

## Trabajo Fin de Grado

**DENDRÍMEROS FUNCIONALIZADOS CON GRUPOS  
AMINO QUE FORMAN NANOAGREGADOS PARA LA  
TRANSFECCIÓN GÉNICA.**

***AMINO-FUNCTIONALIZED DENDRIMERS THAT FORM  
NANOAGGREGATES FOR GENE DELIVERY***

Autor

**Marcos PEÑALVER MEDINA**

Grado en Biotecnología

Directores:

**José Luis SERRANO OSTÁRIZ**  
**Teresa SIERRA TRAVIESO**

Departamento de Química Orgánica  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Zaragoza

Instituto de Nanociencia de Aragón (INA)  
Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA)

*Zaragoza, junio de 2017*

## SIGLAS Y ABREVIATURAS:

(Ordenadas alfabéticamente)

**AcOEt:** Acetato de etilo.

**ARNasa:** enzima ribonucleasa.

**bisGMPA:** ácido 2,2'-bis(gliciloximetil)propiónico

**bisMPA:** ácido 2,2'-bis(hidroximetil)propiónico

**cryoTEM:** microscopía electrónica de transmisión en modo criogénico.

**DCC:** N,N'-diciclohexilcarbodiimida.

**DCM:** diclorometano.

**DCU:** N,N'-diciclohexilurea.

**DMF:** N,N'-dimetilformamida.

**DPTS:** 4-toluensulfonato de 4-(dimetilamino)piridinio.

**Et<sub>2</sub>OEt<sub>2</sub>O:** dietil éter.

**EtOH:** etanol

**FBS:** suero fetal bovino

**FTIR-ATR:** Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier, usando reflectancia total atenuada.

**GFP:** proteína fluorescente verde.

**GlyBoc(OH):** N-(tert-butoxicarbonil)glicina.

**HeLa:** células derivadas de adenocarcinoma de cérvix humano

**HEPES:** ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico.

**L-Asc:** ácido L-ascórbico.

**MeOH:** metanol.

**mMSC:** células mesenquimales de médula ósea de ratón

**pADN:** ADN plasmídico.

**pEGFP:** pEGFP-N1 4733pb. Plásmido que expresa de manera constitutiva GFP en células de mamífero.

**RMN:** resonancia magnética nuclear.

**SFM:** medio de cultivo libre de suero.

**siARN:** ARN pequeño de interferencia

**siGFP:** siARN para el gen de la GFP.

**siLuc:** siARN para el gen de la luciferasa.

**TAE:** disolución tampón de Tris, acetato y ácido etilendiamidotetraacético (EDTA)

**t-Boc:** *tert*-butiloxicarbonilo

**TBTA:** Tris(benciltriazolilmetil)amina.

# ÍNDICE

---

|  |    |
|--|----|
| <b>1. RESUMEN</b>  | 1  |
| <b>2. INTRODUCCIÓN</b>   | 2  |
| 2.1 TERAPIA GÉNICA   | 2  |
| 2.2 DENDRÍMEROS Y SU APLICACIÓN EN TERAPIA GÉNICA  | 2  |
| 2.3 ANTECEDENTES   | 4  |
| <b>3. OBJETIVO</b>   | 5  |
| <b>4. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO</b>  | 5  |
| 4.1 SÍNTESIS DEL DERIVADO DENDRÍTICO   | 5  |
| 4.2 FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE ÁCIDO NUCLEICO Y EL DERIVADO DENDRÍTICO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MISMOS  | 6  |
| 4.2.1 BIOCMPATIBILIDAD   | 6  |
| 4.3 EXPERIMENTOS DE TRANSFECCIÓN   | 6  |
| <b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | 6  |
| 5.1 MATERIALES   | 6  |
| 5.2 CARACTERIZACIÓN  | 7  |
| 5.3 SÍNTESIS   | 7  |
| 5.3.1 PROCEDIMIENTO PARA LA SÍNTESIS DEL MONÓMERO: ácido 2,2'-bis(gliciloximetil)propiónico ( <i>bis</i> GMPA)   | 8  |
| a) Síntesis de 2,2'-bis(gliciloximetil)propionato de bencilo   | 8  |
| b) Síntesis del ácido 2,2'-bis(gliciloximetil)propiónico ( <i>bis</i> GMPA)  | 9  |
| 5.3.2 PROCEDIMIENTO PARA LA SÍNTESIS DEL DENDRÓN DE TERCERA GENERACIÓN DE <i>bis</i> GMPA  | 9  |
| a) Síntesis del 6-azidohexan-1-ol  | 9  |
| b) Síntesis del N <sub>3</sub> -[ <i>bis</i> MPA-G1]-(OH) <sub>2</sub>   | 9  |
| c) Síntesis del N <sub>3</sub> -[ <i>bis</i> GMPA-G1]-(NHBoc) <sub>2</sub>   | 10 |
| 5.3.3 PROCEDIMIENTO PARA LA SÍNTESIS DEL POLÍMERO HIPERRAMIFICADO FUNCIONALIZADO DE CUARTA GENERACIÓN CON DENDRONES DE TERCERA GENERACIÓN EN SU PERIFERIA. | 11 |
| a) Síntesis del derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-( <i>bis</i> GMPA,G3)-(NHBoc) <sub>8</sub>   | 11 |
| b) Síntesis del derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-( <i>bis</i> GMPA,G3)-(NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Cl) <sub>8</sub>                                   | 11 |
| 5.4 PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD DEL DERIVADO DENDRÍTICO   | 12 |
| a) Líneas celulares  | 12 |
| b) Citotoxicidad   | 12 |

|  |           |
|--|-----------|
| c) Cambios en el ciclo celular (S/G2/G1)   | 12        |
| d) Formación de complejos con ácido nucleico y ensayos de retardo en gel                 | 12        |
| e) Transfección con pEGFP y siGFP vehiculizados  | 13        |
| f) Ensayos de digestión  | 13        |
| g) Dispersión dinámica de la luz (DLS)   | 13        |
| h) Microscopía electrónica de transmisión en modo criogénico (cryoTEM)                   | 14        |
| i) Determinación del potencial $\zeta$   | 14        |
| <b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   | <b>14</b> |
| <b>6.1 SÍNTESIS</b>  | <b>14</b> |
| 6.1.1 Síntesis del monómero de <i>bis</i> GMPA   | 14        |
| 6.1.2 Síntesis del dendrón de tercera generación de <i>bis</i> GMPA                      | 14        |
| 6.1.3 Síntesis del polímero hiperramificado funcionalizado con dendrones en la periferia | 15        |
| <b>6.2 CARACTERIZACIÓN</b>   | <b>15</b> |
| <b>6.3 BIOCMPATIBILIDAD</b>  | <b>17</b> |
| 6.3.1 CITOTOXICIDAD  | 17        |
| 6.3.2 ALTERACIONES EN EL CICLO CELULAR   | 18        |
| <b>6.4 FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS CON ÁCIDOS NUCLEICOS</b>                 | <b>18</b> |
| 6.4.1 ENSAYO DE RETARDO EN GEL DE AGAROSA  | 18        |
| 6.4.2 POTENCIAL $\zeta$  | 19        |
| 6.4.3 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS) Y cryoTEM                                      | 19        |
| 6.4.4 ENSAYO DE DIGESTÓN   | 20        |
| <b>6.5 ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN</b>   | <b>21</b> |
| 6.5.1 Transfección con pADN  | 21        |
| 6.5.2 Transfección con siARN   | 22        |
| <b>7. CONCLUSIONES</b>   | <b>23</b> |
| <b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>24</b> |

# 1. RESUMEN

---

**La terapia génica** se presenta como una aproximación muy interesante para el tratamiento de distintos tipos de enfermedades desde su base genética. Para poder aplicarla es necesario que el material genético que sirve como tratamiento atraviese diferentes membranas del organismo y alcance el interior de las células diana. Para vehiculizarlo hasta su destino y evitar que se degrade se han propuesto **dos tipos de sistemas capaces de transportar ácidos nucleicos**. Los más investigados son los basados en partículas virales, no obstante, los recientes avances en nanotecnología han propiciado la aparición de nuevos materiales con un futuro prometedor en aplicaciones biomédicas. Entre ellos encontramos los polímeros hiperramificados y dendrímeros basados en poliésteres y poliamidoaminas, con cargas positivas en su periferia, que les permiten establecer interacciones con los ácidos nucleicos y las membranas celulares.

**En este trabajo** se llevó a cabo la síntesis de un polímero hiperramificado funcionalizado en su periferia con dendrones de tipo poli(éster amida) basado en el ácido 2,2'-bis(gliciloximetil)propiónico (*bis*GMPA). La presencia de grupos amino en su superficie, 472, hacían interesante su estudio como vector de transfección. Se analizó su toxicidad en células mesenquimales de médula ósea de ratón (mMSCs) y HeLa y mostró un **alto grado de biocompatibilidad**. También se estudió su **capacidad para formar complejos** con ADN plasmídico y ARN pequeño de interferencia y se caracterizaron para comprobar su diámetro promedio y su carga superficial. Por último se probó su eficacia de transfección en mMSCs y mMSCS-GFP, tanto para pEGFP y siGFP respectivamente, y se comparó con un agente comercial, la lipectamina 2000®. Para el caso del pADN el polímero hiperramificado dendronizado no fue capaz de llevar a cabo la transfección. Para el caso del siARN se logró cierto grado de transfección, si bien no resultó ser tan efectivo como el agente comercial.

## ABSTRACT

---

**Gene therapy** is presented as an interesting approach for the treatment of different diseases from their genetic basis. For its application it is necessary that the genetic material used as a treatment overcomes the different membranes of the organism and reaches the inside of the target cells. **Two types of systems capable of carrying nucleic acids** have been proposed to deliver them to their destination without degradation. Those based on viral particles are the most investigated ones, however, recent advances in nanotechnology have led to the emergence of new materials with a promising future in biomedical applications. Hyperbranched polymers and dendrimers based on polyesters and polyamidoamines are some examples. If they present positive charges at their periphery, they can set interactions with nucleic acids and cell membranes.

**In this work** it is described the synthesis of a new hyperbranched polymer functionalized with poly(ester amide) type dendrons based on 2,2'-bis(glycyloxymethyl)propionic acid (*bis*GMPA). The presence of 472 amino groups on its surface made it interesting as a possible transfection vector. Therefore, its toxicity was analyzed in mouse bone marrow mesenchymal cells (mMSCs) and HeLa and it showed **high biocompatibility**. The **capacity to form complexes** with plasmid DNA and small interference RNA was also studied and then characterized with the average diameter and surface charge of the complexes. Finally, their transfection efficiency was tested in mMSCs and mMSC-GFP for pEGFP and siGFP, respectively, and compared with a commercial agent, lipectamine 2000. For the pDNA the dendronized hyperbranched polymer was not able to perform the transfection. For the siRNA some levels of transfection were reached, but it was not as much effective as the commercial agent.

## 2. INTRODUCCIÓN

---

**La Nanomedicina** se define como el desarrollo y aplicación de nanomateriales en medicina<sup>1</sup>. Abarca varios campos de aplicación, desde el diagnóstico a la terapia. En este último aspecto, el empleo de nanomateriales en terapia génica constituye una intensa área de investigación.

### 2.1 TERAPIA GÉNICA

La Sociedad Americana para la Terapia Celular y Génica define **terapia génica** como “*el conjunto de estrategias que modifican la expresión de genes de un individuo, o corrige los que se expresan de manera análoga*”.<sup>2</sup> Cada una de estas estrategias implica la administración de un ADN o ARN específicos.

La potencial aplicación de esta técnica en medicina es muy variada y atractiva, ya que permite tratar **distintos tipos de enfermedades** desde su base genética: enfermedades cardiovasculares, neurológicas o infecciosas, así como cáncer. El material genético exógeno puede actuar **modificando la síntesis de proteínas** en las células diana, alterando la expresión de genes específicos o induciendo la producción de proteínas citotóxicas capaces de matar, por ejemplo, células cancerosas. En cualquier caso el gen que se va a transfectar tiene que llegar hasta la célula diana, internalizarse y expresarse, lo que supone uno de los principales retos para la aplicación de esta terapia. El material genético puede introducirse desnudo o **usando vectores** que lo protejan del medio fisiológico y del sistema inmune<sup>3</sup>. Actualmente hay **dos estrategias** para vehicular los ácidos nucleicos exógenos y facilitar su internalización en las células eucariotas: se trata de los vectores virales y los sistemas no virales.

**Los vectores virales** están basados en distintos genomas virales a los que se les han eliminado algunos fragmentos para hacerlos seguros. Se usan porque presentan una **alta eficacia de transfección y especificidad** por determinados tipos celulares, lo que facilita la terapia dirigida a tejidos concretos<sup>4</sup>. No obstante, también son capaces de estimular al sistema inmune, lo que podría derivar en una **respuesta inflamatoria** y muerte celular en el tejido diana, además, en ocasiones también pueden inducir procesos carcinogénicos. Desde el punto de vista técnico, tienen el problema de que solo pueden cargar un **tamaño limitado de material genético**.

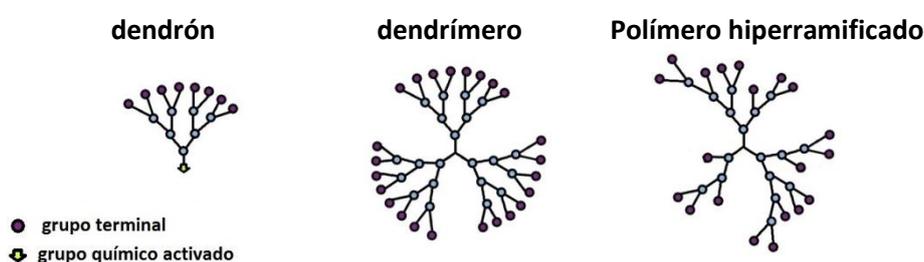
**Los sistemas no virales** pueden ser físicos, como por ejemplo la electroporación o la magnetofección, o químicos, como los liposomas o los polímeros catiónicos. Entre sus ventajas cuentan con que generan una **menor respuesta del sistema inmune y no presentan limitaciones en el tamaño** del material genético que pueden transfectar<sup>4</sup>. Pese a esto, son pocos los agentes no virales que llegan a estudiarse en ensayos clínicos<sup>5</sup>. Esto se debe a que **normalmente su eficacia para transfectar es menor** que en el caso de los vectores virales. Esto podría cambiar gracias al rendimiento de los nuevos vectores poliméricos y lipídicos, así como al desarrollo de **nuevos materiales nanoscópicos**<sup>6</sup>.

