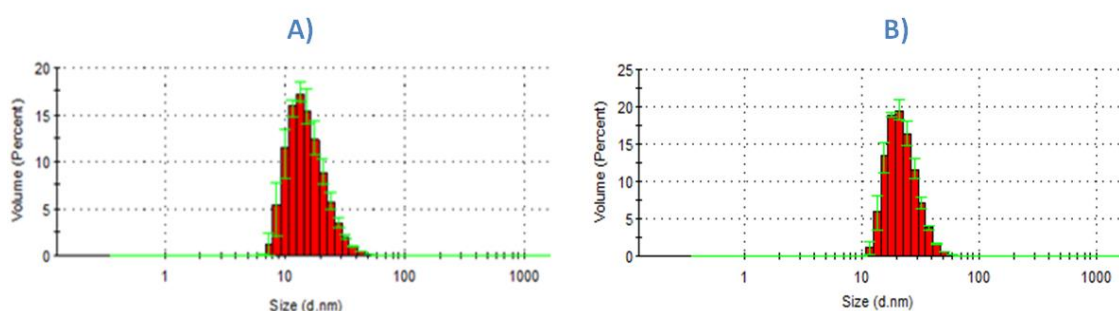


Figura 19: Histogramas de DLS de A) Micela compuesta por $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-CO}_2^-$ y PLL_{40} , $d=16$ nm, B) Micela de $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-CO}_2^-$ y PLL_{210} , $d=23$ nm.

Una vez obtenidas las dos micelas con distintas PLL se sometieron a 50 mM de NaCl durante el mismo tiempo y condiciones, observándose un comportamiento sustancialmente diferente para los dos sistemas. Se muestra en la Figura 20 como la micela formada con PLL_{40} está desestabilizada, ya que se observan poblaciones menos a los 10 nm, mientras que la micela formada con PLL_{210} permanece intacta.

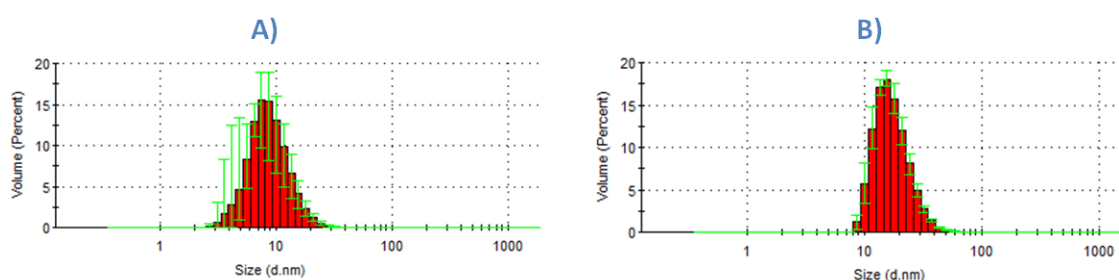


Figura 20: Histogramas de DLS de A) Micela compuesta por $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-CO}_2^-$ y PLL_{40} a 50 mM de NaCl B) Micela de $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-CO}_2^-$ y PLL_{210} a 50 mM de NaCl.

El mismo comportamiento, tanto de estabilidad como de aumento de tamaño al aumentar el peso molecular de PLL, fue observado para las micelas formadas a partir del copolímero de bloque $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-PhCO}_2^-$ con las distintas polilisinas. Se

obtuvieron micelas de 26 nm para la micela formada con PLL₄₀ y ligeramente mayores, de 35 nm, para la micela formada con PLL₂₁₀. Estos resultados pueden observarse en Figura 21:

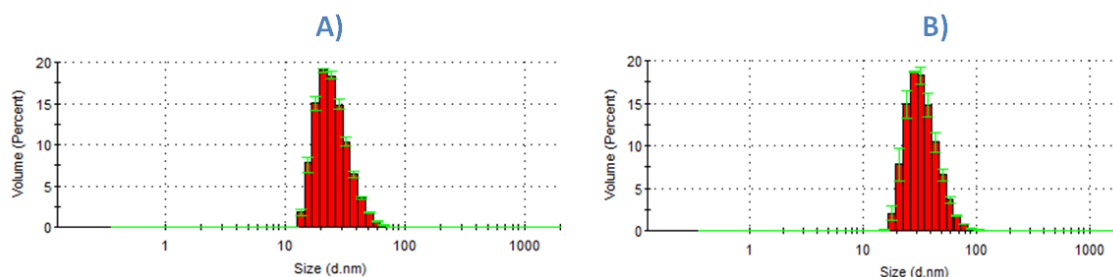


Figura 21 A) Micela compuesta por PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₄₀; d≈26nm, B) micela de PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₂₁₀, d≈35nm.

En esta ocasión, las micelas PIC fueron sometidas a una fuerza iónica mayor, 550 mM de NaCl. El comportamiento fue análogo al caso de las micelas preparadas con el copolímero de bloque no modificado con el anillo aromático: se encontró que las micelas formadas con la polilisina de menor peso molecular formaban micelas menos estables, ya que se obtenían especies de menos de 10 nm, como se observa en Figura 22.

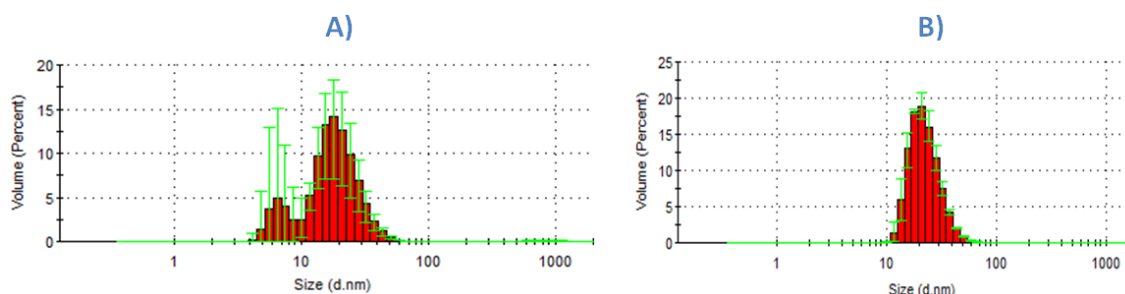


Figura 22: Histograma de DLS de A) Micela compuesta por PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₄₀ a 550 mM NaCl B) Micela de PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₂₁₀ a 550 mM de NaCl.

Por consiguiente, se han encontrado dos métodos para aumentar la estabilidad de micelas formadas por la interacción electrostática de un copolímero de bloque dendrítico y polilisina, tanto la introducción de un anillo aromático como el empleo de polilisina de mayor peso molecular.

Existe un interés añadido en micelas formadas por copolímeros de bloque modificados con grupos carboxilatos, ya que éstos poseen un pKa~5. Este hecho otorga al sistema sensibilidad al pH, ya que en condiciones ácidas los carboxilatos se

protonarán y, como consecuencia, la interacción electrostática se perderá dando lugar a la rotura de la micela.

