Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca

UNIÓ EUROPEA
Fons Social Europeu

Memòria justificativa de recerca de les beques predoctorals per a la formació de personal investigador (FI)

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Títol del projecte ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Desenvolupament de vacunes peptídiques y dendrímers basats en polietilenglicol per al tractament del càncer

Dades de l'investigador (benficiari de l'ajut)

Nom
Lorena

Cognoms
Simón Gracia

Correu electrònic
lorena.simon@irbbarcelona.org

Dades del director del projecte

Nom
Fernando

Cognoms
Albericio Palomera

Correu electrònic
albericio@irbbarcelona.org

Dades de la universitat / centre al que s'està vinculat
Universitat de Barcelona

Número d'expedient

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
Vacunes, pèptids, dendrimers, polietilenglicol, cancer.

Data de presentació de la justificació
29-01-2010

Generalitat de Catalunya
Departament d'Innovació, Universitats i Empresa

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

El principal problema de les teràpies actuals contra el càncer es la baixa especificitat envers les cèl•lules tumorals, cosa que comporta gran quantitat d'efectes secundaris. Per això es important el desenvolupament de nous tipus de teràpies i sistemes d'alliberament efectius per als fàrmacs ja existents al mercat. En la immunoteràpia contra el càncer es pretén estimular el sistema immunològic per a eliminar les cèl•lules canceroses de manera selectiva. En aquest projecte s'han sintetitzat derivats de l'antigen peptídic de melanoma NY-ESO1 i s'ha estudiat la seva capacitat per a estimular el sistema immunològic com a vacunes contra el càncer. També s'han encapsulat el antígens peptídics en liposomes com a adjuvants i sistemes d'alliberament. De totes les variants peptídiques la que resultà més immunogènica fou la que contenia el grup palmitoil i el fragment toxoide tetànic en la seva estructura. La utilització de liposomes com a sistema adjuvant sembla una estratègia interessant per al disseny de vacunes contra el càncer donat que l'encapsulació del pèptid en liposomes va augmentar notablement la resposta immunològica de l'antigen.
Per altra banda, s'han desenvolupat dendrímers basats en polietilenglicol com a sistemes alliberadors de fàrmacs per al tractament de tumors. El polietilenglicol és àmpliament utilitzat com a sistema d'alliberament de fàrmacs degut a les seves interessants propietats, augment de la solubilitat i dels temps de residència en plasma, entre d'altres. La metodologia química descrita permet la diferenciació controlada de varies posicions en la superfície del dendrímer a més del creixement del dendrímer fins a una segona generació. S'ha sintetitzat la primera generació del dendrímer contenint el fàrmac antitumoral 5-fluorouracil i s'han realitzat estudis de citotoxicitat comprovant que l'activitat del nanoconjugat és del mateix ordre de magnitud que el 5-fluorouracil sense conjugar.

Resum en anglès(màxim 300 paraules)

The main problem of the current cancer therapies is the low specificity against tumour cells that can produce several side effects. For this reason is important the development of novel therapies and drug delivery systems for cancer treatment. Cancer immunotherapy attempts to stimulate the immune system to reject and destroy tumors in a selective manner. In this project we synthesized some derivatives of NY-ESO1 antigen peptide and we studied their capacity to stimulate immune system as a cancer vaccine. Herein we also describe the encapsulation of peptides in liposomes as adjuvant and delivery systems. The most immunogenic peptide was the one containing the palmitoil group and the tetanus toxoid fragment in its structure. The use of liposomes as adyuvant and delivery system seems an interesting strategy for the design of cancer vaccines due to the peptide encapsulation in liposomes enhanced remarkably the immunological response of the antigen. Moreover, we have developed a new type of dendritic polymers based on monodisperse polyethylene glycol (PEG) units. PEG moiety is widely used in drug delivery applications because of its interesting properties, increase of solubility and blood circulation times, among others. Our chemical methodology allows the controlled differentiation of several positions on the dendrimer´s surface and some first and second generation dendrimers are described.
A first generation dendrimer containing the antitumoral drug 5-fluorouracil5 was synthesized and some IC50 results shows the same magnitude order for the nanoconjugate and for the 5-FU without conjugation.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