### 2.2 DENDRÍMEROS Y SU APLICACIÓN EN TERAPIA GÉNICA

Los **dendrimeros** son moléculas de estructura radialmente simétrica y muy definida. Constan de un núcleo del que parten estructuras que se ramifican de manera controlada: es decir, son hiperramificados y casi monodispersos. Según el número de veces que se ramifica la estructura, se obtienen diferentes generaciones de dendrimeros. Las subunidades ramificadas que se unen al núcleo es lo que se conoce como **dendrones**, y constituyen la estructura interna del dendrimeros, que determina características como su forma, tamaño o flexibilidad. Cuanto mayor sea la generación del dendrimeros, mayor será su diámetro y tenderá a adquirir una mayor forma esférica<sup>7</sup>. La periferia del dendrimeros

constituye la cubierta externa y está formada por los **grupos terminales de los dendrones**. El número de estos grupos es muy alto (mayor cuanto mayor sea la generación) y se pueden funcionalizar, conjugándolos con otros grupos o moléculas para dotar al dendrímero de nuevas características físico-químicas y/o biológicas (**Figura 1**).

Las propiedades que hacen tan interesantes a los dendrímeros son, por lo tanto, su **estructura muy definida** (monodispersidad) y su **elevado número de grupos terminales**, que se pueden funcionalizar. No obstante, a diferencia de **los polímeros lineales**, los dendrímeros se preparan por síntesis en varios pasos en lugar de uno solo. Existe una opción intermedia entre polímeros lineales y dendrímeros que son **los polímeros hiperramificados**<sup>8</sup> (**Figura 1**). Estas macromoléculas combinan las ventajas sintéticas de los polímeros (síntesis en una sola etapa, aunque mayor polidispersidad) y las posibilidades de multifuncionalización de los dendrímeros. Recientemente se han descrito derivados de éstos, los **polímeros hiperramificados dendronizados** en los que el polímero hiperramificado está funcionalizado con dendrones en su periferia<sup>9</sup>.



**Figura 1.** Ejemplo de la estructura de un dendrón, un dendrímero y un polímero hiperramificado de tercera generación.

En terapia génica resultan muy interesantes los **dendrímeros catiónicos**, funcionalizados con grupos con carga positiva en su periferia. Estos son capaces de **formar complejos con los ácidos nucleicos**, cargados negativamente, y pueden actuar como transportadores. Además, el elevado número de grupos terminales ofrece la posibilidad de **multifuncionalizar los dendrímeros** y usarlos para dirigir varios tipos de moléculas a las células diana, por ejemplo un ácido nucleico y un fármaco<sup>10</sup>.

Para poder llevar a cabo su acción, el complejo debe ser captado por la célula mediante **endocitosis**. En este proceso también es importante la presencia de los grupos terminales cargados positivamente del dendrímero. Estos pueden interactuar con moléculas negativas de la membrana celular que actúan como receptores e inducen la endocitosis mediada por clatrina.<sup>11</sup>

Una vez internalizados, los complejos quedan confinados en un orgánulo vesicular, el endosoma, donde de normal serían degradados, junto con el ácido nucleico que contienen. La acción de este orgánulo depende de un descenso en el pH mediado por bombas de protones de su membrana. Si el dendrímero cuenta en su estructura con grupos capaces de protonarse podrá amortiguar la acidez del endosoma, favorecer la ruptura del mismo y liberarse en el interior de la célula. Este fenómeno es lo que se conoce como **efecto esponja de protones**<sup>12</sup>.

**Para una buena eficacia de transfección** también es importante que las partículas que constituyen los complejos no sean demasiado grandes, o tendrán dificultades para ser endocitadas (preferiblemente menos de 60 nm de diámetro)<sup>13</sup>. Además, en general, dendrímeros de generaciones altas suelen tener más capacidad para formar los complejos ya que tienen más grupos terminales con cargas positivas capaces de establecer interacciones<sup>14</sup>. No obstante, demasiados de estos grupos pueden dar lugar a una unión demasiado fuerte y que el ácido nucleico no se libere del complejo en el interior de la célula. Además, esos grupos cargados también son capaces de desestabilizar las membranas y dar lugar a problemas de citotoxicidad. Por lo tanto, hay que encontrar el número adecuado de ellos.

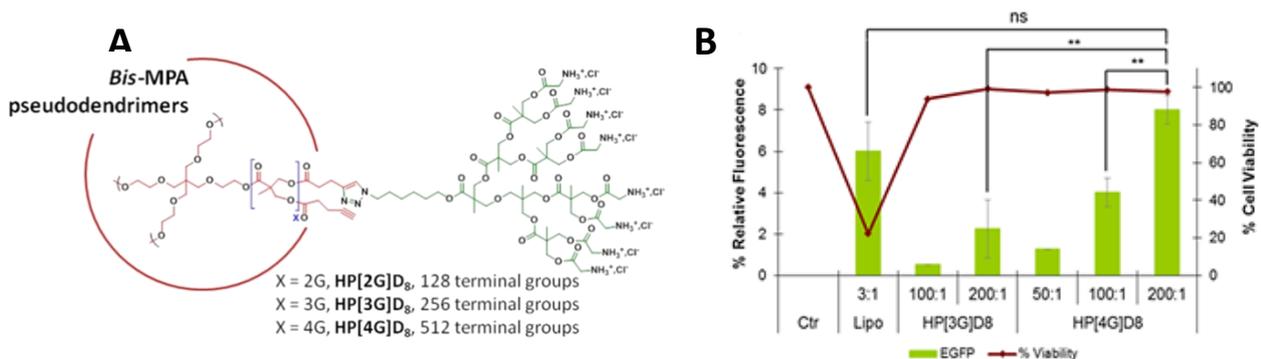
En última instancia es importante estudiar la **biodegradación de los dendrímeros**<sup>15 16</sup>. Esto es importante porque facilita la liberación del ácido nucleico y además permite que los transportadores no se bioacumulen en los tejidos y resulten tóxicos. También hay una serie de **dificultades *in vivo*** que los dendrímeros para transfección génica tienen que superar: estabilidad en el torrente sanguíneo y capacidad para extravasarse hasta los tejidos diana.

De entre los dendrímeros utilizados en aplicaciones biomédicas<sup>14</sup>, el Grupo de Cristales Líquidos y Polímeros de la Universidad de Zaragoza se ha centrado principalmente en los **derivados del ácido 2,2'-bis(hidroxi metil)propiónico (*bis*MPA)**. Se trata de unos dendrímeros de tipo poliéster que presentan buenas características de biocompatibilidad y biodegradabilidad<sup>17</sup>.

### 2.3 ANTECEDENTES

En trabajos previos del grupo se ha demostrado la prometedora aplicación como vector para transfección génica de un **derivado dendrítico constituido por un núcleo polimérico de tipo poliéster hiperramificado, de cuarta generación, funcionalizado con dendrones de tercera generación (figura 2A)**. Toda su estructura se basa en el *bis*MPA. En su periferia aparecen grupos glicina unidos a través de enlaces éster, que proporcionan grupos amino terminales<sup>18 19</sup>.

En la **figura 2B** se representan los resultados obtenidos de los experimentos de transfección en células mesenquimales de medula ósea de ratón, mMSC, con complejos de este polímero hiperramificado dendronizado y el plásmido pEGFP, que codifica para la expresión de la proteína fluorescente verde. Se puede observar que los niveles de fluorescencia que se alcanzan al usar como vector de transfección este derivado dendrítico no tienen diferencias significativas con los obtenidos al usar el agente comercial lipofectamina 2000®. Además, hay que resaltar que la viabilidad celular apenas cambia con respecto al control al usar esta estructura dendrítica como vector, mientras que disminuye considerablemente en el caso de la lipofectamina. El grado de transfección, comparable con el de un agente comercial y la alta biocompatibilidad de este vector son características muy prometedoras para un potencial uso en terapia génica<sup>20</sup>.

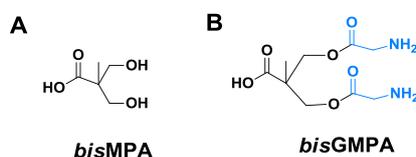


**Figura 2. Estructura y eficacia de transfección de varias generaciones de polímeros hiperramificados funcionalizados con dendrones, basados en *bis*MPA.** Adaptada de<sup>20</sup>. (A)

Estructura de los derivados dendríticos. (B) porcentaje de fluorescencia relativa y de viabilidad celular a las 48 horas de células mMSCs tras la transfección con pEGFP formando complejos con los derivados dendríticos a diferentes ratios en peso (dendr/pEGFP). La lipofectamina 2000® se usa como control positivo de referencia.

En trabajos previos del grupo también se desarrolló un nuevo tipo de estructuras dendríticas basadas en un monómero no descrito hasta la fecha: el **ácido 2,2'-bis(gliciloximetil)propiónico o *bis*GMPA**. Tiene una estructura similar al ácido *bis*MPA pero incorpora glicinas (**Figura 3**). De esta forma los

dendrones tienen glicinas incorporadas en el interior de su estructura y se obtienen derivados dendríticos de tipo poli(éster amida). En ellos se combina la biocompatibilidad y biodegradabilidad de los dendrímeros poliéster con la eficacia de los dendrímeros poli(amidoamina), si bien la investigación poli(éster amidas) se ha centrado principalmente en polímeros lineales.<sup>21</sup>



**Figura 3.** (A) Ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)proiónico, *bis*MPA y (B) ácido 2,2'-*bis*(gliciloximetil)propiónico, *bis*GMPA. En azul las glicinas que se incorporan en a la estructura.

### 3. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es la **síntesis de un nuevo polímero hiperramificado dendronizado**, funcionalizado con **dendrones catiónicos de tipo poli(éster amida)**, y el estudio de su potencial como **transportador de material genético**. Se le denominó HP[4G]*bis*GMPA(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)<sub>8</sub>.

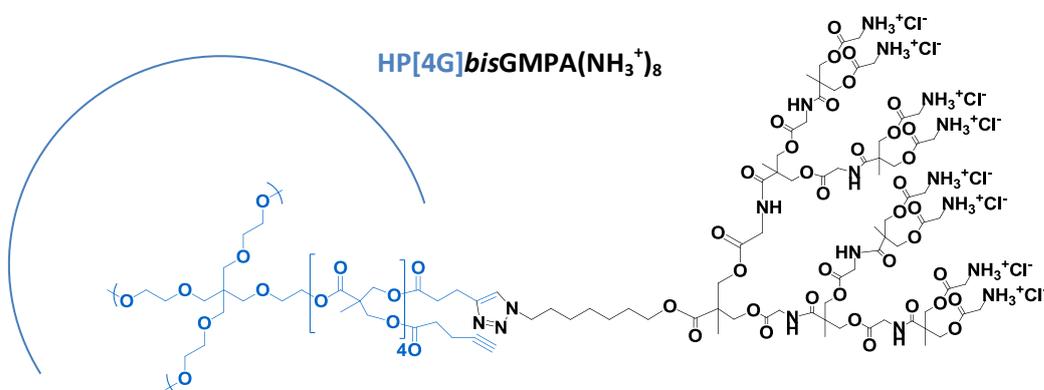
### 4. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Para alcanzar este objetivo se plantearon los siguientes **objetivos particulares**:

#### 4.1 SÍNTESIS DEL DERIVADO DENDRÍTICO

De acuerdo a los resultados obtenidos por el grupo sobre polímeros hiperramificados dendronizados como vehículos para material genético, y sobre estructuras dendríticas derivadas de *bis*GMPA, se planteó la síntesis de un nuevo derivado dendrítico consistente en un polímero de tipo poliéster hiperramificado de cuarta generación funcionalizado en su periferia con dendrones poli(éster amida) de *bis*GMPA de tercera generación (cada uno con 8 grupos amino terminales) (**Figura 4**).

Este diseño permitió incorporar a la estructura del polímero transportador **grupos amida** que dan la posibilidad de que se establezcan más enlaces de hidrógeno para que interaccione con ADN o ARN o con otras nanopartículas y una mayor presencia de grupos protonables para escapar del endosoma.



**Figura 4.** Estructura del polímero hiperramificado de cuarta generación (azul) funcionalizado con dendrones de *bis*GMPA de tercera generación en su periferia.

**Para la caracterización** de los intermedios se usó la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN), tanto de  $^1\text{H}$  como de  $^{13}\text{C}$ , así como espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Los compuestos finales también se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

## 4.2 FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE ÁCIDO NUCLEICO Y EL DERIVADO DENDRÍTICO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MISMOS.

Para el estudio de la capacidad del derivado dendrítico para formar complejos con ADN y ARN se plantearon los siguientes estudios:

- **Ensayos de retardo en gel de agarosa** para comprobar que la formación de complejos .
- **Estudio de la morfología de los complejos** mediante dispersión dinámica de la luz (DLS), microscopía electrónica de transmisión en modo criogénico (cryoTEM) y su carga iónica, mediante valoración del potencial  $\zeta$ .
- Estudio preliminar para comprobar si, al estar formando parte de un complejo con el derivado dendrítico, el ADN estaba **protegido de la digestión por enzimas de restricción**.

**En el caso del ADN** se seleccionó el plásmido pEGFP, que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP), el mismo con el que se realizó la transfección. Se optó por este plásmido porque facilita el estudio de la eficacia de transfección, que se pudo valorar analizando el incremento de la intensidad fluorescencia de las células transfectadas. **En el caso del ARN** se decidió trabajar con ARN pequeño de interferencia (siARN). Para la transfección se eligió siGFP, que inhibe la expresión del gen de la proteína fluorescente verde. Para el estudio de los complejos se usó un siARN modelo, siLuc, con características físico-químicas comparables a las de siGFP.