4.2.3 Rotura a pH=5

El efecto de pH ácidos en estas micelas compuestas por PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₆₈, se evaluó sometiendo las micelas PIC a diálisis con 50 mM de tampón acetato a pH=5 y 37°C. Se encontró que tras permanecer 70 h bajo estas condiciones se producía la completa desaparición de la micela PIC, mientras que a PBS pH=7.4 permanecía estable. Para el caso de las micelas formadas con PEG₅₀₀₀-[G3]-CO₂⁻ y PLL₆₈ también se observó la rotura de la micela al someterla a pH ácidos. Esta rotura fue consecuencia de la protonación de los grupos carboxilatos, lo cual originó la pérdida de interacción electrostática, y con ello la disociación micelar. Para verificar esta hipótesis, se procedió al reticulado de estas micelas, es decir, a la formación de un enlace covalente amida entre el grupo carboxilato y amina, en vez de la atracción electrostática.

Para reticular estas micelas, se prepararon en las condiciones habituales y, después de mantenerlas bajo agitación magnética durante 1 h, se les añadió una disolución acuosa de EDC, que se dejó reaccionar durante 2 h. Para eliminar la EDC se dializaron las micelas con PBS pH=7.4 durante 12 h. Las micelas reticuladas se sometieron a un tampón acetato 50 mM pH=5 y se mantuvieron intactas durante más de 8 días.

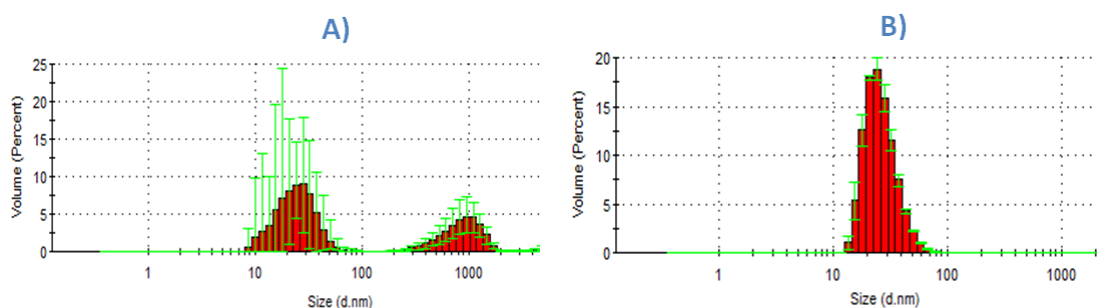


Figura 23: A) Micela de PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₆₈ formada por la interacción electrostática que, tras permanecer 70h a pH=5, se desestabiliza, B) Micela de PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₆₈ reticulada que tras permanecer 8 días a pH=5, se mantiene estable.

Estas micelas reticuladas también presentan mayor estabilidad a la fuerza iónica, ya que ahora la unión es covalente y no se afecta por el apantallamiento de cargas. Para probar esto, se sometieron las micelas a una fuerza iónica de 1 M de NaCl y no se observaron signos de desestabilización, al contrario de lo que sucede con las no reticuladas.

Por tanto, queda probado que aquellas micelas PIC formadas por la interacción electrostática de un grupo carboxilato y un grupo amina, son sensibles al pH. Esta característica las hace muy interesantes para sistemas de transporte de

fármacos, ya que tienen la capacidad de permanecer estables en condiciones fisiológicas simuladas (150 mM NaCl, 37°C) pero bajo pH=5 se promueve su disociación, y por tanto, la liberación de un posible fármaco retenido en su interior. Estas condiciones de pH ácidos se dan en los tejidos tumorales pH~6.5, debido a la mayor generación de CO₂ como consecuencia de crecimiento masivo y un metabolismo descontrolado, y también en endosomas/lisosomas (pH~5). Por todo esto, considerando las posibilidades de estos sistemas, se realizó un estudio más exhaustivo de micelas formadas entre PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₆₈, por ser éstas las micelas estables a condiciones fisiológicas simuladas (37°C, 150 mM NaCl) sensibles al pH.

4.2.4 Medidas de AFM

Para visualizar las partículas formadas entre PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₆₈, se realizaron experimentos de AFM (Atomic Force Microscopy). Para esto se depositaron las micelas PIC en disolución de PB sobre una superficie de silicio y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las imágenes obtenidas (Imagen 1) fueron tomadas en modo de contacto intermitente, y en ellas se puede observar micelas con un diámetro medio de 29 nm ± 5 nm, en el plano XY.

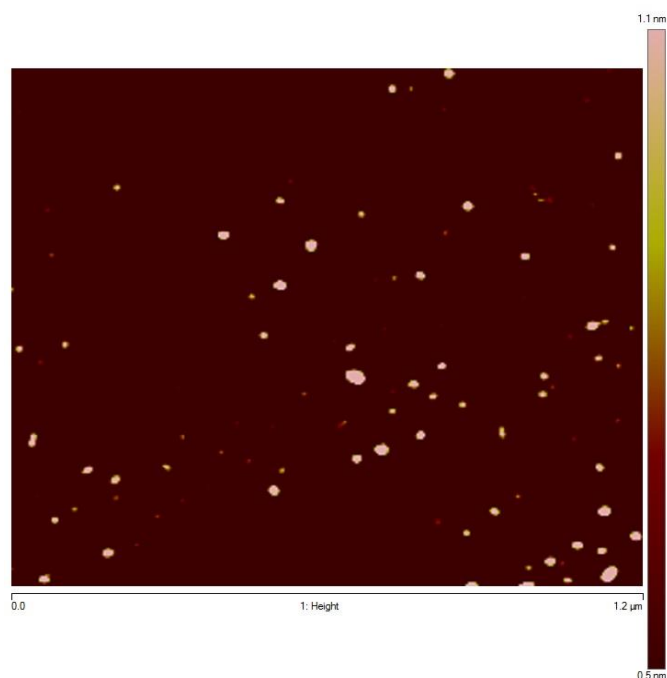
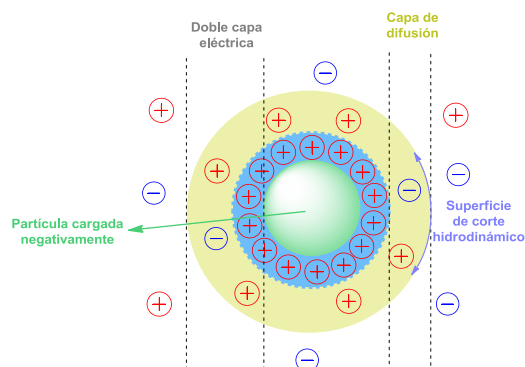


Imagen 1: Imagen de AFM de las micelas PIC formado por PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₆₈.

4.2.5 Medidas de carga superficial: potencial ζ

Al igual que el tamaño y la morfología, el potencial ζ es un parámetro importante en un sistema de transporte de fármacos, ya que es un factor determinante en su estabilidad. El potencial ζ se define como el potencial que existe en una capa delimitante, llamada 'superficie de corte hidrodinámico'. Esta superficie es hipotética y representa el límite entre los iones que se mueven libremente en el

disolvente y los iones que difunden con la partícula, y que por tanto, forman parte su capa dieléctrica. Se muestra en el Esquema 5 una representación de una partícula cargada negativamente donde están indicados la doble capa eléctrica, la capa de difusión y la superficie de corte hidrodinámico.



Esquema 5: Representación de una partícula esférica cargada negativamente donde se muestra la doble capa dieléctrica, la capa de difusión y la superficie de corte hidrodinámico.