Introducción General

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en los países desarrollados y a día de hoy no se dispone de una terapia totalmente efectiva para su tratamiento.
La terapia convencional del cáncer se basa en la cirugía, en fármacos con efectos tóxicos para las células en división y en la irradiación con rayos gamma. En los últimos años se han introducido algunas terapias biológicas. Éstas incluyen agentes que interfieren con los factores de crecimiento necesarios para la proliferación de las células malignas y agentes que bloquean la neovascularización del tumor[1]. El gran inconveniente de las terapias actuales es la incapacidad de conseguir un tratamiento selectivo para las células tumorales que no afecte a las células normales, lo que conlleva gran cantidad de efectos secundarios derivados de esta inespecificidad. Es por ello que se está dedicando un gran esfuerzo en el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales o de sistemas de liberación efectivos que disminuyan los efectos adversos y aumenten la efectividad de los fármacos que ya están en el mercado.

La memoria del proyecto se presenta en forma de dos capítulos. El objetivo del primer capítulo es el desarrollo de vacunas peptídicas para el tratamiento de cáncer y estudio de los liposomas como adyuvantes para el aumento de la respuesta inmune. El segundo capítulo se basa en el desarrollo de dendrímeros basados en polietilenglicol como sistemas liberadores de fármacos para el tratamiento de cáncer.

CAPÍTULO 1: DESARROLLO DE VACUNAS PEPTÍDICAS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

1. Introducción

La inmunoterapia contra el cáncer se entiende como la estimulación del sistema inmune para eliminar las de células tumorales. Se trata de una disciplina principalmente experimental que todavía no ha fructificado en terapias eficaces de uso general.
Los tratamientos inmunoterápicos del cáncer han generado grandes expectativas en los últimos años. La principal razón de este interés radica en el hecho de que las terapias actuales tienen graves efectos sobre las células normales en proliferación de los pacientes con cáncer. Como consecuencia de ello, el tratamiento del cáncer causa una importante morbimortalidad. Las respuestas inmunitarias a los tumores pueden ser específicas de los antígenos tumorales y no dañarían la mayor parte de las células normales. Por consiguiente, la inmunoterapia tiene el potencial de ser el tratamiento con mayor especificidad anti-tumoral. Además, los recientes avances en los mecanismos de control del sistema inmune, así como el descubrimiento de gran cantidad de antígenos asociados a tumores[2], aportan una gran esperanza en este tipo de tratamiento.

La inmunoterapia de los tumores está dirigida a aumentar las respuestas inmunitarias débiles frente a los tumores (inmunidad activa) o a administrar anticuerpos (inmunidad pasiva) o células T específicos de tumores, lo que constituye una forma de inmunidad adoptiva.

Los péptidos sintéticos ofrecen varias ventajas respecto a otras formas de vacunas. A continuación se describen algunas de éstas[3,4,5]:

- Grupos fosfato, lipídicos o carbohidratos pueden ser introducidos de forma controlada para mejorar la inmunogenicidad, estabilidad o solubilidad.
- Los péptidos son fácilmente caracterizados y purificados mediante técnicas analíticas bien establecidas como la cromatografía de líquidos y la espectrometría de masas.

- La producción a gran escala de péptidos definidos químicamente puede obtenerse de una forma económica.
- El almacenamiento de las preparaciones peptídicas resulta sencillo de manera que facilita su transporte y distribución.
- No existe riesgo de integración o recombinación genética, problema potencial de las vacunas de ADN.
- Las vacunas basadas en péptidos pueden ser diseñadas incluyendo múltiples epítopos de un patógeno o, en este caso, de una célula tumoral.
- Es posible un cambio racional de aminoácidos en la secuencia antigénica para conferir una respuesta inmune o aumentarla.
- La introducción de aminoácidos no naturales en las vacunas peptídicas permite el diseño de muchos compuestos para la mejora de la administración de vacunas y diseño racional de éstas.