### 4.2.1 BIOCMPATIBILIDAD

En el estudio de nuevos materiales para aplicaciones biomédicas hay demostrar es la **ausencia de citotoxicidad**. Para ello se plantearon ensayos de citotoxicidad y análisis de la capacidad del derivado dendrítico de alterar el ciclo celular. Para estos estudios se seleccionaron células derivadas de adenocarcinoma de cérvix humano (**HeLa**) y células mesenquimales de médula ósea de ratón (**mMSCs**). Las células HeLa se corresponden una línea celular modelo muy caracterizada en la bibliografía de células cancerígenas. Las mMSCs tiene una gran aplicabilidad en terapia génica por ser células de médula ósea<sup>22</sup>.

## 4.3 EXPERIMENTOS DE TRANSFECCIÓN

Para los ensayos de transfección de pEGFP se seleccionaron **mMSCs**. Para los del siARN se eligió una línea de mMSCs que expresa de forma constitutiva el gen de la GFP (**mMSC-GFP**) lo que permite un fácil seguimiento de la eficacia de transfección valorada como el descenso de la intensidad de fluorescencia. Como control positivo de transfección se seleccionó un agente comercial: la lipofectamina 2000®.

# 5. MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 5.1 MATERIALES

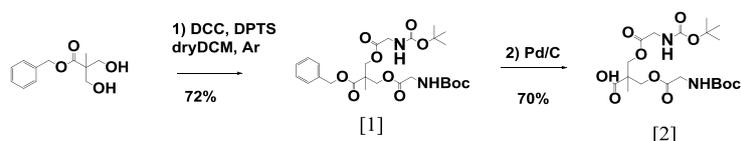
Salvo que se indique lo contrario, todos los reactivos utilizados para la síntesis del derivado dendrítico se compraron a Sigma-Aldrich o a Acros Organics y se han usado sin purificación posterior. El polímero hiperramificado derivado del *bis*MPA de cuarta generación (G4), con un peso molecular

promedio de  $7325 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  y una media de 64 grupos terminales se compró a Sigma-Aldrich. Los disolventes empleados se compraron a Scharlab, SL; destilando el diclorometano antes de usarlo en las reacciones. El ADN plasmídico (pADN) que codifica la capacidad de expresión de la proteína fluorescente verde (pEGFP-N1, 47733pb) se compró a BD Biosciences Clontech (**ver anexo I**). El siARN (ARN pequeño de interferencia) con actividad anti luciferasa, siLuc (anti Luciferase siARN I), procede de Thermo Scientific Dharmacon. ELI siGFP (GFP Duplex I) procede de Thermo Scientific Dharmacon (**para las secuencias ver anexo II**)

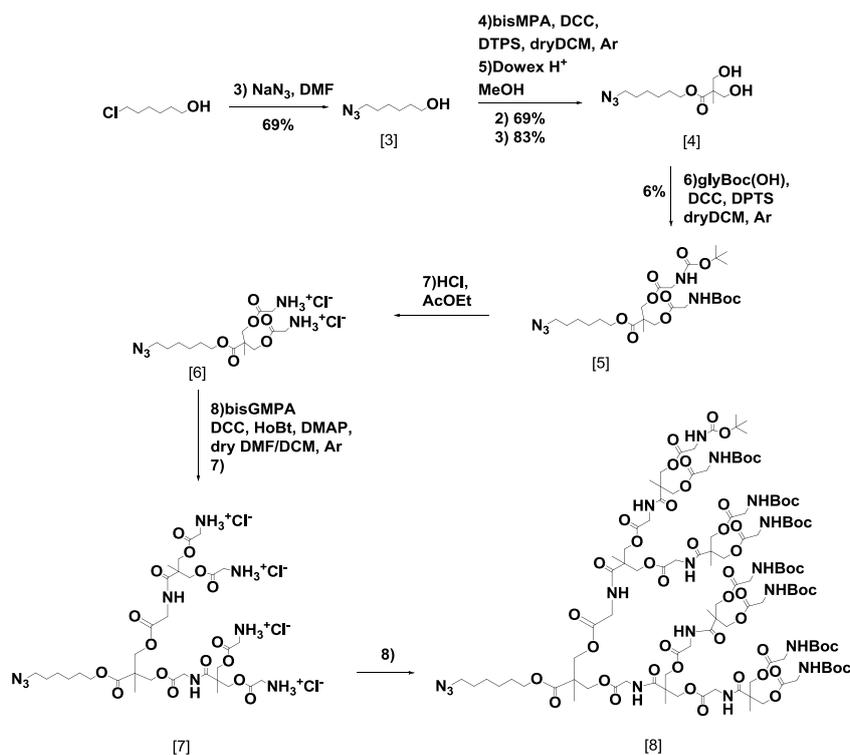
## 5.2 CARACTERIZACIÓN

Se realizaron experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , en un espectrómetro Bruker AV-400 ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz) usando cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) como disolventes. Los desplazamientos químicos se dan como ppm referentes al tetrametilsilano (TMS) y las constantes de acoplamiento en Hz. EL pico de disolvente se empleó como estándar interno. Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un equipo FTIR ATI-Mattson Genesis Series II y se midieron entre  $4000$  y  $00\text{cm}^{-1}$ . Las medidas se realizaron en el modo de reflectancia total atenuada (ATR). Se realizó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en un sistema Waters e2695 Alliance usando dos series de columnas Styragel HR4 y HR1 ( $500$  y  $10^4 \text{ \AA}$  de tamaño de poro) y un detector evaporativo de dispersión de luz. La concentración de muestra fue de  $1.00 \text{ mg/mL}$  y en THF (de grado apto para HPLC (*high-performance liquid chromatography*) con un flujo de  $1.00 \text{ mL/min}$  a  $35^\circ\text{C}$ . Se usó PMMA (poli(metil metacrilato)) como estándar de calibrado.

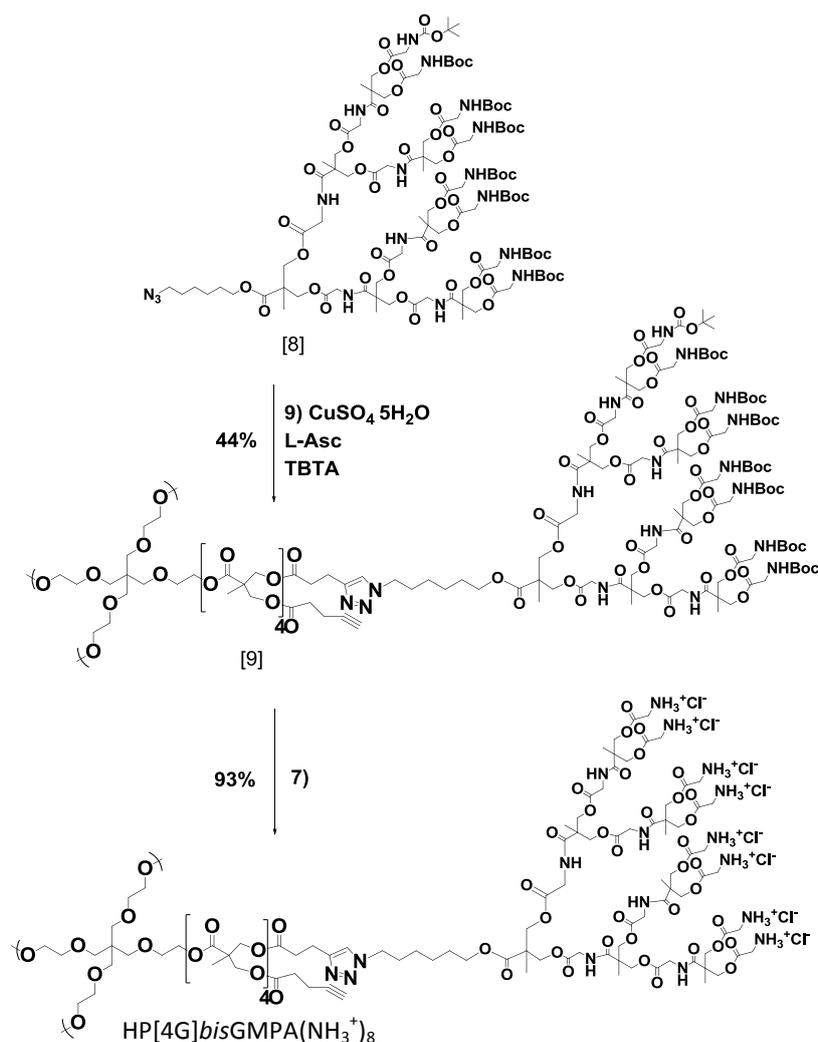
## 5.3 SÍNTESIS



Esquema 1. Síntesis del monómero de *bisGMPA*



Esquema 2. Síntesis del dendrón de *bisGMPA* de tercera generación



Esquema 3. Síntesis del derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl)<sub>8</sub>

### 5.3.1 PROCEDIMIENTO PARA LA SÍNTESIS DEL MONÓMERO: ácido 2,2'-bis(gliciloximetil)propiónico (bisGMPA) (ver esquema 1).

#### a) Síntesis de 2,2'-bis(gliciloximetil)propionato de bencilo [1]

Se disolvió [1], previamente sintetizado por el grupo a partir de bisMPA comercial (5.0 g, 22.97 mmol) en DCM seco (120mL). Posteriormente se GlyBoc(OH) (9.77 g, 55.7 mmol) y DPTS (5.25 g, 17.8 mmol). Para llevar a cabo la reacción se generó atmósfera de argón y se enfrió a 0°C. Se disolvió DCC (11.5 g, 55.7 mmol, 2.5 equivalentes) en DCM seco (15 mL) y se añadió a la mezcla gota a gota. La reacción se mantuvo durante 24h a temperatura ambiente. El precipitado blanco de DCU se eliminó por filtración y se evaporó el disolvente en atmósfera reducida. Se añadieron 150 mL de hexano y se filtró el sólido que no se disolvía y que correspondía a restos de DCU. Al evaporar el disolvente en atmósfera reducida se obtuvo un producto que se purificó por cromatografía a presión en gel de sílice, usando como eluyente una mezcla de hexano y acetato de etilo 7:3. Se obtuvo un producto oleoso correspondiente a BnOOC-[bisMPA,1G]-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> puro con un rendimiento del 72 % (8.9 g).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 1.25 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.43 (s, 18H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.78 (t, J=4Hz, 4H, -CH<sub>2</sub>-NH-), 4.30 (ABq, J=12,4Hz, Δ<sub>vAB</sub>=23,02 Hz, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O-), 5.03 (bs, -NH), 5.17 (s, 2H, Bn-CH<sub>2</sub>-O-), 7.36 (m, 5H, Bn). **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 18 (-CH<sub>3</sub>), 28.4 (-O-C-CH<sub>3</sub>), 42.3 (-CCH<sub>3</sub>-), 46.43 (-C-NH-), 65.9 (-C-CH<sub>2</sub>O-), 67.09 (Bn-CH<sub>2</sub>-O-), 80.13 (O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),

128.74 y 128.4 (Bn), 135.56 (BnC-C-O), 155.81 (N-C=O), 170.4 (-O-C=O), 172.28 (Bn-CH<sub>2</sub>-O-C=O). **FTIR** ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ , nujol) 3377 (N-H), 2969-2921 (C-H, incluidos los aromáticos), 1754 (C=O, del éster alifático), 1722 (C=O, éster aromático), 1687 (C=O, carbamato), 1512 (N-H  $\delta$ ), 1453 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>  $\delta$ ), 1367 (C-N), 1252 (CO-O), 1150 (N-CO-O), 1131 (O-C-C).

#### b) Síntesis del ácido 2,2'-bis(gliciloximetil)propiónico (*bis*GMPA) [2]

Se disolvió [2] (8.0 g, 14.85 mmol) en AcOEt (80 mL) bajo atmósfera de argón. Se añadió Pd/C (0.4 g) a la mezcla de reacción con cuidado, ya que es inflamable. Se realizaron tres ciclos de argón-vacío para retirar el aire. A continuación se hicieron tres ciclos de H<sub>2</sub>-vacío. La mezcla se mantuvo bajo atmósfera de H<sub>2</sub> (usando un globo lleno de H<sub>2</sub>) durante toda la noche. La mezcla obtenida se filtró a través de un lecho de celite® que se lavó varias veces con AcOEt. Finalmente se evaporó el disolvente bajo atmósfera reducida para conseguir *bis*GMPA con un rendimiento del 70 % (4.64 g).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ (ppm) 1.24 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.42 (s, 18H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.85 (d, J = 4 Hz, 4H, -CH<sub>2</sub>-NH-), 4.32 (ABq, J = 11.4 Hz,  $\Delta\nu_{AB}$  = 23.4 Hz, 4H, -C-CH<sub>2</sub>O-), 5.27 (bs, -NH). **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ (ppm): 17.7 (-CH<sub>3</sub>), 28.4 (-O-C-CH<sub>3</sub>), 42.3 (-CCH<sub>3</sub>-), 45.81 (-CCH<sub>3</sub>-), 65.9 (-C-CH<sub>2</sub>O-), 80.16 (O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.9 (N-C=O), 170.2 (-O-C=O), 176.3 (-COOH). **FTIR** ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ , nujol): 3376 (N-H), 2979-2935 (C-H), 1748 (C=O, éster), 1696 (C=O, carbamato), 1519 (N-H  $\delta$ ), 1458 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>  $\delta$ ), 1368 (C-N), 1250 (CO-O), 1154 (N-CO-O), 1136 (O-C-C).

### 5.3.2 PROCEDIMIENTO PARA LA SÍNTESIS DEL DENDRÓN DE TERCERA GENERACIÓN DE *bis*GMPA (ver esquema 2)

Para la preparación del producto final planteado se utilizó el dendrón [8] del que ya se disponía porque había sido previamente sintetizado en el grupo. Sin embargo, durante este trabajo se preparó el precursor [5] que permite acceder a distintas generaciones de dendrones derivados de *bis*GMPA, de interés para los trabajos realizados en el grupo de investigación.