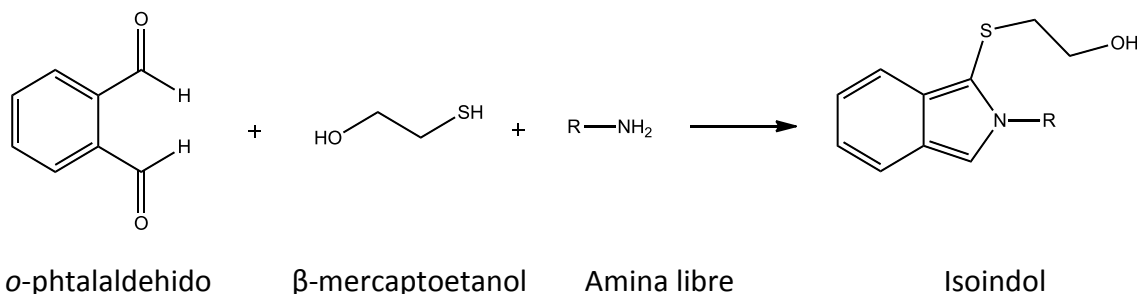
Para el sistema de $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-PhCO}_2^-$ y PLL_{68} se probaron diferentes ratios de carga positiva/negativa, con el propósito de estudiar la formación de partículas con diferente densidad de carga a $\text{pH}=7.4$. Los resultados obtenidos mostraron como la micela formada con una ratio 1:1 presenta unos valores de potencial ζ de -8.00 ± 8.36 mV, es decir, un potencial zeta cercano a cero. También se formaron dos micelas diferentes con una ratio 1.5:1 y 2:1, se observaron en estos casos potenciales zeta ligeramente más positivos pero con una desviación estándar muy alta. La estabilidad de estas micelas se estudió bajo condiciones fisiológicas simuladas (150 mM NaCl y 37°C) y se observó que las micelas formadas con una ratio distinta de 1:1, mostraban síntomas de agregación y de rotura a las pocas horas de permanecer en esas condiciones. Sin embargo, las micelas con ratio 1:1 permanecían estables en estas condiciones durante más de una semana.

Por tanto, las micelas de $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-PhCO}_2^-$ y PLL_{68} de ratio 1:1 fueron las más estables con un potencial zeta próximo a cero. Este hecho resulta muy atractivo en el diseño de sistemas de transporte de fármacos, ya que reduce las interacciones con otras moléculas cargadas, como proteínas, componentes esenciales de un sistema vivo. Dichas interacciones pueden resultar en la desestabilización del sistema de transporte, por ejemplo, originando fenómenos de agregación y/o precipitación. Por este motivo, se escogió la micela PIC formada entre $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-PhCO}_2^-$ y PLL_{68} y ratio de cargas 1:1 para los estudios que se detallan a continuación.

4.2.6 Cuantificación de polilisina libre

Para comprobar la eficacia de formación de la micela PIC entre $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-PhCO}_2^-$ y PLL_{68} , se llevó a cabo una determinación cuantitativa de la polilisina libre que

no se encuentra formando parte de la micela. Para ello, se empleó la técnica de derivatización mediante *o*-ftalaldehido (OPA)⁴⁰, un método ampliamente utilizado para la determinación de aminoácidos. El método consiste en hacer reaccionar aminas primarias, en medio básico pH=9-11, con mercaptanos (R-SH) y OPA, obteniéndose como producto un derivado de isoindol, que puede ser cuantificado por fluorescencia.



Para separar la polilisina libre de aquella que está formando parte de la micela PIC, se realizó una ultracentrifugación. Esta técnica es un tipo de centrifugación donde el rotor se sitúa en una cámara de vacío, siendo capaz de alcanzar altas velocidades debido a la menor fricción. Con este sistema se consiguen fuerzas centrífugas muy grandes, lo cual permite la sedimentación de compuestos de pequeño tamaño, que de otra manera sería muy difícil.

Para cuantificar la polilisina libre se formó la micela entre PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₆₈, y se dejó bajo agitación magnética durante 1 h. Después, se procedió a su ultracentrifugación durante 3 h a 50000 rpm. Por otra parte, se preparó una disolución de polilisina (10 mM PB pH=7.4 y 150 mM NaCl), que se diluyó con ácido bórico (pH=11), para obtener distintas concentraciones de polilisina (disoluciones patrón) y generar una recta de calibrado, que se detalla en Gráfico 1:

⁴⁰ Benson, J.R.; Hare, P.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1975**, 73, 619 -622.

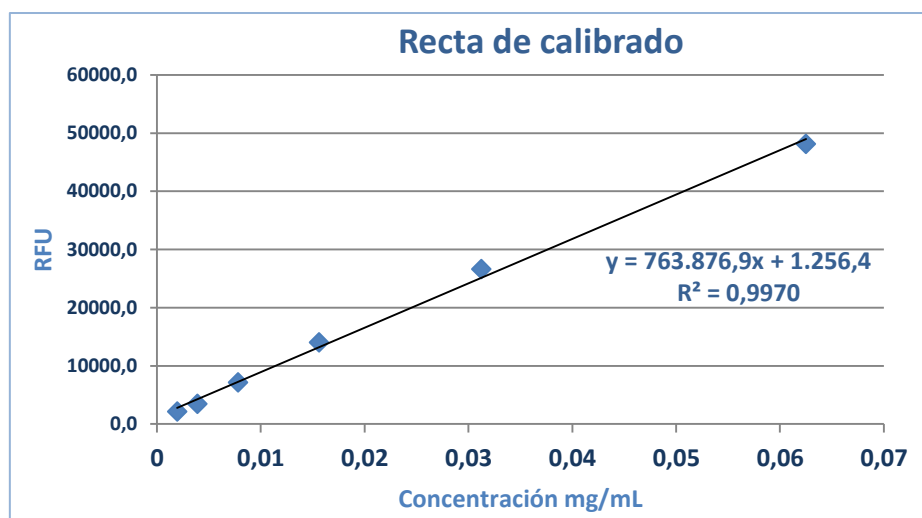


Gráfico 1: Representación de las distintas disoluciones patrón de polilisina, según la derivatización de método OPA.

El análisis y representación de los datos obtenidos para las disoluciones patrón, generó como resultado una recta, es decir, existe una relación lineal entre la concentración de aminas libres y la respuesta fluorescente. Finalmente, se realizó la representación del sobrenadante de la micela PIC, para esto fue necesario la dilución de la muestra del sobrenadante con un tampón de ácido bórico a pH=11, ya que la reacción es dependiente del pH. Por este motivo, se representa en abscisas el factor de dilución en tanto por uno.