El objetivo del trabajo es el diseño i la síntesis de péptidos que puedan ser utilizados como vacunas para el tratamiento del cáncer, así como el encapsulamiento de estos péptidos en liposomas para obtener un sistema adyuvante y de liberación de la vacuna. Se pretende también realizar una evaluación biológica de la capacidad inmunoestimulante de estos compuestos.

2. Síntesis del péptido NY-ESO-1

Como antígeno tumoral se eligió un fragmento de la proteína NY-ESO-1 comprendido entre los aminoácidos 87 y 111. NY-ESO-1 es un antígeno asociado a tumores que pertenece a la familia de antígenos onco-germinales[6]. Sólo se expresa en las células germinales testiculares y de ovario de adultos normales y en una gran variedad de tumores, como el de esófago, próstata, cabeza y cuello, pulmón, ovarios, pecho, estómago, melanoma, etc. Su expresión en tejidos normales se limita principalmente a testículos y ovarios[7]. Aproximadamente el 20-30% de los cánceres mencionados expresan esta proteína y cerca del 40-50% de los pacientes con tumores que expresan NY-ESO-1 desarrollan anticuerpos contra la misma[8]. Dicho antígeno es capaz de inducir una respuesta tanto humoral como celular por lo que resulta un buen candidato para una vacuna antitumoral[9].
Este péptido se sintetizó unido en su extremo C terminal a un epítopo de células T_H que pertenece a la región 830-844 del toxoide tetánico (TT) con la finalidad de aumentar la capacidad de estimulación del sistema inmunológico[10]. Entre el péptido NY-ESO-1 y el fragmento TT se acoplaron dos lisinas (KK) para favorecer así la proteólisis entre estas dos secuencias. La secuencia KK es reconocida por la Catepsina B, una proteasa relacionada con el procesamiento del antígeno[11]. Con la inserción de este dipéptido se facilita la conservación de los epítopos. Además, para facilitar su internalización en liposomas se le acopló un ácido palmítico en el extremo amino terminal. Para eliminar cargas en el antígeno peptídico que no están presentes en la proteína nativa de donde provienen las secuencias peptídicas[12] el extremo C terminal se encontraba en forma de amida y el extremo N terminal se acetiló en la variante a la que no se le acopló ácido palmítico.
Se sintetizó también el péptido NY-ESO-1-TT unido a carboxifluoresceina en el extremo amino terminal mediante enlace amida. La introducción de un grupo fluoróforo en el extremo del péptido es necesaria para el estudio de la captación e internalización del péptido por las células dendríticas mediante técnicas de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo.