#### a) Síntesis del 6-azidohexan-1-ol [3]

Se disolvió 6-clorohexan-1-ol (9.8 mL, 73.2 mmol) en DMF (30 mL) y se añadió NaN<sub>3</sub> (14.3 g, 219.6 mmol). La mezcla se mantuvo con agitación a 110°C durante 24h. Transcurrido este tiempo se añadió agua (120 mL) y se extrajo el producto con Et<sub>2</sub>O (3 x 80mL). Las fases orgánicas se reunieron, se lavaron dos veces con una solución saturada de cloruro sódico (2 x 100mL) y se secaron con MgSO<sub>4</sub> anhidro. Tras la filtración se evaporó el disolvente bajo presión reducida. Por último, el producto se purificó por cromatografía en columna a presión en gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de hexano y acetato de etilo en proporción 7:3. Se obtuvo 6-azidohexan-1-ol puro con un rendimiento del 69% (7.23g).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ (ppm) 1.40 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.6 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.27 (t, J=8Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.65 (t, J=8Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-OH). **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ (ppm) 25.4, 26.6 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 28.9, 32.7 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 51.5 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 62.9 (CH<sub>2</sub>-OH). **FTIR** ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ , nujol): 3340 (O-H), 2924-2872 (C-H), 2086 (N<sub>3</sub>), 1452 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>  $\delta$ )

#### b) Síntesis del N<sub>3</sub>-[*bis*MPA-G1]-(OH)<sub>2</sub> [4]

**b.1 Síntesis de N<sub>3</sub>-[*bis*MPA-G1]-(acetal)<sub>1</sub>:** Se disolvieron [3] (6.00 g, 41.9 mmol), *bis*MPA (7.3g, 41.9 mmol) y DPTS (4.93 g, 16.76 mmol) en DCM seco (100 mL). La mezcla se mantuvo agitando bajo atmósfera de argón y se enfrió a 0°C. Se añadió DCC (17.3 g, 83.8 mmol), disuelto en DCM seco (25 mL), gota a gota. Se mantuvo agitando a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, durante

24h. Se observó la aparición de un precipitado blanco de N,N'-d ciclohexilurea (DCU) que se eliminó por filtración a vacío. Tras eliminar el disolvente por evaporación en atmósfera reducida, el crudo obtenido se disolvió en hexano (150 mL) y se volvió filtrar para eliminar restos de DCU que quedaban. El producto se purificó mediante cromatografía en columna a presión en gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla de hexano y acetato de etilo en proporción 9:1. Se obtuvo N<sub>3</sub>-[bisMPA-G1]-(acetal)<sub>1</sub> puro, un producto oleoso, con un rendimiento del 69 % (8.66 g).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) 1.18 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.38 (s, 3H, -O-C-CH<sub>3</sub>), 1.4 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.43 (s, 3H, -O-C-CH<sub>3</sub>), 3.26 (t, J=8Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.64 (d, J=12Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-O), 4.13 (t, J=8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O), 4.17 (d, J =12HZ, 2H, -C'H<sub>2</sub>-O). **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) 18.65 (-CH<sub>3</sub>), 22.65 (-OCCH<sub>3</sub>), 24.57 (-OCC'H<sub>3</sub>), 25.41 (-CH<sub>2</sub>- CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 26.29 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 28.42 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 28.7 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 41.79 (CH<sub>3</sub>-C-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-), 51.29 (N<sub>3</sub>-C), 64.62 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 66.01 (C-CH<sub>2</sub>-O), 97.99 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 174.23 (C=O). **FTIR** (v<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>, nujol): 2947-2857 (C-H), 2098 (N<sub>3</sub>), 1731 (C=O), 1451 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> δ), 1251 (CO-O), 1158 (O-C-C).

**b.1 Síntesis de del N<sub>3</sub>-[bisMPA-G1]-(OH)<sub>1</sub>:** En primer lugar se preparó la resina comercial Dowex H<sup>+</sup> (3.00 g) lavándola con MeOH, con agitación durante 30 minutos y posterior filtración. Se diluyó N<sub>3</sub>-[bisMPA-G1]-(acetal)<sub>1</sub> (8.66 g) en MeOH (60 mL) y se añadió la Dowex H<sup>+</sup> lavada. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente con agitación durante 5 horas. La mezcla se filtró y el disolvente se evaporó bajo atmósfera reducida. Se obtuvo un producto oleoso: N<sub>3</sub>-[bisMPA-G1]-(OH)<sub>2</sub> puro con un rendimiento del 83 % (4.30 g).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) 1.05 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.40 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.64 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2.54 (bs, 2H, -OH), 3.26 (t, J=8Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.68 (dd, J=12Hz y J=8Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 3.68 (dd, J=12Hz y J=8Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.16 (t, J=6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O). **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) 16.9 (-CH<sub>3</sub>), 25.25 (-CH<sub>2</sub>- CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 26.25 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 28.32 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 28.63 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 49 (CH<sub>3</sub>-C-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-), 51.1 ((N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-), 64.8 (-CH<sub>2</sub>-O-), 67.85 (C-CH<sub>2</sub>OH), 175.9 (C=O). **FTIR** (v<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>, nujol) : 3374 (O-H), 2918-2858 (C-H), 2096 (N<sub>3</sub>); 1730 (C=O), 1457 (CH<sub>2</sub>,CH<sub>3</sub> δ), 1239 (CO-O), 1142 (O-C-C).

### c) Síntesis del N<sub>3</sub>-[bisGMPA-G1]-(NHBoc)<sub>2</sub>[5]

Se disolvieron [4] (3.50 g, 11.69 mmol), GlyBoc(OH) (5.12 g, 29.22 mmol) y DPTS (2.75 g, 9.35 mmol) en DCM seco (50 + 40 mL) a 0°C bajo atmósfera de argón.

Se añadió DCC (6.024 g, 29.22 mmol) disuelta en DCM seco (10 mL), gota a gota. La mezcla se mantuvo en agitación durante 24h a temperatura ambiente, bajo atmósfera de argón. El precipitado blanco (DCU) se eliminó por filtración y el filtrado se evaporó a sequedad. Para eliminar los restos de DCU se añadieron 10 mL de hexano y se filtró el sólido que no se disolvía. La disolución de hexano se evaporó a sequedad y el crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna a presión en gel de sílice utilizando una mezcla hexano: acetato de etilo 8:2. Se obtuvo un producto oleoso amarillo correspondiente al N<sub>3</sub>-[bisGMPA-G1]-(NHBoc)<sub>2</sub> puro con un rendimiento del 6 % (0.37 g).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) 1.24 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.38 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.44 (s, 18H, -OCCH<sub>3</sub>), 1.63 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.27 (t, J=6Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.87 (d, J=8Hz, 4H, -CH<sub>2</sub>-NH-) 4.12 (t, J= 8Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O-), 4.32 (ABq, J=12Hz, y Δ<sub>0AB</sub>= 28,28Hz, 4H, -CH<sub>2</sub>-OH), 5.08 (bs, -NH). **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) 17.8 (-CH<sub>3</sub>, 1G), 18.55 (-CH<sub>3</sub>, 2G), 22.3 (-OC-CH<sub>3</sub>), 25.1 (-OC-C'H<sub>3</sub>), 25.4 (-CH<sub>2</sub>- CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 26.3 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 28.42 (-CH<sub>2</sub>- CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 28.7 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 42.13 (CH<sub>3</sub>-C-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- 2G), 47.1 (CH<sub>3</sub>-C-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- 1G), 51.35 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-), 65.23 (C-6), 65.3 (-CH<sub>2</sub>-O-), 65.85 (C-CH<sub>2</sub>O-), 98.0 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 172.5 (C=O, G1), 173.4 (C=O, G2). **FTIR** (v<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>, nujol): 2934-2860 (C-H), 2097 (N<sub>3</sub>), 1732 (C=O), 1459 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> δ), 1243 (CO-O), 1149 (O-C-C).

### 5.3.3 PROCEDIMIENTO PARA LA SÍNTESIS DEL POLÍMERO HIPERRAMIFICADO FUNCIONALIZADO DE CUARTA GENERACIÓN CON DENDRONES DE TERCERA GENERACIÓN EN SU PERIFERIA (ver esquema 3).

#### a) Síntesis del derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NHBoc)<sub>8</sub> [9]

Se disolvieron CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (31.07 mg, 0.11 mmol), L-ascorbato de sodio (4.78 mg, 0.21 mmol) y TBTA (55.91 mg, 0.11 mmol) en DMF (3 mL). Se realizaron tres ciclos de vacío-argón para eliminar el aire del matraz y se agitó la mezcla a 45°C durante 15 minutos bajo atmósfera de argón. Por otro lado se disolvieron el dendrón N<sub>3</sub>-(bisGMPA,G3)-(NHBoc)<sub>8</sub> [8] (808 mg, 10.32 mmol, 76.8 equivalentes) y el polímero hiperramificado HP-[4G]-(alquino)<sub>61</sub> (50.62 mg, 4.19·10<sup>-3</sup> mmol) en DMF (2+1 mL) y se mezclaron a 45°C bajo atmósfera de argón, tras haber realizado tres ciclos de vacío-argón. Se añadió la solución de cobre a la mezcla de reacción mediante una cánula, manteniendo la reacción a 45°C bajo atmósfera de argón durante 2 días. Se diluyó en 100mL de una solución saturada de cloruro sódico y se realizó una extracción con AcOEt (2 x 100 mL). Se mezclaron las fases orgánicas obtenidas y se lavaron tres veces con una solución saturada de cloruro sódico (3 x 100 mL). Se evaporó el disolvente en atmósfera reducida. El producto se disolvió en la mínima cantidad de DCM y se filtró en una columna en gel de sílice usando DCM como eluyente. Tras evaporar el DCM se disolvió en AcOEt (200 mL) y se lavó con una disolución de KCN en H<sub>2</sub>O destilada (0.1 mg/mL, 150 mL). La mezcla resultante se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente en atmósfera reducida. El producto se disolvió en la mínima cantidad de AcOEt y se precipitó con hexano frío (90 mL), se decantó y se retiró el sobrenadante. Se le añadió hexano para volver a precipitar. Este paso se repitió una vez más. Los sólidos recolectados en el paso anterior se disolvieron en la mínima cantidad de AcOEt y se evaporaron hasta sequedad. Se obtuvo un sólido blanco correspondiente al derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NHBoc)<sub>8</sub> puro con un rendimiento del 44 % (300 mg).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ(ppm) 1.25 (m, 1419H, -CH<sub>3</sub>), 1.42 (m, 1416H, -CH<sub>3</sub>(t-Boc)), 1.96 (m, 236H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 2.44 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-≡), 2.38 y 3.10 (m, 472H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-triazol), 3.88 (m, 1652H, -CH<sub>2</sub>N-), 4.32 (m, 2026H, -CH<sub>2</sub>O-), 7.5 (s, 59H triazol). **FTIR** (ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>, nujol) 3470-3205 (N-H), 3026-2840 (C-H), 1745 (C=O, éster), 1705 (C=O, carbamato), 1659 (C=O, amida), 1526 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> δ), 1243 (O-C).

#### b) Síntesis del derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl)<sub>8</sub>

El derivado dendrítico [9] (250 mg, 1.53x10<sup>-3</sup> mmol) se disolvió en 3 mL de AcOEt. Se añadió AcOEt saturado con HCl (6 mL) y la mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 45 minutos. Apareció un precipitado correspondiente al derivado dendrítico desprotegido. Se añadieron 30 mL de AcOEt para detener la reacción, y se esperaron 15 minutos. Los vapores de HCl se evaporaron a vacío. Se purificó el sólido blanco por centrifugación (3500 rpm, 5 min) y se lavó dos veces con AcOEt puro. Se obtuvo HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl)<sub>8</sub> puro (190 mg, 93 %).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ(ppm) 1.39 (m, 1419H, -CH<sub>3</sub>), 1.67 (m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O) 1.92 (m, 236H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 2.36 y 2.46 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-≡), 2.75 y 2.98 (m, 472H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-triazol), 3.74 (m, 16H, -CH<sub>2</sub>O- del núcleo del polímero hiperramificado (HP)), 3.98 (m, 1652H, -CH<sub>2</sub>N-), 4.34 y 4.47 (m, 2010H, -CH<sub>2</sub>O- dendrones y parte externa del HP), 7.87 (s, 59H triazol), 8.30 y 8.38 (s, -NH). **FTIR** (ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>, nujol) 3697-2355 (N-H<sup>+</sup> y C-H), 1742 (C=O, éster), 1651 (C=O, amida), 1535 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> δ), 1404 (O-C).

## 5.4 PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD DEL DERIVADO DENDRÍTICO

### a) Líneas celulares

Los experimentos se llevaron a cabo en células mesenquimales de médula ósea de ratón (mMSCs, obtenidas de Lonza). Se crecieron en medio de cultivo DMEM-F12 (Biowest) suplementado con 200mM de L-glutamina (Gibco), 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco) y 1% de los antibióticos penicilina, estreptomina y anfotericina (Biowest), de ahora en adelante DMEM-F12 completo. Se mantuvieron en un incubador a 37 °C en hipoxia (3% de O<sub>2</sub>).

Algunos experimentos también se llevaron a cabo en una línea celular derivadas de adenocarcinoma de cérvix humano: línea HeLa (obtenidas de los servicios celulares de Reino Unido para la investigación del cáncer). Estas células se mantuvieron en un medio DMEM rico en glucosa (con glutamina; Biowest) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de los antibióticos penicilina-streptomina-anfotericina a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> en atmósfera humidificada.

### b) Citotoxicidad

Se sembraron células mMSC con una densidad de  $1 \times 10^4$  células por pocillo en tres placas MW96, en medio DMEM-F12 completo hasta un volumen final de 100  $\mu$ l. Tras 24 horas de incubación se sustituyó el medio por 100 $\mu$ l de DMEM-F12 completo al que se le había añadido el derivado dendrítico (HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>8</sub>) con una concentración final de 0, 0.1, 0.5 y 1 mg/mL según el pocillo. Se realizaron cuatro réplicas para cada condición. Cada placa se incubó 24, 48 ó 72 horas. Transcurrido ese tiempo se reemplazó el medio por 100 $\mu$ l de DMEM-F12 completo suplementado con un 10% en volumen del reactivo Alamar Blue® (Thermo Fisher Scientific). En el interior de las células viables, la resazurina, un ingrediente activo de este reactivo, se reduce a resorufina que emite fluorescencia roja. Se incubó durante 3 horas y se leyó la fluorescencia a 530/590 nm (excitación/emisión) en un lector de placas Synergy HT (BioTek). Los resultados se muestran como el porcentaje de viabilidad celular media, suponiendo viabilidad máxima, el 100%, el control negativo (0 mg/mL).