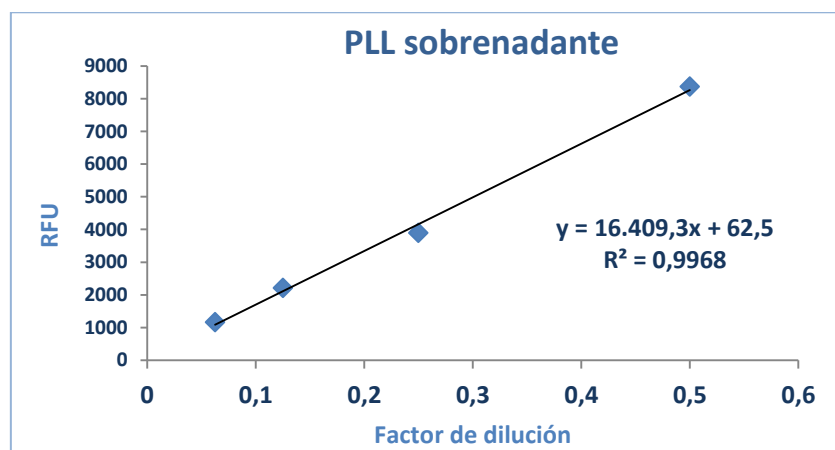


Gráfico 2: Fluorescencia obtenida para el sobrenadante de la micela formada por $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-PhCO}_2^-$ y PLL_{68} cuando se somete a la derivatización por el método OPA.

Extrapolando los resultados obtenidos con la respuesta del sobrenadante y la recta de calibrado, se calculó el porcentaje de polilisina libre. Éste resultó ser del 3% en la micela $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-PhCO}_2^-$ y PLL_{68} , lo cual prueba que la formación de esta micela PIC es altamente eficiente, y la práctica totalidad de la polilisina se encuentra formando parte de la micela.

4.3 Citotoxicidad

Para conocer la toxicidad vinculada a PLL₆₈, los copolímeros de bloque dendríticos (PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PEG₅₀₀₀-[G3]-CO₂⁻) y de la micela formada entre PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₆₈, se realizó un ensayo de MTT. Para este estudio⁴¹, se utilizaron células A549, células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano, que fueron incubadas con los tratamientos durante 24 horas, antes del análisis. En este tipo de estudios se considera que los tratamientos no son tóxicos cuando la viabilidad celular es del 80% o superior.

En primer lugar, se realizó el ensayo MTT para la PLL₆₈. Los resultados, que se muestran en el Gráfico 3, revelan el efecto drástico que posee la polilisina, es decir, a la concentración de 0.04 mg/mL la viabilidad celular es prácticamente nula, mientras que a una concentración de 0.008 mg/mL la viabilidad pasa a ser del 100%. Esto apunta la existencia de una concentración crítica de polilisina por encima de la cual se produce la necrosis celular de forma masiva. Este efecto de muerte celular puede estar relacionado con las cargas positivas que presenta la polilisina, debido a los grupos amino, que pueden interaccionar electrostáticamente con los grupos fosfato de la membrana celular, y a una concentración elevada, producir su desestabilización y rotura.

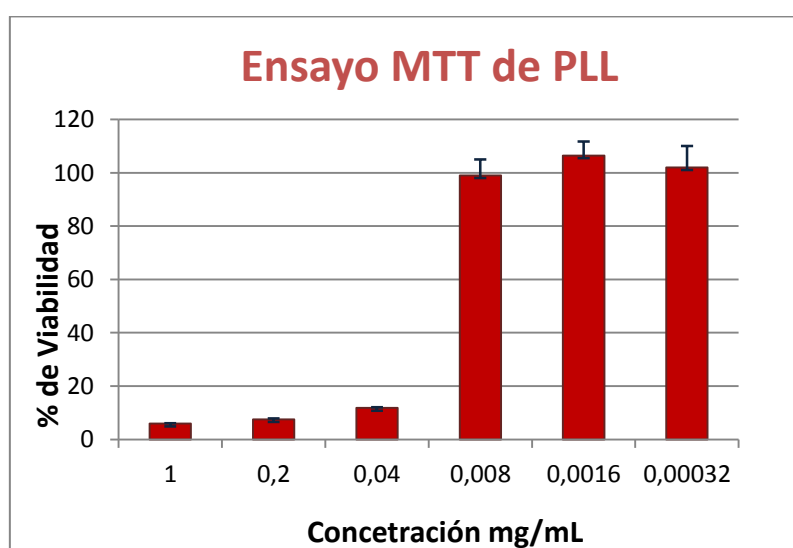


Gráfico 3: Viabilidad de la PLL₆₈ mediante un estudio de MTT con células A549 y tiempos de incubación de 24h. Se observa viabilidad celular a concentraciones inferiores de 0.008 mg/mL de polilisina.

Por otra parte, se realizó el ensayo de MTT de los copolímeros de bloque dendríticos (PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PEG₅₀₀₀-[G3]-CO₂⁻) y de la micela PIC. Se muestran los resultados obtenidos en Gráfico 4, donde existe viabilidad celular, tanto de los copolímeros de bloque como de la micela, a una concentración de 0.125 mg/mL.

⁴¹ Mosmann, T. J., *Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.

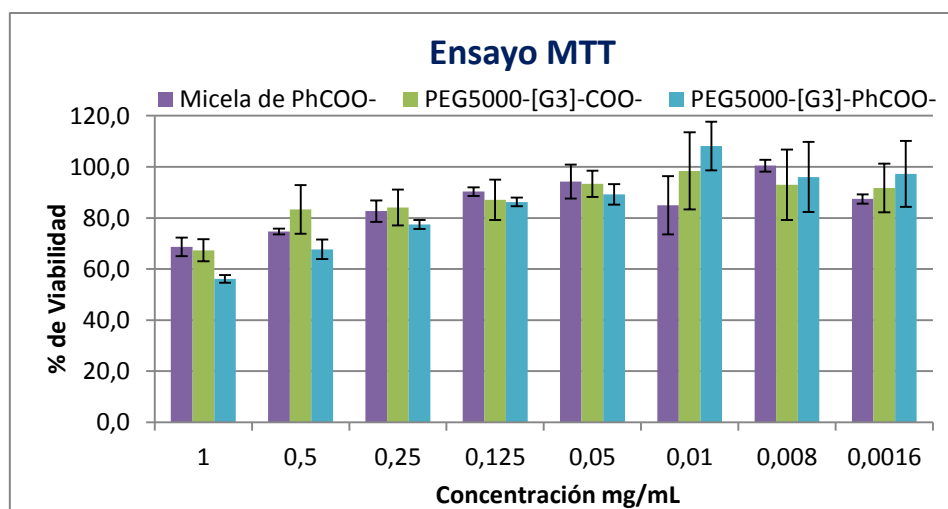


Gráfico 4: Viabilidad de los compuestos dendríticos PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻, PEG₅₀₀₀-[G3]-CO₂⁻ y la micela de PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ con PLL₆₈ mediante un estudio de MTT con células A549 y tiempos de incubación de 24h.

Este es un valor esperado, en concordancia con la biocompatibilidad que otorga la presencia del PEG⁴². En general, los dos copolímeros de bloque dendríticos presentan una citotoxicidad muy parecida en todas las concentraciones ensayadas, lo cual se corresponde con su similitud estructural, ya que solo difieren en la presencia del anillo aromático para el caso de PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻. Por otra parte, la micela formada por PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ también presenta unos valores de citotoxicidad bajos, que se consiguen debido a la estructura micelar, donde las cadenas de polilisina, cargadas positivamente, se encuentran apantalladas en el núcleo con el copolímero dendrítico, mientras que las cadenas de PEG, altamente biocompatibles, se encuentran en la periferia (Figura 16). Este tipo de estructura y el hecho de formar la partícula en un ratio de cargas 1:1, dio como resultado una micela PIC de toxicidad reducida, en términos de sistemas de transporte de fármacos.