### c) Cambios en el Ciclo Celular (S/G2/G1)

Se sembraron  $2 \times 10^5$  células mMSC por pocillo en una placa de MW6 y se añadió medio DMEM-F12 completo hasta un volumen final de 2mL. La placa se incubó 24h y, pasado este tiempo, el medio se sustituyó por 2mL de DMEM-F12 completo al que se le había añadido el derivado dendrítico a concentraciones finales de 0, 0.5 y 0.1 mg/mL. Tras 72 horas de incubación se recolectaron las células mediante tripsinización, se centrifugaron y el *pellet* se lavó con PBS centrifugado y se fijó con EtOH a 4°C (al menos durante 1 hora). Se añadió ARNasa A y se realizó un marcaje de los núcleos con yoduro de propidio. Utilizando un sistema FACSArray (Becton Dickinson) se midió el porcentaje de células que hay en cada fase del ciclo celular (S/G2/G1) mediante citometría de flujo.

### d) Formación de complejos con ácido nucleico y ensayos de retardo en gel

El derivado dendrítico (HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>8</sub>) se incubó con el plásmido pEGFP en DMEM-F12 sin suero durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se ensayaron distintas relaciones en peso de derivado dendrítico y pEGFP: 0, 1/1, 3/1, 5/1, 10/1, 50/1, 100/1, 150/1 y 200/1, en un volumen de 15  $\mu$ l. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, 95V, 20-30 minutos para analizar el retardo en gel, y por lo tanto la formación de complejos. Para ello se añadió de tampón de carga 6X (Takara, UK) (**ver anexo III**) a cada muestra y se cargaron en el gel con tampón TAE 1X (40 mL TRIS/HCl, 1 % ácido acético, 1mM EDTA, pH 7.4) y SybrSafe 10000X (Thermo Fisher

Scientific). El desplazamiento del ácido nucleico se analizó con un transiluminador UV ChemiDOC XRS (Biorad) con el software Quantity One (Biorad).

Siguiendo el mismo procedimiento se llevó a cabo el estudio de la formación de complejos entre el derivado dendrítico y el siARN de luciferasa (siLuc).

#### **e) Transfección con pEGFP y siGFP vehiculizados**

Para los ensayos de transfección de pEGFP se sembraron  $1 \times 10^4$  células mMSC por pocillo en una placa de 96 pocillos (MW96). Se ensayaron distintas relaciones en peso de derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl)<sub>8</sub> y pEGFP: 50:1, 100:1 y 200:1. La transfección se probó para distintas cantidades de pEGFP final: 0.1, 0.2 y 0.4 gramos de pADN en cada pocillo para cada ratio. Para formar los complejos se incubó cada mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente con medio DMEM-F12 sin suero. Se prepararon réplicas de cada uno de ellos. Como control positivo se usó lipofectamina® 2000 (Thermo Fisher Scientific) con pEGFP en proporción 3/1 en peso, respectivamente, y también se ensayaron concentraciones finales de 0.1, 0.2 y 0.4 g de pADN por pocillo. Finalizado el tiempo de formación de los complejos se sustituyó el medio de los pocillos de la placa MW96 por 50 µL de cada una de las mezclas preparadas. Tras 24 horas se sustituyó el medio por 50 µL DMEM-F12 completo. A las 48h de añadir los derivados se evaluó la expresión de GFP. Para ello se usó un microscopio de fluorescencia Olympus IX81, un lector de placas (480/2, 528/2) y citometría de flujo.

Los ensayos de transfección con siGFP se hicieron de manera análoga a los de pEGFP pero con células mMSCs-GFP (mesenquimales de médula ósea de ratón transformadas de forma estable para expresar GFP con el vector retroviral pCL-GFP, cedidas por la Dra. Rebeca González) Se probaron diferentes concentraciones derivado dendrítico/siARN: 100/1, 200/1 y 500/1 y Lipofectamina/siARN 3/1. Para cada ratio se ensayaron concentraciones finales de 200 y 400 nM de siGFP.

#### **f) Ensayo de digestión**

El derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl)<sub>8</sub> se incubó con el plásmido pEGFP en agua destilada durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se ensayaron distintas relaciones en peso de derivado dendrítico y pEGFP: 0, 100/1, 200/1 y 500/1. Para cada relación en peso se prepararon cuatro alícuotas, dos sirvieron como control negativo (una incubada y otra sin incubar), en las otras dos se añadieron las enzimas de restricción *Hind*III (Takara), y *Mfe*I (New England Biolabs), con sus respectivas soluciones tampón comerciales. Estas enzimas se eligieron porque solo tienen un sitio de corte en el plásmido pEGFP. Se incubaron a 37°C durante una hora. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en 1X TAE con SybrSafe 10000X a 95V, 20-30 minutos para comprobar si en el complejo el pEGFP se encontraba protegido frente a las enzimas de restricción. Para referenciar la banda del pADN lineal se usó el marcador de pesos moleculares 1Kb plus DNA Ladder de Fermentas. El gel se analizó con un transiluminador UV ChemiDOC XRS (Biorad) con el software Quantity One (Biorad).

#### **g) Dispersión dinámica de la luz (DLS)**

Todas las medidas se realizaron con un analizador de tamaño de partículas Brookhaven Instruments Corporation 90 plus. Las muestras para las medidas de DLS se prepararon en el momento en agua destilada a una concentración de 1 mg/mL y cuatro relaciones en peso derivado dendrítico/pADN: 10/1, 50/1, 100/1 y 200/1; y dos derivado dendrítico/siARN: 100/1 y 200/1. Se realizaron cinco medidas para cada muestra. Los resultados se muestran como valores promedio en intensidad y número.

### h) Microscopía electrónica de transmisión en modo criogénico (cryoTEM)

Las imágenes de cryoTEM se obtuvieron con un microscopio FEI TECNAI T20 a 200kV. Las muestras se prepararon en rejillas de cobre Lacey 300 mesh (Agar Scientific), antes de depositarlas, no obstante, se realizó un tratamiento con plasma de las rejillas, para ionizarlas. Después las muestras se vitrificaron en un Vitrobot (FEI) en etano líquido y se almacenaron en un soporte Gatan para muestras frías en nitrógeno líquido, hasta su visualización en el microscopio.

### i) Determinación de potencial $\zeta$

Todas las medidas se realizaron en un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS en un tampón HEPES 6 mM, pH 7.4 y 144 mM de NaCl. Los complejos de ácido nucleico (pEGFP y siLuc) y derivado dendrítico se prepararon a una concentración final de 10  $\mu\text{g/mL}$  de ácido nucleico, y relaciones en peso á. nucleico/derivado dendrítico de 1/1, 5/1, 10/1, 50/1 y 200/1 para el pADN y de 100/1 y 200/1 para el siARN. Antes de las medidas, estas soluciones se mezclaron vigorosamente y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres medidas con un mínimo de 10 barridos para cada muestra.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 6.1 SÍNTESIS

Se realizó una **síntesis convergente en tres partes** del polímero hiperramificado dendronizado. Primero se sintetizó el ácido 2,2'-bis(gliciloximetil)propiónico (*bis*GMPA), que constituye el monómero para los pasos posteriores. Después se sintetizaron los dendrones de *bis*GMPA de tercera generación. Por último se unieron esos dendrones al polímero hiperramificado de cuarta generación, basado en el *bis*MPA.

#### 6.1.1 Síntesis del monómero de *bis*GMPA (esquema 1)

Para obtener el monómero se realizó una síntesis en dos pasos partiendo de *bis*MPA comercial protegido con un grupo bencilo, previamente sintetizado en el grupo. En el primer paso se llevó a cabo una esterificación de Steglich para hacer reaccionar sus dos grupos hidroxilo con glicinas protegidas con grupos *N-tert*-butiloxicarbonilo (t-Boc). De esta manera se evitó que los grupos amino reaccionaran en etapas siguientes. En el segundo paso se eliminó el grupo protector bencilo mediante hidrogenación con  $\text{H}_2$  en presencia de Pd/C como catalizador heterogéneo. El **rendimiento final fue del 50 %**.

#### 6.1.2 Síntesis del dendrón de tercera generación de *bis*GMPA (esquema 2)

Partiendo de 6-clorohexan-1-ol se llevó a cabo una **sustitución nucleófila bimolecular** para sustituir el cloro por un grupo azida. Este grupo tiene un papel esencial en etapas posteriores de la síntesis. Sobre el grupo alcohol de la molécula se realizó el crecimiento del dendrón. Primero se llevó a cabo una **esterificación de Steglich** en la que se hizo reaccionar con un monómero de *bis*MPA protegido con un grupo cetal. Esta reacción usa diciclohexilcarbodiimida (DCC) como activador del grupo ácido, que se consume en la reacción formando diciclohexilurea (DCU), y está catalizada por DPTS (4-toluenosulfonato de 4-(dimetilaminopiridinio)). La DCU se tiene que eliminar; se hizo por filtración tras precipitación con hexano. El producto se purificó mediante cromatografía a presión en gel de sílice. Se optó por seguir esta reacción de esterificación porque se lleva a cabo en condiciones suaves, que no afectan a la estabilidad de los compuestos, y da rendimientos altos.

Los grupos hidroxilo terminales se desprotegeron con una **hidrólisis del grupo cetal** usando una resina de intercambio de protones Dowex®. Una vez activados, estos grupos se funcionalizaron con N-(tert-butoxicarbonil)glicina (glyBoc(OH)) para conseguir la primera generación del dendrón de *bis*GMPA [5]. A partir de este compuesto se pueden sintetizar dendrones de generaciones mayores siguiendo los pasos de síntesis descritos en el **esquema 3**.

### 6.1.3 Síntesis del polímero hiperramificado funcionalizado con dendrones en la periferia (esquema 3)

Un polímero hiperramificado de tipo poliéster de *bis*MPA de cuarta generación, funcionalizado en sus grupos terminales con grupos alquino se hizo reaccionar con las azidas presentes en los dendrones de *bis*GMPA [8] (ambos previamente sintetizados en el grupo). Esto se hizo mediante una **reacción de cicloadición considerada de química click**, que da lugar a la formación de un grupo triazol. La reacción emplea como catalizador cobre (I) generado *in situ* por reducción de sales de Cu (II) usando L-ascorbato como agente reductor, y TBTA (tris(benciltriazolimetil)amina) como estabilizador Cu (I). La química click se utiliza con frecuencia en la síntesis de dendrímeros ya que da buenos resultados cuando hay que unir un gran número de dendrones a una estructura ramificada y la purificación del producto es sencilla, mediante lavados con disoluciones acuosas, incluida una con KCN, para eliminar restos de cobre, y una filtración en gel de sílice para eliminar el sistema catalítico. La reacción se llevó a cabo con un exceso de dendrones para favorecer que reaccionaran el máximo número posible de grupos alquino (76.8 equivalentes de dendrón por cada uno de polímero hiperramificado). Además se usaron los dendrones con sus grupos terminales protegidos con t-Boc para evitar su interacción con el sistema catalítico y aumentar el rendimiento de la reacción.

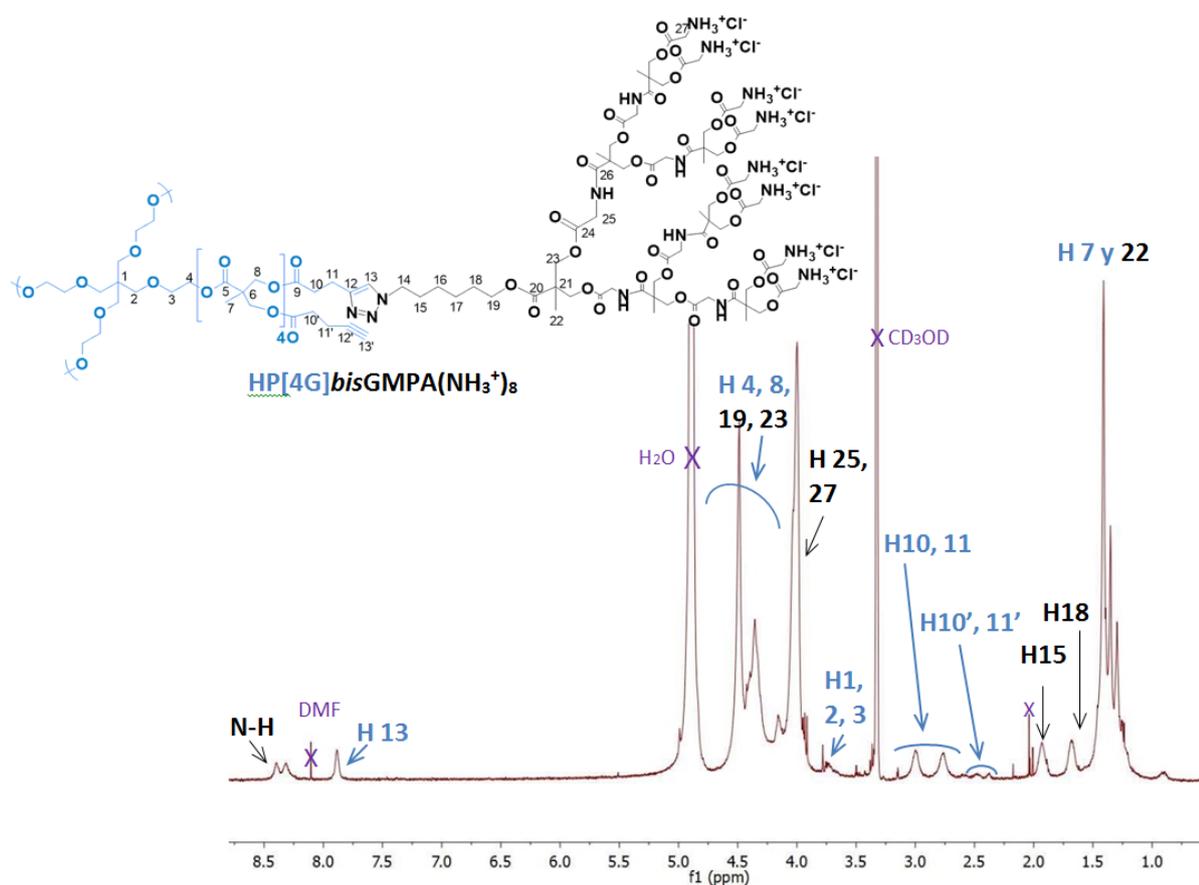
En un último paso se llevó a cabo la **desprotección de los grupos amino terminales** bajo condiciones ácidas (ácido clorhídrico 3 M en acetato de etilo), formando sales de amonio que precipitan en el medio de reacción. El producto final se recuperó por sucesivas centrifugaciones y lavados con acetato de etilo puro. Se obtuvo un rendimiento final del 41 %.