4.4 Estudios de internalización

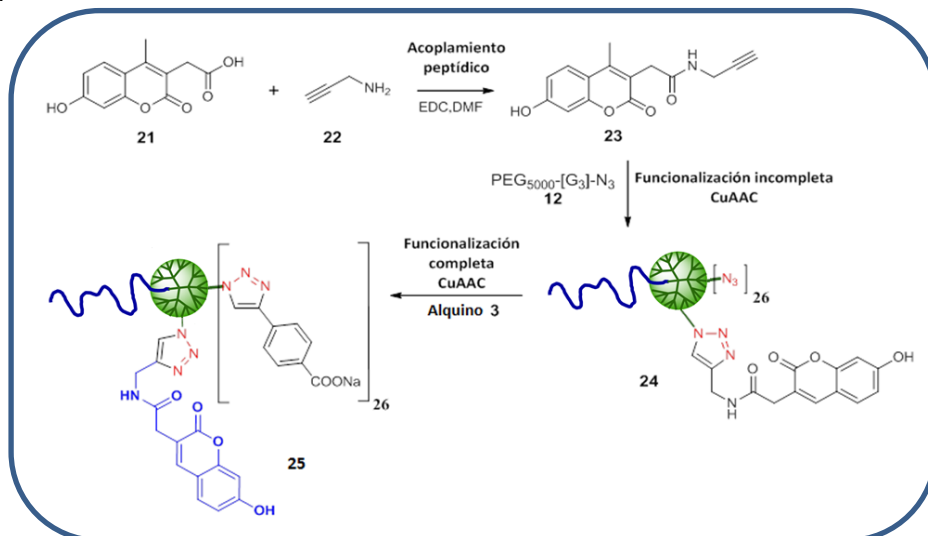
El siguiente paso, una vez comprobada la estabilidad y la baja toxicidad de la micela PIC formada a partir de PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₆₈ en una ratio 1:1 de cargas, fue la visualización del proceso de internalización celular. Para esto fue necesario llevar a cabo el etiquetado fluorescente de los componentes que la forman, es decir, del copolímero de bloque dendrítico y de la polilisina. Para este cometido se escogieron dos etiquetas fluorescentes diferentes: un derivado de cumarina y Alexa Flúor 488®.

4.4.1 Síntesis del copolímero de bloque fluorescente

Para la modificación del copolímero de bloque dendrítico, se empleó el derivado comercial de cumarina **21**. La estrategia llevada a cabo consistió en hacer reaccionar la cumarina con propalgilamina mediante un acoplamiento peptídico, para

⁴² Aprobado por Food and Drug Administration (FDA).

dar lugar el alquino **23**, que se purificó mediante cromatografía en columna con CH_2Cl_2 en gradiente hasta el 20% en MeOH. El alquino **23** se caracterizó por ^1H RMN, observándose la aparición de un doblete a δ 3.95 ppm, correspondiente a los dos protones en α al grupo amida, así como un triplete a δ 2.56 ppm, asignable al protón del alquino.



Esquema 6: Ruta sintética empleada para llevar a cabo el etiquetado del copolímero de bloque dendrítico con un derivado de cumarina.

Una vez obtenido el alquino-cumarina **23**, se realizó una funcionalización incompleta de $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-N}_3$ (**12**) mediante CuAAC, empleando 2 equivalentes de **23** por 27 equivalentes de grupo azida. El grado de funcionalización del copolímero de bloque se determinó por integración de las señales del espectro de ^1H RMN en DMSO, y resultó ser de 1.2 etiquetas fluorescentes por copolímero de bloque dendrítico. Para esta determinación se escogieron las señales en α al anillo de triazol, representadas en el Figura 24 en azul y rojo, que aparecen a δ 4.47 ppm y δ 4.27 ppm respectivamente, así como la señal del metilo de la cumarina, representado en verde, con un desplazamiento químico de 2.27 ppm. También se observaron en el espectro de RMN, las señales aromáticas pertenecientes al anillo bencénico, a δ 7.58, 6.78 y 6.68 ppm.

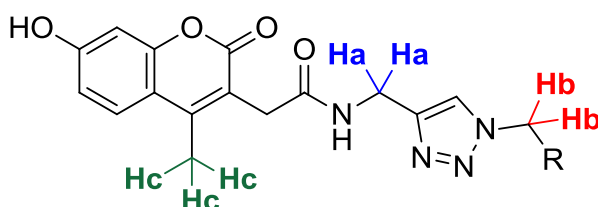


Figura 24: Representación esquemática de los protones empleados para la determinación mediante integración del porcentaje de cumarina incorporada en el $\text{PEG}_{5000}\text{-[G3]-N}_3$, mediante integración de sus señales en el espectro en DMSO de RMN.

Finalmente, se obtuvo el copolímero de bloque con etiqueta fluorescente **25**, realizando una CuAAC para funcionalizar las azidas restantes con ácido 4-etinilbenzoico (**3**). Para la caracterización del producto, se realizó un espectro de IR en el que se observó la total desaparición de la banda a 2100 cm^{-1} , correspondiente a la banda azida. Además, se realizaron tanto un espectro UV, donde se observó la aparición de una banda a 324 nm, perteneciente a la absorción de la cumarina, además de la banda a 280 nm, correspondiente a los anillos aromáticos del copolímero de bloque; y un espectro de fluorescencia donde se vio una banda de emisión a 450 nm, cuando se excitaba la muestra con una longitud de onda de 360 nm.

Por último, se midió la fluorescencia del copolímero dendrítico etiquetado **25**, de la micela PIC (formada entre el copolímero dendrítico **25** y PLL₆₈) y de la micela PIC mantenida a pH=5 durante 1h. Las medidas de fluorescencia se realizaron excitando la muestra con una longitud de onda de 355 nm y se recogieron a una longitud de onda de 460 nm. Todas las muestras medidas contenían una concentración de etiqueta fluorescente de 8.83 μM . Los resultados obtenidos se muestran en el Gráfico 5:

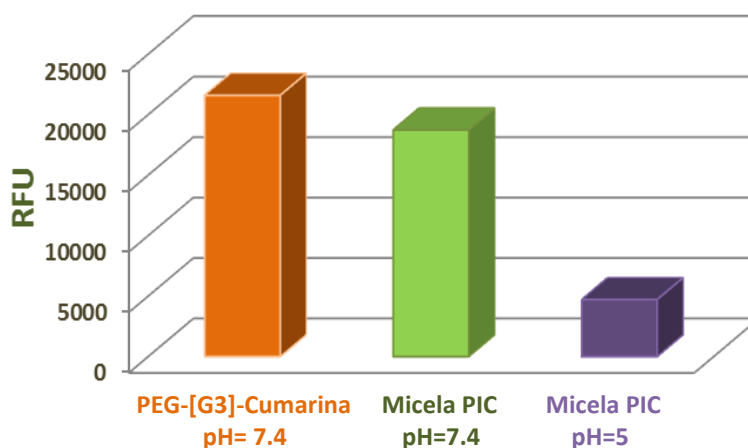


Gráfico 5: Medidas de fluorescencia de copolímero de bloque **25**, de la micela PIC formada entre el copolímero de bloque **25** y PLL₆₈ a pH=7.4, y de una micela PIC formada entre el copolímero de bloque **24** y PLL₆₈ a pH=5.