## 6.2 CARACTERIZACIÓN

Se usó resonancia magnética nuclear de protón (RMN  $^1\text{H}$ ) y carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ), así como espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para la caracterización de los compuestos sintetizados y hacer el seguimiento de las reacciones.

La inserción de los dendrones tras la reacción de cicloadición se confirmó estudiando **su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 5)**. En él se ve la aparición de un pico a 7.87 ppm que corresponde con el protón del anillo triazol formado en la reacción (H-13). Con el espectro también es posible estimar el número de dendrones que se han introducido, de promedio, en el núcleo polimérico hiperramificado. Para ello hay que comparar la integración de los picos correspondientes a los protones en posiciones  $\alpha$  y  $\beta$  de los grupos alquino (H10' y H11') presentes si no se ha producido la reacción, con la de los picos correspondientes a los mismos protones cuando se ha formado el triazol (H10 y H11). De esta forma se pudo estimar que el grado de funcionalización del polímero fue del 97%, habiéndose introducido 59 grupos funcionales de media en cada núcleo.

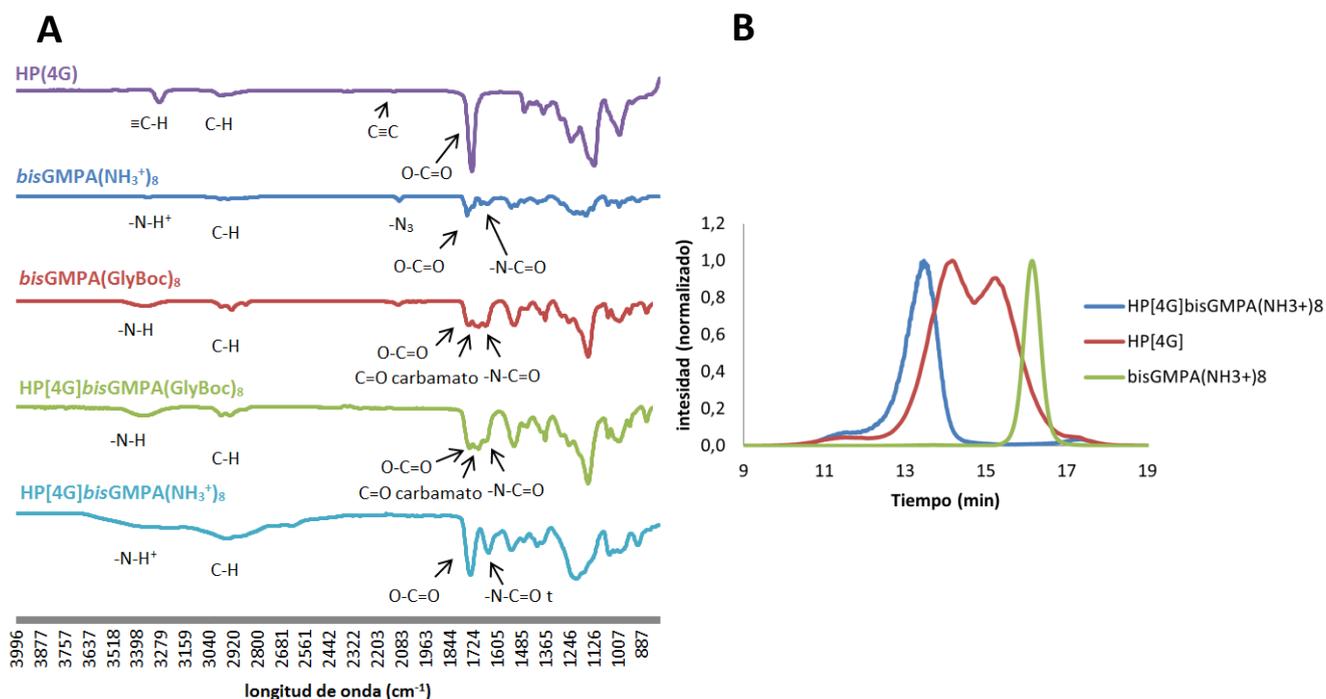
Considerando el número de dendrones que se unieron a cada núcleo y su estructura química se pudo calcular el **número de grupos funcionales** que tenía cada molécula de promedio: 472 grupos amino terminales y 354 glicinas internas.



**Figura 5.** RMN  $^1\text{H}$  del polímero hiperramificado dendronizado  $\text{HP}[4\text{G}]\text{bisGMPA}(\text{NH}_3^+\text{Cl}^-)_8$ .

En el espectro de FTIR (Figura 6.A), podemos verificar la cicloadición por la desaparición de las bandas a  $3309$  y  $2119\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a la vibración de tensión de los enlaces  $\equiv\text{C-H}$  y  $\text{C}\equiv\text{C}$  presentes en el polímero hiperramificado, y la banda a  $2100\text{ cm}^{-1}$  característica de la azida presente en los dendrones. En los espectros de los dendrones y el polímero hiperramificado dendronizado aparecen vibraciones de tensión de enlaces N-H, a  $3354\text{ cm}^{-1}$ , que no estaban presentes en el polímero. Además, al desproteger los grupos NH, la correspondiente banda se vuelve más ancha y desaparece la banda del carbonilo del grupo carbamato ( $1700\text{cm}^{-1}$ ) que indica la presencia del grupo protector t-Boc.

La caracterización del producto final se completó con una **cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (Figura 6.B)**. Podemos ver como el polímero hiperramificado (rojo) es el más polidisperso, ya que la amplitud de su curva es mucho mayor y presenta tres picos. El dendrón de tercera generación (verde) es el más monodisperso (valor de polidispersidad cercano a 1, no se muestra el dato). El derivado dendrítico (azul) ha conseguido reducir el grado de polidispersidad del polímero, al estar funcionalizado con dendrones en su periferia. Esto es importante para sus aplicaciones posteriores, ya que se asemeja a un dendrímero. Con la gráfica también podemos concluir que el tamaño del derivado dendrítico es mayor que el del dendrón y el polímero hiperramificado, como cabría esperar, ya que sale a tiempos menores. También sirve para confirmar que en el producto final no queda dendrímero sin reaccionar contaminante, o aparecería un pico a la altura del dendrón.



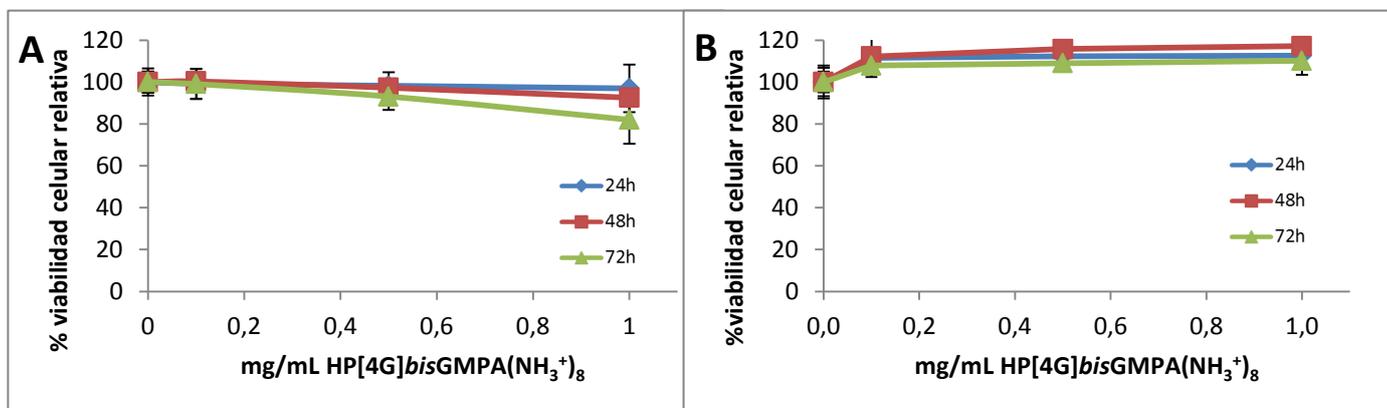
**Figura 6. (A)** Espectros FTIR del núcleo polimérico hiperramificado HP(4G), el dendrón protegido con grupos t-Boc, sin proteger y el polímero hiperramificado dendronizado. **(B)** Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) del polímero hiperramificado dendronizado (azul), el polímero hiperramificado de cuarta generación (rojo) y el dendrón de tercera generación con los grupos terminales protegidos (verde).

### 6.3 BIOCOMPATIBILIDAD

Antes de proceder a los estudio de transfección, se analizaron tanto la citotoxicidad como las posibles alteraciones en el ciclo celular que pudiera causar el derivado dendrítico.

#### 6.3.1 CITOTOXICIDAD

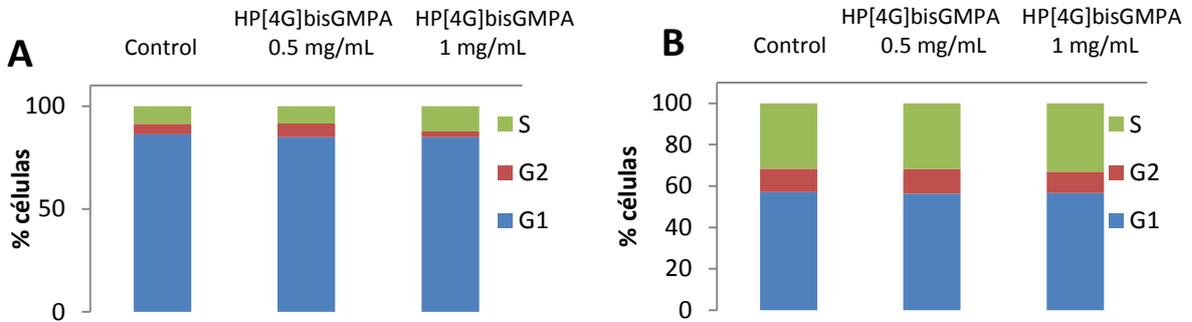
La citotoxicidad del derivado dendrítico se estudió en células de cáncer de derivadas de adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa) y mesenquimales de médula ósea de ratón (mMSCs) y mostró una elevada biocompatibilidad en todas las condiciones en las que se probó: hasta 72 horas de contacto con concentraciones de hasta 1 mg/mL del derivado dendrítico con una **viabilidad celular superior a 80%** con respecto al control en todos los casos (**figura 7**).



**Figura 7.** Porcentaje de viabilidad celular medida para células mMSCs (A) y HeLa (B) a las 24, 48 y 72h para concentraciones del derivado dendrítico de 0, 0.1, 0.5 y 1 mg/mL

### 6.3.2 ALTERACIONES EN EL CICLO CELULAR

Se analizó el porcentaje de células mMSCs y HeLa que se encontraban en cada una de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. Para las concentraciones de derivado dendrítico ensayadas: 0.5 y 1 mg/mL, con un tiempo de exposición de 72 horas, **no observaron cambios significativos** en el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (**figura 8**) lo que significa que el compuesto no altera el crecimiento normal de las células.



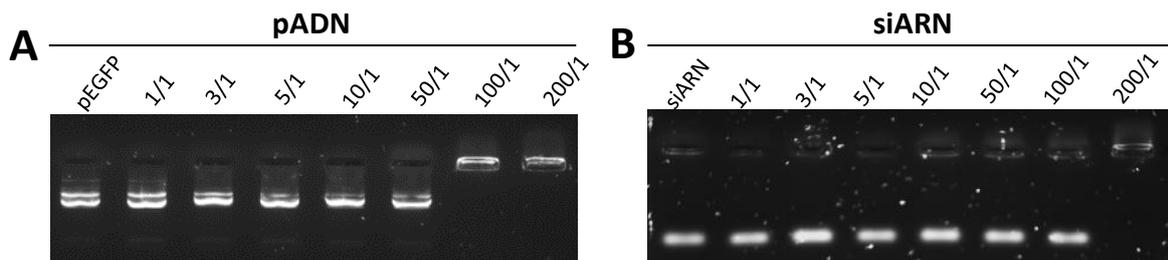
**Figura 8.** Porcentaje de células mMSCs (A) y HeLa (B) en cada fase del ciclo celular (S/G2/G1) tras 72h de exposición a concentraciones finales del derivado dendrítico de 0, 0.5 y 0.1 mg/mL

## 6.4 FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS CON ÁCIDOS NUCLEICOS

Se probó la capacidad del derivado dendrítico para formar complejos con ácidos nucleicos. También se analizaron algunas características de estos complejos como su tamaño y carga superficial promedio, que son importantes para que las células puedan endocitarlos durante el proceso de transfección.

### 6.4.1 ENSAYO DE RETARDO EN GEL DE AGAROSA

Para estudiar la **formación de complejos** entre el derivado dendrítico y el material genético se hicieron ensayos de retardo en gel de agarosa al 1%. Se analizó la migración del material genético cargado negativamente hacia el polo positivo durante la electroforesis a diferentes relaciones en peso del derivado dendrítico y el pADN o el siARN. Cuando el material genético está formando un complejo con el derivado dendrítico no avanza en el gel y no se ve ninguna banda a la altura del material genético libre (control negativo). En la **figura 9.A** se observa que para el derivado dendrítico HP[4G]bisGMPA(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl)<sub>8</sub> a un ratio de 100/1 (peso<sub>dendr.</sub>/peso<sub>pADN</sub>) todo el pEGFP está formando complejos. Esta prueba se repitió cuatro veces y en dos de ellas se vio la formación de complejos a ese ratio. En todos los casos, no obstante, al ratio 200/1 el pADN siempre aparecía totalmente en forma de complejo. De la misma manera, en el caso del siARN se aprecia que todo el material genético está formando parte de los complejos con el derivado dendrítico a ratio en peso 200/1 (**figura 9.B**). El ARN es una estructura más rígida que el ADN y no se puede adaptar tan cómodamente a la superficie del derivado dendrítico, por ello se necesitan más macromoléculas para formar los complejos.



**Figura 9.** Ensayo de retardo en gel de agarosa de pADN (A) y siARN (B) a diferentes ratios en peso derivado dendrítico/ácido nucleico.

### 6.4.2 POTENCIAL $\zeta$

Se analizó el potencial  $\zeta$  de los complejos formados a diferentes ratios en peso de derivado dendrítico/ácido nucleico, tanto para pEGFP como para siLuc (figura 10 y tabla 1).

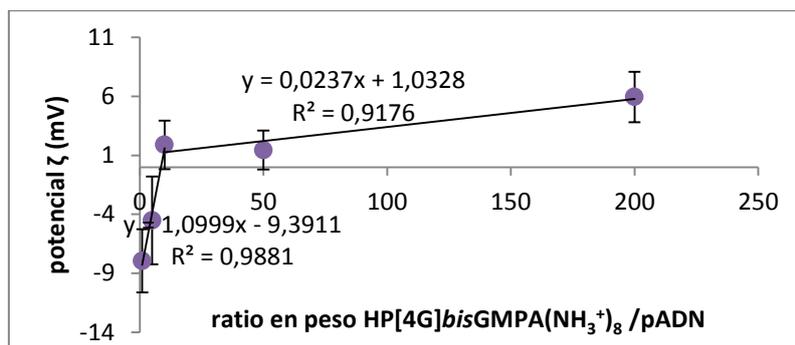


Figura 10. Medida del potencial  $\zeta$  a diferentes ratios en peso de derivado dendrítico/pADN

| Ratio en peso<br>HP[4G]bisGMPA/AN | pADN            |                 |                |                |                | siARN          |                |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                   | 1/1             | 5/1             | 10/1           | 50/1           | 200/1          | 100/1          | 200/1          |
| Potencial $\zeta$ (mV)            | -7.94 ±<br>2.68 | -4.52 ±<br>3.72 | 1.89 ±<br>2.05 | 1.44 ±<br>1.65 | 5.95 ±<br>2.13 | 5.18 ±<br>2.81 | 9.42 ±<br>1.26 |

Tabla 1. Medida del potencial  $\zeta$  a diferentes ratios en peso de derivado dendrítico/ácido nucleico (dend/AN), con pADN y con siARN.

Esta medida nos da un **valor promedio de la carga superficial** de las partículas en disolución. Tanto para los disoluciones de derivado dendrítico con pADN como con las de siARN el potencial  $\zeta$  cambia de valores negativos a ratios bajos de derivado dendrítico/ácido nucleico a positivos cuando aumenta la proporción de derivado dendrítico, ya que se están formando los complejos y el ácido nucleico, cargado negativamente, queda estabilizado por las cargas positivas del derivado dendrítico. A ratios en los que ya todo el ácido nucleico está formando complejos, (200/1 en ambos casos) **la carga es positiva**, aproximadamente 6 mV para el pADN y 9.4 mV para el siARN. Que los complejos tengan carga positiva es importante para la transfección ya que favorece las interacciones con glicoproteínas, proteoglicanos y glicerolfosfatos presentes en la membrana celular y facilita la interacción entre la célula y complejo y su internalización. No obstante, una carga excesivamente alta también podría desestabilizar las membranas y causar citotoxicidad, aunque este no es el caso.

### 6.4.3 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS) Y cryoTEM

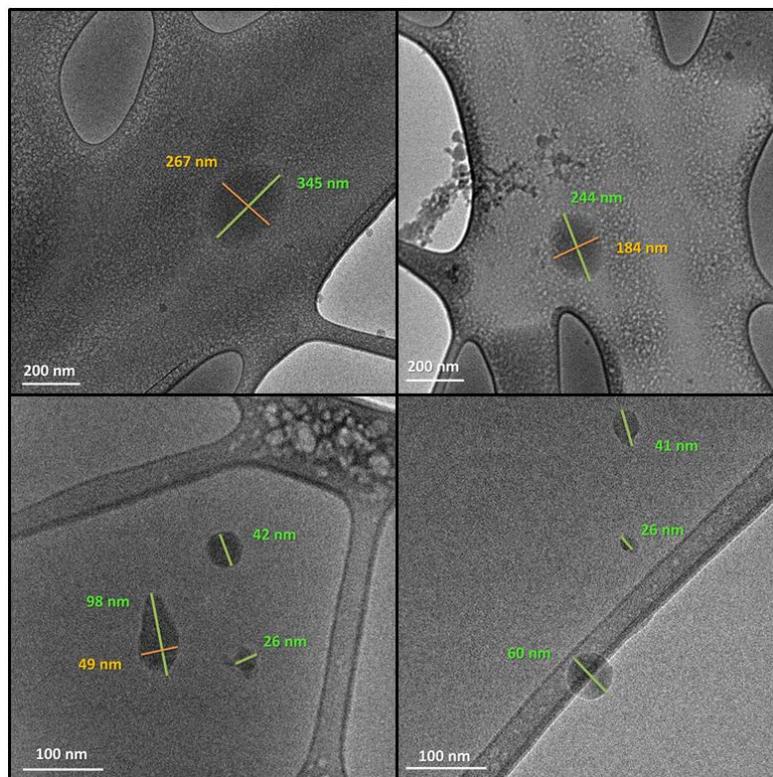
Se analizó por DLS el **tamaño de las partículas** de complejo formadas al agitar disoluciones con distintas relaciones en peso de derivado dendrítico/ácido nucleico. Los resultados se dan como el diámetro promedio calculado con dos tratamientos de datos diferentes: la intensidad y el número (tabla 2).

| Relación<br>HP[4G]bisGMPA(NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) <sub>8</sub> /<br>ácido nucleico | INTENSIDAD (nm) | NÚMERO (nm) |
|---|-----------------|-------------|
| pADN  | 10/1            | 203 ± 109   |
|   | 50/1            | 274 ± 114   |
|   | 100/1           | 245 ± 83    |
|   | 200/1           | 252 ± 91    |
| siARN   | 100/1           | 251 ± 97    |
|   | 200/1           | 255 ± 90    |

Tabla 2. Valores del diámetro hidrodinámico de las partículas medidas por dispersión dinámica de la luz (DLS) para distintos ratios en peso derivado dendrítico/ácido nucleico (pADN y siARN).

Se puede ver como a ratios más bajos aparecen dos poblaciones con diámetros promedio distintos, según usemos el tratamiento matemático de intensidad o de número. No obstante, los resultados tienden a igualarse al aumentar la proporción de derivado dendrítico hasta alcanzar un valor de diámetro promedio sin diferencias significativas en el caso del **pADN** a ratio 200/1, cuando todo el ácido nucleico está formando complejos con el derivado dendrítico. A ese ratio el diámetro promedio se aproxima a 200 nm, que puede resultar demasiado alto para que estas partículas se internalicen adecuadamente en las células. En el caso del **siARN** a 200/1 los dos tratamientos todavía calculan poblaciones de distinto tamaño: una con 255 nm de diámetro promedio, y otra de 56 nm.

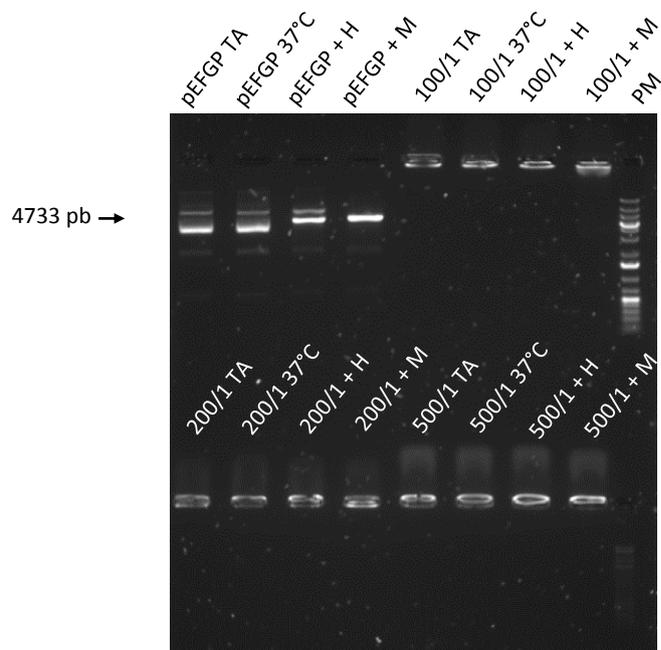
También se usó **microscopía electrónica de transmisión en modo criogénico (cryoTEM)** para analizar la forma de las partículas en el caso de los complejos formados con pADN a ratio en peso de 100/1 (derivado dendrítico/pADN) (**figura 11**). En ella se ven partículas de diferentes tamaños, algunas con diámetros próximos a 250 nm, y otras más pequeñas, tal y como se había calculado con DLS. Cabe destacar que la morfología de las partículas, especialmente las de mayor tamaño, no es circular, sino ovalada.



**Figura 11.** Imágenes de cryoTEM de los complejos formados con el derivado dendrítico y pADN a ratio en peso 100/1

#### 6.4.4 ENSAYO DE DIGESTIÓN

Se realizó un estudio preliminar para comprobar si, al estar formando un complejo con el derivado dendrítico, el pEGFP adquiriría protección frente al ataque por enzimas de restricción. Se eligieron dos enzimas *MfeI* y *HindIII* que tienen un único sitio de corte en el plásmido (**ver anexo II**) y se incubaron con pADN desnudo (control positivo de digestión) y con el pADN formando complejos con el derivado dendrítico a distintos ratios en peso (derivado dendrítico/pADN): 100/1, 200/1, 500/1. Se realizó una electroforesis para ver si el enzima había cortado, en cuyo caso aparecía una banda a la altura correspondiente al pADN lineal (**figura 12**).



**Figura 12.** Gel de electroforesis de mezclas de pADN derivado dendrítico a varios ratios en peso y un control positivo de pADN. Incubados durante 1 hora a temperatura ambiente (TA), a 37°C, y a 37°C con la enzima de restricción *Hind*III (H) o *Mfe*I (M) respectivamente.

Para todos los ratios derivado dendrítico/pADN analizados se vio que se formaba el complejo (el pADN no migraba hacia el polo positivo) y no aparecían nuevas bandas correspondientes al ADN lineal, por lo que se puede deducir que **el enzima de restricción no había cortado**.

Los ratios en peso a los que se forman los complejos son altos, y por lo tanto, la cantidad de derivado dendrítico es alta comparada con el ácido nucleico, esto, unido a carga positiva explica la alta protección. Quedaría por comprobar si con el tiempo, o a un pH bajo, sin hacer las digestiones, el derivado es capaz de liberar el plásmido, ya que esto es importante para que se produzca la transfección.

## 6.5 ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN

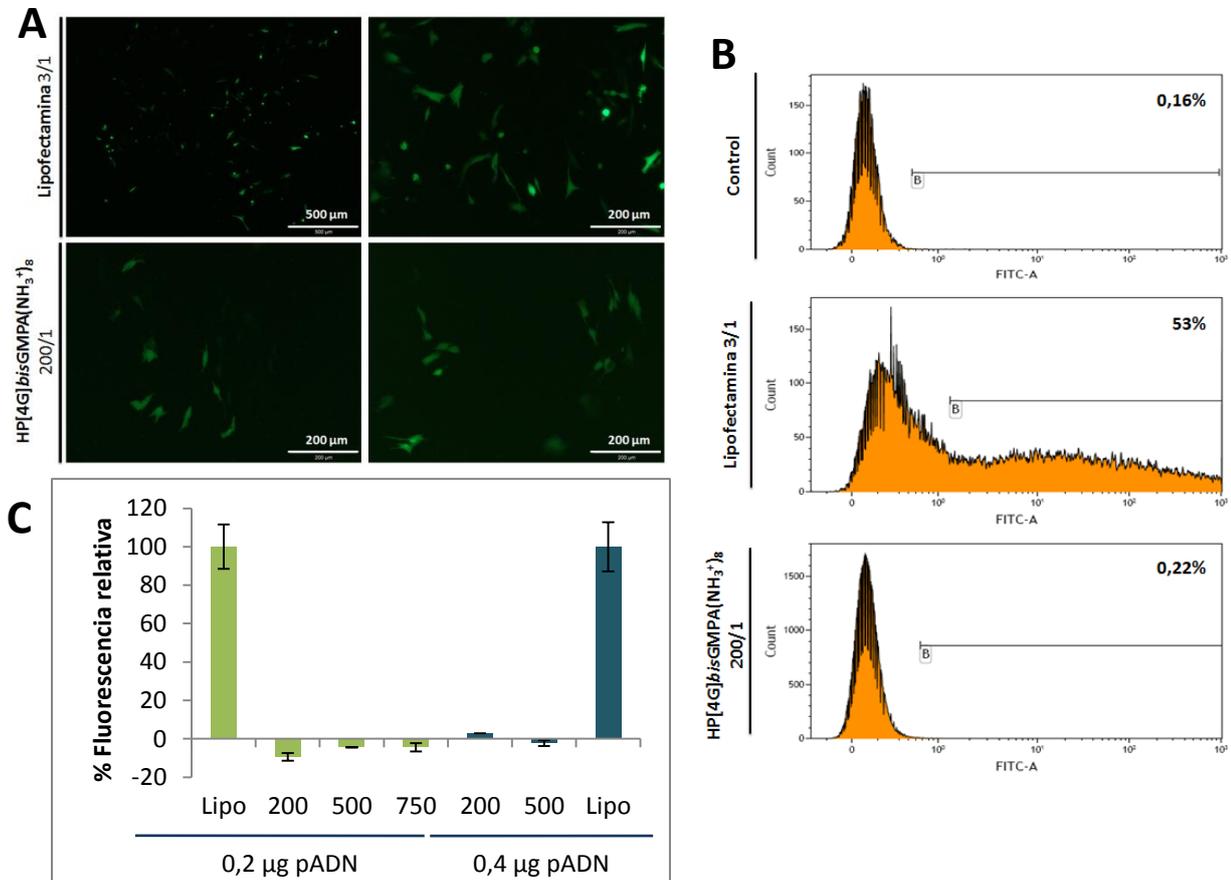
### 6.5.1 Transfección con pADN

Para la transfección de pADN se usó un vector plasmídico (pEGFP) de 4733 pares de bases que contenía la información para que las células pudieran expresar una proteína fluorescente verde (GFP) de manera constitutiva (bajo el promotor CMV). Si la transfección ha tenido lugar, la célula expresa la proteína fluorescente verde y permite el estudio sencillo de la eficacia de transfección. También es posible la comparación en distintas condiciones.