Los resultados muestran como la fluorescencia perteneciente al copolímero de bloque libre en disolución es ligeramente superior a cuando éste se encuentra formando parte de la micela PIC. Esta diferencia se incrementa significativamente cuando la micela PIC se desestabiliza, ya que el valor de la fluorescencia observada fue tan sólo el 25% del valor obtenido para la micela PIC. Esto significa que estamos ante un fenómeno conocido como “*quenching*” o desactivación fluorescente, término que engloba aquellos procesos que conllevan una pérdida de la intensidad de fluorescencia. Este fenómeno sucede cuando los fluoróforos se encuentran próximos en el espacio a otras moléculas, ya que se producen interacciones que favorecen mecanismos de liberación de energía no fluorescente. Esto explica que la fluorescencia de la micela PIC sea menor que la del copolímero libre, ya que una vez formada la micela, todos los

fluoróforos se encuentran formando parte del núcleo, y se hallarán en un entorno más compacto. Esta situación se agrava cuando la micela se mantiene a pH=5, ya que esto provoca la protonación de los carboxilatos del copolímero de bloque **25**, que origina una especie más hidrofóbica y favorece la formación de agregados.

4.4.2 Síntesis de PLL₆₈ fluorescente

Para el etiquetado de la polilisina empleada en la formación de la micela PIC se utilizó el compuesto comercial **26**, un derivado de Alexa 488 funcionalizado como éster activo. El procedimiento empleado consistió en disolver la polilisina **25** en 0.1 M NaHCO₃ a pH=8.5, para conseguir la desprotonación de los grupos amina, y añadirle dos equivalentes del éster activo **26**, disuelto en DMSO seco. Esto dio lugar a una reacción de adición-eliminación que originó la polilisina con etiqueta fluorescente **27**. A este compuesto se le realizó un espectro de UV, donde se observó la aparición de la banda de absorción a 494 nm, indicativo de que se había incorporado etiqueta fluorescente.

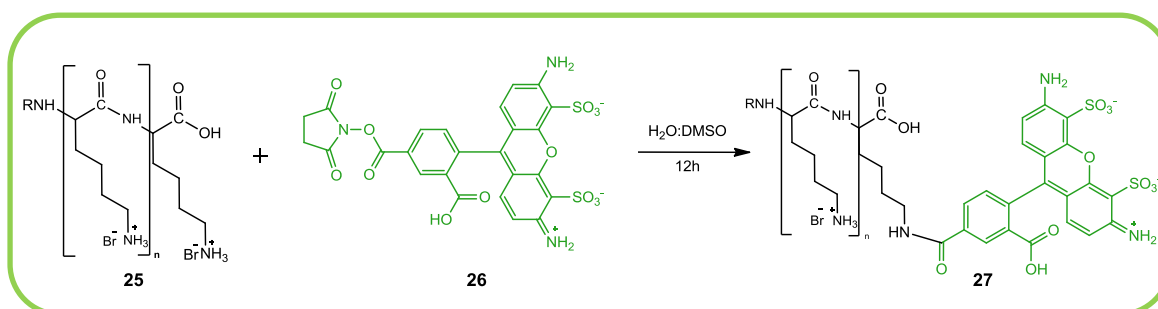


Figura 25: Reacción entre PLL₆₈ y un derivado de Alexa 488 funcionalizado como éster activo.

Para la determinación del grado de funcionalización de la polilisina **27**, se aplicó la Ley de Lambert Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de extinción ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), l es la longitud de la cubeta (cm) y c es al concentración (M).

Teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción de la Alexa 488 comercial es de $73000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, que la cubeta empleada fue de 1 cm y la absorbancia obtenida en el espectro, se pudo calcular la concentración de Alexa 488. La división de esta concentración con respecto a la concentración de polilisina empleada, dio como resultado un grado de funcionalización de 0.6, es decir, existen 0.6 moléculas de Alexa por cada cadena de polilisina.

Una vez se obtuvieron el copolímero dendrítico **25** y la polilisina **27**, ambos con etiquetas fluorescentes, fue posible realizar estudios de FRET y de internalización de micelas PIC en células.

4.4.3 Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

FRET es un fenómeno que describe un mecanismo de transferencia de energía entre dos fluoróforos. Tienen que darse dos condiciones para que este fenómeno ocurra. Por una parte, el espectro de absorción de uno de los fluoróforos (aceptor) ha de superponerse con el espectro de emisión del otro fluoróforo (donante). Además, ambos fluoróforos deben encontrarse próximos en el espacio, a una distancia menor de 5 nm, para que pueda ocurrir la transferencia de energía. La eficiencia del mecanismo de transferencia de energía decae exponencialmente con respecto a la distancia entre los fluoróforos, razón por la cual el FRET se ha convertido en una herramienta habitual en el estudio de la proximidad espacial entre diferentes especies.

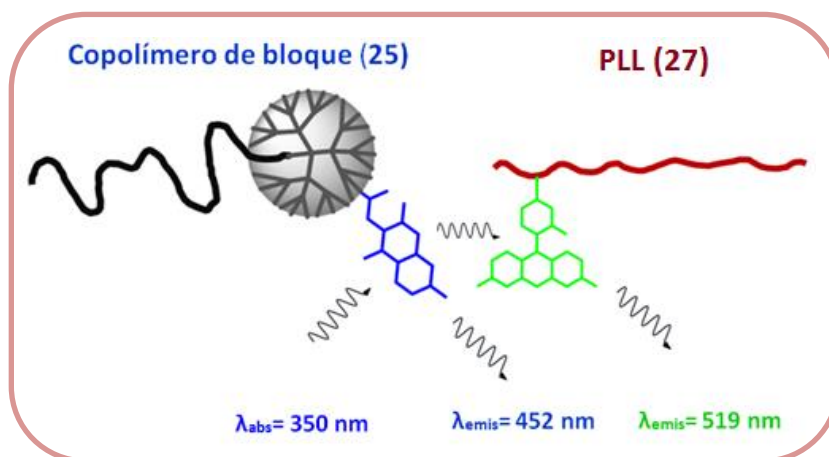


Figura 26: Representación esquemática del fenómeno de FRET para los fluoróforos de cumarina y Alexa. Se muestra como excitando la micela a 350 nm se obtiene un espectro de emisión con dos bandas, a 452 nm perteneciente a la cumarina, y a 519 nm perteneciente a la Alexa mediada por FRET.

Las etiquetas fluorescentes con las que se etiquetaron el copolímero de bloque dendrítico y la polilisina, tienen un espectro de emisión y absorción que se solapan, es decir, cuando se excita la cumarina con una longitud de onda de 350 nm, ésta emite fluorescencia a 452 nm, que coincide parcialmente con la longitud de onda de excitación de la Alexa, y que por tanto puede excitarse y emitir a 519 nm (Figura 26). Como se ha dicho anteriormente, para que este fenómeno pueda ocurrir es necesario que ambos fluoróforos estén cerca en el espacio, por tanto, el hecho de obtener FRET sería indicativo de la existencia de la micela PIC.

Para estudiar esto, se prepararon tres micelas PIC, una micela PIC con el dendrímero etiquetado **25** (micela 1), otra micela con la polilisina etiquetada **27** (micela 2) y una micela etiquetada con el dendrímero **25** y la polilisina **27** (micela 3). Se

realizaron espectros de fluorescencia a las tres micelas: la micela 1 se excitó con $\lambda=350$ nm y se obtuvo una banda de emisión con un máximo de 452 nm. Por otra parte, la micela 2 se excitó con una $\lambda=495$ nm y se obtuvo un espectro con un máximo de 519 nm. Por último, se realizó el espectro de fluorescencia de la micela 3, excitando a $\lambda=350$ nm y recogiendo un espectro de emisión que muestra dos bandas, una perteneciente a la cumarina (452 nm) y otra causada por el efecto FRET a 519 nm, perteneciente a la Alexa. Estos resultados se muestran en el Gráfico 6.

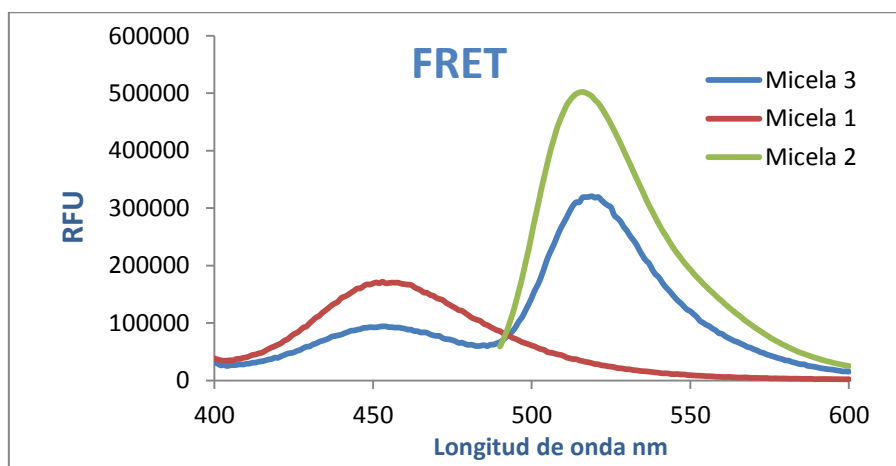


Gráfico 6: Espectro de fluorescencia realizados a tres micelas diferentes.

4.4.4 Internalización celular

El proceso de internalización celular se estudió con células A549, durante distintos tiempos de incubación y de observación. Se realizaron estudios de internalización de la polilisina **27**, del copolímero de bloque **25** y de la micela PIC formada con el copolímero etiquetado **25**.

Para la polilisina **27** se realizó una incubación de 30 minutos a una concentración de 0.008 mg/mL (0.6 μ M), por ser ésta la concentración más alta de polilisina con viabilidad celular según el ensayo MTT, Gráfico 3. Transcurridos 30 min, se lavaron las células con PBS pH=7.4, para eliminar la polilisina no unida, y se visualizaron las células inmediatamente ($t=0$), y tras 3h y 9h de evolución. Las imágenes tomadas se muestran en la Figura 27, donde aparecen en la parte superior las imágenes de fluorescencia superpuestas y, en la parte inferior, las imágenes de microscopía de campo claro.

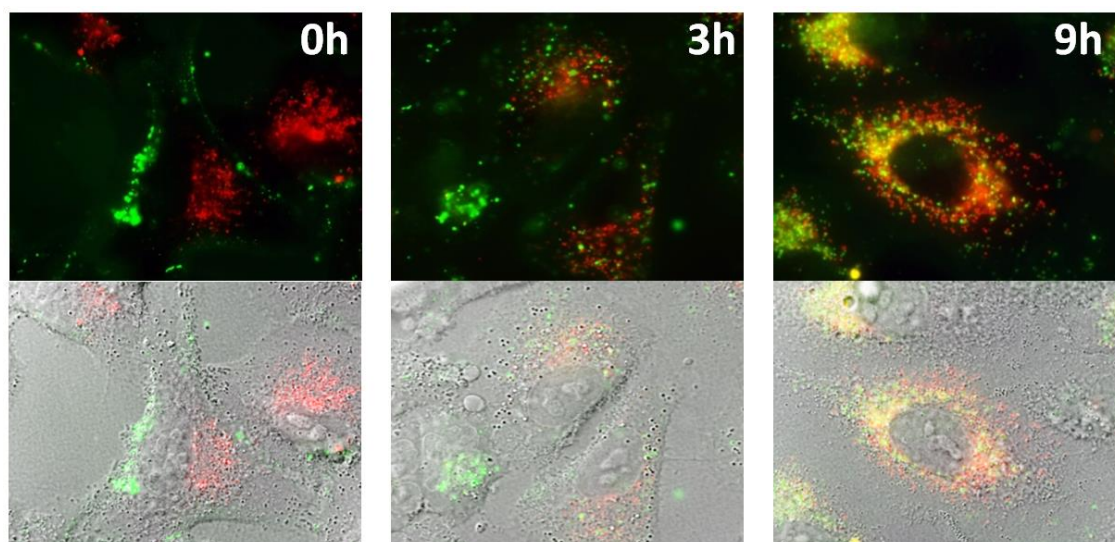


Figura 27: Imágenes de microscopio de fluorescencia tras la incubación de 30 min con $0.6 \mu\text{M}$ de polilisin (**25**) en células A549.

En las imágenes tomadas se observa como la polilisin (color verde) tras 30 min de incubación se encuentra adherida a la membrana plasmática, mientras que los endosomas tardíos y lisosomas (teñidos de rojo con Lysotracker Red[®]) se encuentran en el citoplasma. Además, empieza a visualizarse la formación de vesículas, síntoma del inicio de proceso de endocitosis. Transcurridas 3h, puede observarse como las vesículas se encuentran ya en el citoplasma, aunque no existe colocación con Lysotracker Red[®], es decir, las vesículas, tras ser internalizadas, se han convertido en endosomas tempranos. Tras 9 h, la presencia de color amarillo en la imagen demuestra colocación verde-rojo (Alexa 488[®] de polilisin y Lysotracker Red[®]), indicativa de la evolución de las vesículas a endosomas tardíos/lisosomas. Este es el recorrido habitual en el proceso de endocitosis: unión del compuesto a la membrana plasmática, formación de endosomas tempranos, y posteriormente tardíos.

El siguiente proceso en la ruta endocítica es la fusión con lisosoma, que conlleva la degradación enzimática del contenido endosomal y la liberación de éste al citoplasma. En el contexto del transporte de fármacos, se pretende evitar este proceso natural mediante: 1) la hidrólisis enzimática o ácida de enlaces lábiles, que permita la liberación de moléculas de bajo peso molecular capaces de escapar al citoplasma, mediante procesos de difusión; 2) el empleo de poliaminas que gracias al efecto “proton sponge” permitan tamponar, desestabilizar y liberar el contenido de endosomas tardíos. Para el caso de la polilisin **27**, no se observó el escape del contenido al citoplasma, incluso después de 24 h de observación, en concordancia con su baja capacidad para tamponar el compartimento endosomal⁴³.

⁴³ Mintzer, M. A.; Simanek, E. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 259-302.