La transfección *in vitro* se llevó a cabo en células mesenquimales de médula ósea de ratón (mMSCs) en la que se comparó la capacidad para transfectar del derivado dendrítico a diferentes ratios con un vector para la transfección génica comercial: lipofectamina® 2000.

Pasadas 48h se realizó una lectura de la fluorescencia y se vio por microscopía de fluorescencia la presencia de algunas células verdes para el ratio 200/1 con una cantidad final de 0,4 µg de pADN por pocillo. No obstante los niveles están muy por debajo de los que muestra la Lipofectamina 2000®. **(Figura 13).** Para el resto de ratios los niveles de fluorescencia **no presentaban diferencias significativas con el control negativo** y por lo tanto podemos asumir que en esas condiciones el derivado dendrítico no tiene capacidad para transfectar pEGFP. Como se puede ver en las imágenes de microscopía, por la presencia de pequeñas partículas de morfología esférica, las células expuestas a la

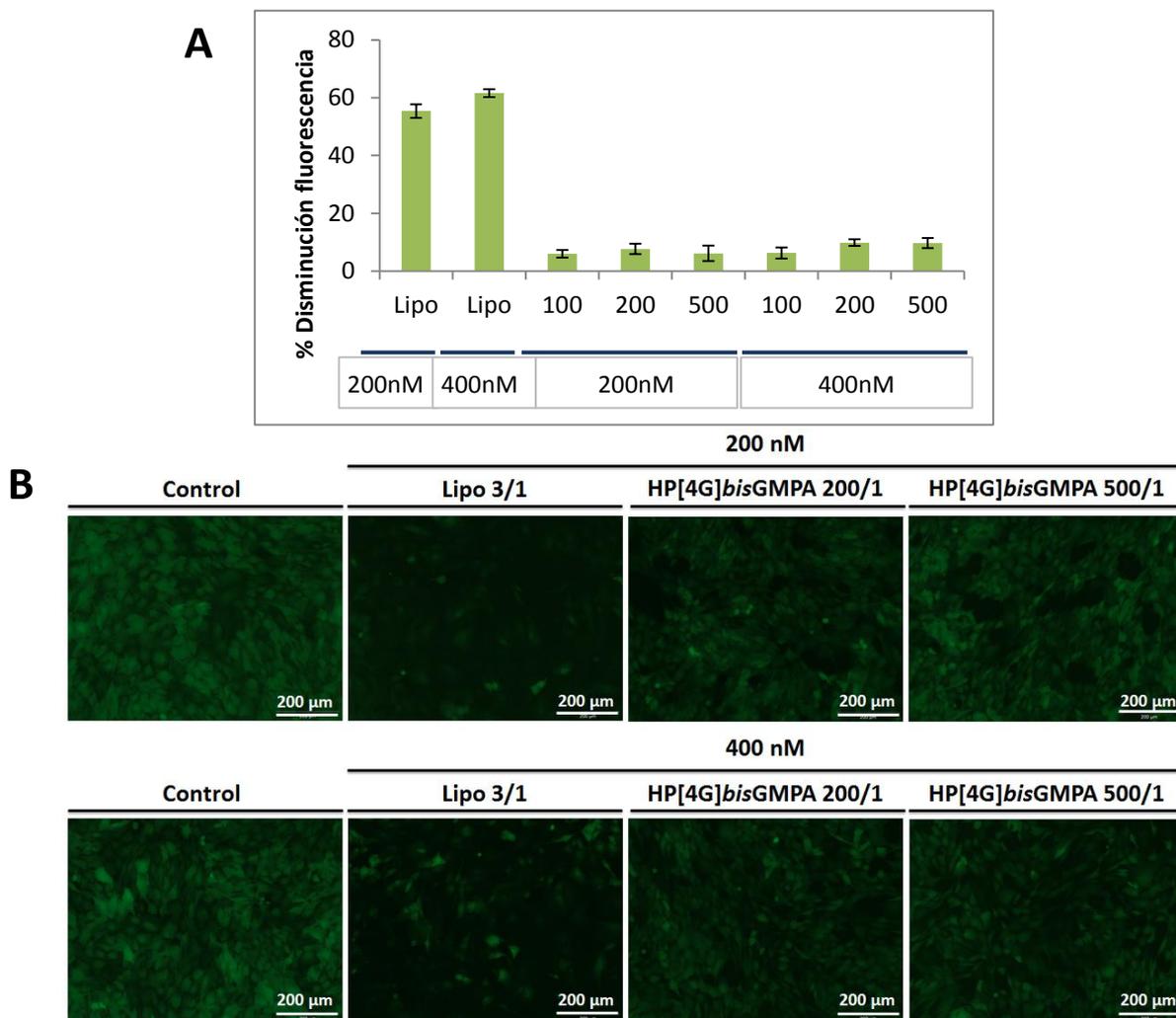
lipofectamina sufrieron mayor muerte celular, incluso para cantidades de agente mucho menores. Mientras que el **porcentaje de viabilidad** descendió al  $26.6 \pm 8$ , en el caso del HP[4G]bisGMPA(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)<sub>8</sub> no presentó diferencias significativas con el control para ninguno de los ratios ensayados.



**Figura 13.** (A) Imágenes de fluorescencia de mMSCs transfectadas con lipofectamina/pEGFP 3/1 en peso y derivado dendrítico/pEGFP 200/1 en peso, ambas a 0.4 μg/pocillo. (B) Histogramas de citometría en los que se representa el % de células positivas para GFP después de incubar 24h con los complejos. (C) % de fluorescencia relativa, suponiendo 100% el control con lipofectamina/pEGFP a un ratio en peso 3/1, para el derivado dendrítico/pEGFP a ratios de 200/1, 500/1 y 750/1, tanto para 0,2 μg de pADN y para 0,4 μg de pADN en cada pocillo. Lipo: Lipofectamina.

### 6.5.2 Transfección con siARN

Para la transfección del siARN se utilizó un ARN pequeño de interferencia que inhibe la expresión del gen de la proteína fluorescente, GFP. Esta proteína se expresa de manera heteróloga y constitutiva en una línea celular de mMSC-GFP. En caso de que la transfección haya tenido lugar se verá un descenso en la fluorescencia de las células, debido al efecto del siARN, esto permite comparar la eficacia de la transfección en las distintas condiciones, y con un agente comercial, de nuevo la lipofectamina 2000® (**Figura 14**). Aunque la eficacia de transfección vuelve a ser mucho menor que para el caso de la lipofectamina (60 %), **se llegaron a alcanzar porcentajes de disminución de la fluorescencia del 10 %**, demostrando una mayor eficacia que para el caso del pADN.



**Figura 14.** (A) porcentaje en descenso en la fluorescencia para lipofectamina/pEGFP a un ratio en peso 3/1 y para el derivado dendrítico/pEGFP a ratios de 200/1, 500/1, tanto para 200 nM y 400 nM de siARN de concentración final. (B) Imágenes de fluorescencia de mMSC-GFPs transfectadas con lipofectamina/siGFP 3/1 en peso y derivado dendrítico/siGFP 200/1 en peso, a 200nM o 400nM de concentración final de siARN.

Que en el caso del siARN la eficacia de la transfección fuera mejor que en el caso del pADN concuerda con los resultados obtenidos en la caracterización de los complejos. El potencial  $\zeta$  mostraba, para el mismo ratio, una mayor cantidad de cargas positivas en el caso del siARN, lo que facilita la interacción con las membranas. Por otro lado, al estudiar el diámetro de las partículas por DLS, el siARN mostraba una población de partículas de diámetro pequeño (56 nm) hasta ratios de 200/1, lo que facilitaría el proceso de endocitosis. En cualquier caso, ninguno de los resultados es comparable con los valores alcanzados con la lipofectamina 2000®.

## 7. CONCLUSIONES

Se sintetizó un polímero hiperramificado funcionalizado con dendrones derivados del ácido 2,2'-bis(gliciloximetil)propiónico, bisGMPA y terminado en grupos amino, lo que le dota de cargas positivas. El número de dendrones que se logró introducir en la estructura del polímero hiperramificado fue alto y se observó una baja polidispersidad del derivado final.

El polímero funcionalizado con dendrones mostró **altos niveles de biocompatibilidad y capacidad para formar complejos** tanto con pADN como con siARN, aunque a ratios algo elevados (200/1).

Los complejos formados, a los ratios en los que todo el ácido nucleico estaba vehiculizado, mostraron tener una **carga superficial positiva y un diámetro de partícula promedio grande. La capacidad de transfección de los mismos resultó ser muy baja**: prácticamente nula para el caso de pADN y del 10% para el siARN en las condiciones estudiadas, posiblemente debido al diámetro de partícula elevado y/o al establecimiento de un gran número de interacciones entre los complejos, que daban lugar a la formación de agregados.

La baja toxicidad de este tipo de derivados dendríticos hace que su estudio como potenciales agentes de transfección esté justificado. No obstante, el polímero hiperramificado dendronizado objeto de este estudio ha mostrado unas características que conducen a una eficacia de transfección baja. **Como posible investigación futura** podría resultar interesante valorar la capacidad como agentes de transfección de otros derivados basados en dendrones de *bis*GMGA pero utilizando un polímero hiperramificado de menor tamaño, por ejemplo de generación 3, para que el tamaño de la molécula sea menor, y también su carga iónica. Esto podría disminuir en parte la capacidad de establecer interacciones con el ADN o las células, pero también con otras nanopartículas, evitando así la formación de agregados demasiado grandes.

## CONCLUSIONS

---

**It was synthesized a hyperbranched polymer functionalized with dendrons** derived from 2,2'-bis (glyciloxyethyl)propionic acid (*bis*GMGA) and ended in amino groups, which gives it positive charges. The number of dendrons that was grafting the structure of the hyperbranched polymer was high and the final derivative showed low polydispersity.

The dendron functionalized polymer presented **high levels of biocompatibility and the ability to form complexes** both with pDNA and siRNA, although high ratios were needed (200/1).

The complexes, at ratios in which all nucleic acid was carried, showed a **positive surface charge** and a **high diameter average. The transfection capacity was very low**: practically none for pDNA and 10 % for siRNA in the studied conditions, possibly due to the large particle diameter or the great number of interactions established between the complexes, which caused the formation of aggregates.

The low toxicity of this type of dendritic derivatives justifies its study as potential transfection agents. However, the dendronized hyperbranched polymer object of this study has characteristics that lead to a low transfection efficiency. **As possible research in the future** it might be interesting to assess the ability as transfection agents of other dendron-based derivatives of *bis*GMGA but using a lesser hyperbranched polymer, generation 3 for example, for the size of the molecule to be smaller, and also its ionic charge. This could reduce the ability to set interactions with DNA or cells, but also with other nanoparticles and, as a result, avoiding the formation of large aggregates.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Doane TL., Burda C., Cheng Y., et al. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41(7):2885.
2. American Society of Gene & Cell Therapy. <http://www.asgct.org/general-public/educational-resources/gene-therapy--and-cell-therapy-defined>. Accessed June 1, 2017.
3. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature.* 2015;526(7573):351
4. Nayerossadat N., Ali P., Maedeh T. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv.*

- Biomed. Res.* 2012;1(1):27.
5. John Wiley and sons. Wiley. <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>. Accessed June 12, 2017
  6. Yin H., Kanasty RL., Eltoukhy AA., Vegas AJ., Dorkin JR., Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* 2014;15(8):541.
  7. Abbasi E., Aval SF., Akbarzadeh A., et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res. Lett.* 2014;9(1):247.
  8. Zheng Y., Li S., Weng Z., Gao C. Hyperbranched polymers: advances from synthesis to applications. *Chem. Soc. Rev.* 2015;44(12):4091.
  9. Lederer A., Burchard W., Hartmann T., et al. Dendronized hyperbranched macromolecules: Soft matter with a novel type of segmental distribution. *Angew Chemie - Int. Ed.* 2015;54(43):12578.
  10. Leiro V., Duque Santos S., Lopes C.D.F., Paula Pêgo A. Dendrimers as Powerful Building Blocks in Central Nervous System Disease: Headed for Successful Nanomedicine. *Adv. Funct. Mater.* May 2017:1700313.
  11. Pack D.W., Hoffman A.S., Pun S., Stayton P.S. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2005;4(7):581.
  12. Liang W., W. Lam J.K. Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems. In: *Molecular Regulation of Endocytosis*; 2012.
  13. Zhang S., Li J., Lykotrafitis G., Bao G., Suresh S. Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv Mater.* 2009;21:419.
  14. Mintzer M.A., Grinstaff M.W. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chem. Soc. Rev.* 2011;40(1):173.
  15. Leiro V, Garcia JP, Tomás H., Pêgo A.P. The Present and the Future of Degradable Dendrimers and Derivatives in Theranostics. *Bioconjug. Chem.* 2015;26(7):1182.
  16. Duncan R., Izzo L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2005;57(15):2215.
  17. García-Gallego S., Nyström A.M., Malkoch M. Chemistry of multifunctional polymers based on bis-MPA and their cutting-edge applications. *Prog. Polym. Sci.* 2014;48:85-110.
  18. Lancelot A. Thesis "New dendritic derivatives for applications in nanomedicine: drug delivery" and gene transfection (2017).
  19. González-Pastor R. Tesis "Estudio de dendrímeros y nanopartículas de oro para su empleo en tratamientos antitumorales" (2017).
  20. Lancelot A., González-Pastor R., Concellón A., Sierra T., Martín-Duque P., Serrano J.L. DNA Transfection to Mesenchymal Stem Cells Using a Novel Type of Pseudodendrimer Based on 2,2-Bis(hydroxymethyl)propionic Acid. *Bioconjug. Chem.* 2017;28(4):1135.
  21. Fonseca A.C., Gil M.H., Simões PN. Biodegradable poly(ester amide)s - A remarkable opportunity for the biomedical area: Review on the synthesis, characterization and applications. *Prog. Polym. Sci.* 2014;39(7):1291.
  22. Reiser J., Zhang X-Y., Hemenway C.S., Mondal D., Pradhan L., La Russa V.F. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2005;5(12):1571.