Por último, se realizaron estudios de internalización, tanto del copolímero de bloque **25**, como de la micela PIC formada entre el copolímero de bloque **25** y PLL₆₈. En ninguno de los dos casos, se observó internalización, incluso después de 24h de incubación. Esto no resulta sorprendente debido a la naturaleza de ambas especies, por una parte el copolímero de bloque presenta carga negativa, lo cual desfavorece la adhesión a la membrana plasmática. Por otra parte, la micela PIC tiene una cobertura de PEG, cuya biocompatibilidad está relacionada precisamente con su capacidad de no ser detectada, lo que limita su interacción con la membrana plasmática, obstaculizando el proceso de internalización no selectiva. Para confirmar la nula internalización de la micela PIC formada entre el copolímero de bloque **25** y PLL₆₈ se probaron tres líneas celulares diferentes: HEK 293 (células embrionarias de riñón), MCF7 (adenocarcinoma de mama humano) y Hela (células de cáncer cérvico-uterino), y en ninguno de los casos se encontraron signos de internalización después de 24h de incubación.

Este hecho abre la puerta al estudio de este tipo de sistemas para el transporte selectivo de fármacos, aquel en el que gracias a la presencia de determinados ligandos en la superficie de los transportadores, se consigue dirigir selectivamente un fármaco a una población celular diana. Este tipo de internalización conocido como Endocitosis mediada por Receptor, es uno de los más apropiados para el transporte de fármacos, ya que posibilita la selectividad de afectar sólo a aquellas células que posean el receptor del ligando elegido para el sistema de transporte.

Con la intención de confirmar la utilidad de este tipo de micelas en transporte activo de fármacos mediante Endocitosis Mediada por Receptor, se procedió a preparar una micela análoga a la formada entre PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCOO⁻ (**13**) y PLL₆₈, que incorporase un ligando peptídico en su superficie. Se escogió para este cometido un péptido cíclico de secuencia RGD, que es reconocida por un tipo de proteínas de membrana, conocidas como integrinas. Por tanto, se formó una micela PIC entre PLL₆₈ y una mezcla de copolímeros de bloque dendríticos, un 95% en volumen fue del copolímero etiquetado **25** y el 5% restante el copolímero funcionalizado con el péptido RGD en el extremo del PEG (**28**)⁴⁴, cuya estructura se observa en Figura 28:

⁴⁴ Este compuesto fue sintetizado previamente por nuestro grupo de investigación.

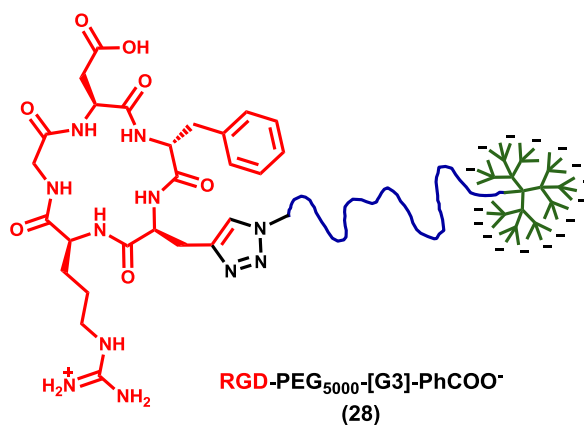


Figura 28: Representación del copolímero de bloque dendrítico análogo a PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCOO⁻ (13) que incorpora un ciclo péptido RGD en el extremo de la cadena de PEG.

La incubación de esta micela con células A549 durante 24h, mostró internalización, debido a los péptidos RGD, que son reconocidos por las integrinas presentes en A549 y promueven el proceso de endocitosis. Por tanto, puede observarse fluorescencia azul (derivado de la cumarina) en vesículas, que se muestra en Figura 29:

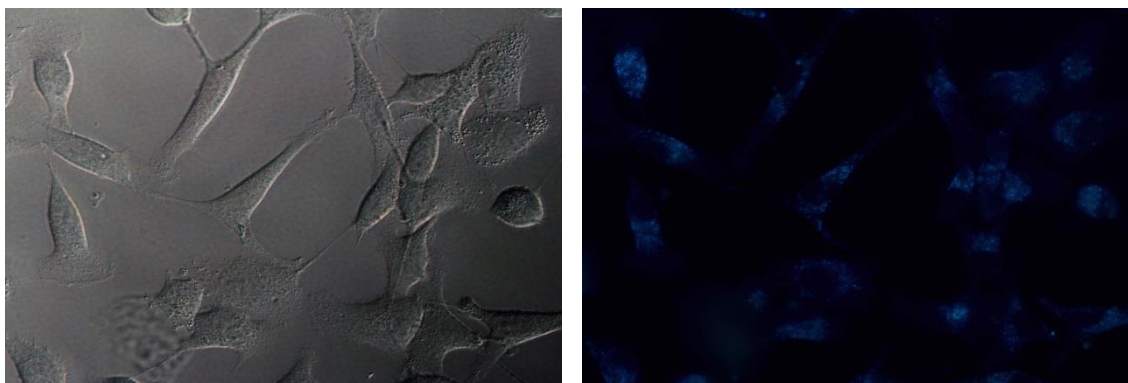


Figura 29: Imágenes de Fluorescencia de la micela PIC formada con RGD-PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCOO⁻ (28), el copolímero etiqueta 25 y PLL₆₈.

Finalmente, no se ha observado la salida del endosoma para este sistema, y por ello, en este momento, nos encontramos sintetizando un poliaminoácido que contenga varias aminas con diferentes pKa, para promover el escape endosomal mediante efecto tampón.

5 CONCLUSIONES

- ❖ Se ha conseguido la síntesis de tres generaciones de copolímeros de bloque dendríticos usando como unidad de repetición GATG y como punto focal MeO-PEG₅₀₀₀, además de su posterior funcionalización mediante CuAAC con ácido 4-etinilbenzoico (**3**), ácido 4-pentinoico (**19**), el sulfato **5** y 4-etinilfenil sulfonato (**16**).
- ❖ Se ha encontrado dos métodos para incrementar la estabilidad de micelas PIC: introducción de un anillo aromático en el grupo funcional y aumento de la longitud de la cadena de polilisina.
- ❖ Se ha cuantificado la citotoxicidad mediante un ensayo de MTT de los copolímeros de bloque dendríticos PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PEG₅₀₀₀-[G3]-CO₂⁻, así como de la micelas PIC formada entre el primero y PLL₆₈, resultando unos valores de toxicidad mínimos.
- ❖ Se han etiquetado fluorescentemente la PLL₆₈ con Alexa Flúor 488 y el copolímero de bloque dendrítico PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ con un derivado de cumarina, lo que ha permitido comprobar la existencia de micela PIC mediante FRET.
- ❖ Se ha comprobado que micelas PIC con una corona constituida únicamente por PEG (formadas entre PEG₅₀₀₀-[G3]-PhCO₂⁻ y PLL₆₈) presentan una internalización no específica nula con 4 líneas celulares diferentes.
- ❖ Se logró la internalización mediante la introducción de un ciclopéptido en el extremo de la cadena de PEG, que promovió la Endocitosis mediada por Receptor, debido al reconocimiento del ciclopéptido por receptores proteicos presentes en la membrana plasmática de células A549.