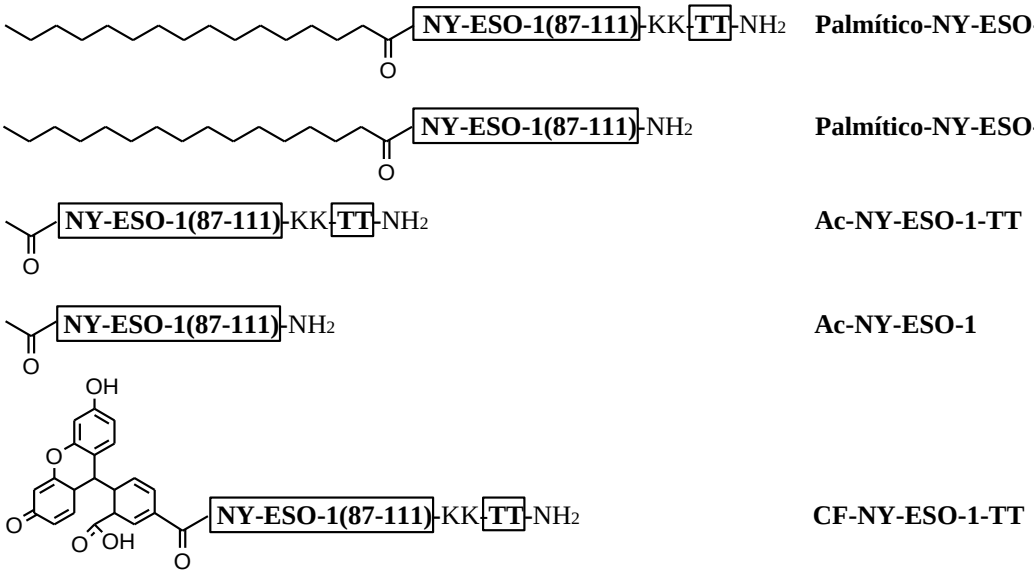

Fig.1. Esquema de las diferentes variantes del péptido NY-ESO-1 sintetizados

3. Ensayos biológicos para la determinación de la inmunogenicidad de NY-ESO-1

Las células dendríticas (DCs) son las principales células presentadoras de antígeno en mamíferos[13]. Esto las convierte en una herramienta potencialmente interesante para el tratamiento inmunológico del cáncer[14].

En el presente trabajo se estudió la capacidad de NY-ESO-1(87-111) de ser presentado por las células dendríticas, activarlas y producir como consecuencia una proliferación de linfocitos específicos para este antígeno. Los estudios se realizaron *ex vivo* obteniendo las células dendríticas a partir de sangre de donantes.

Con la finalidad de evaluar la influencia del ácido palmítico y el toxoide tetánico, los experimentos de proliferación se realizaron cargando las células dendríticas con los siguientes péptidos:

- **Palmítico-NY-ESO-1-TT**
- **Palmítico-NY-ESO-1**
- **Ac-NY-ESO-1-TT**
- **Ac-NY-ESO-1**

Aunque estos péptidos presentaban cierta inmunogenicidad comparado con el control negativo, ésta era muy baja, tal y como se observa en la **figura 3**. Estos resultados eran esperados ya que los péptidos sin la presencia de adyuvantes son poco inmunogénicos.

No obstante, la mayor proliferación se observaba con el péptido Palmítico-NY-ESO-1-TT, debido probablemente a dos factores principales: la presencia del fragmento de toxoide tatánico que actúa como estimulados de los linfocitos T_H y la presencia de ácido palmítico. Es posible que la presencia de un ácido graso saturado tenga un efecto adyuvante induciendo una mayor activación de las DCs. Se ha demostrado que las construcciones de lipopéptidos que combinan epítopos peptídicos de CTLs y de células T_H, pueden inducir una inmunidad más eficiente[15]. Existen estudios que demuestran que la adición de un grupo palmitoilo en una secuencia peptídico aumenta la respuesta de las células T_H[16]. El lipopéptido Pam_3CSS es un adyuvante molecularmente definido que contiene 3 unidades de palmítico y estimula la maduración de las DCs via *Toll-like receptor 2*[15]. El grupo palmitoilo del péptido **Palmítico-NY-ESO-1-TT** podría tener un efecto similar sobre las células dendríticas. Además, el ácido graso de cadena larga podría facilitar la captación del péptido por la célula dendrítica[17].

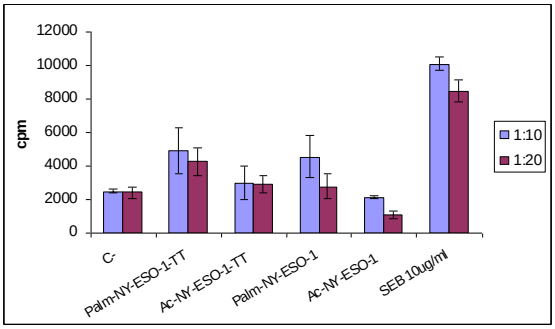

Fig.3. Resultados de la proliferación de linfocitos estimulando las DCs con los diferentes péptidos sintetizados. La cantidad de péptidos utilizada fue 10 µg/ml. Como control positivo se utilizó *Staphylococcus Endotoxin B* (SEB), 10 µg/ml. El control negativo no fue estimulado con ningun péptido. El ensayo se realizó utilizando una relación CDs: linfocitos de 1:10 (barras azules) y 1:20 (barras moradas).

Una vez confirmado que el péptido más inmunogénico era el **Palmítico-NY-ESO-1-TT**, se realizaron experimentos de proliferación de linfocitos con diferentes concentraciones de este péptido con la finalidad de determinar cuál era la cantidad óptima para el ensayo. Los resultados se muestran en la **figura 4**.

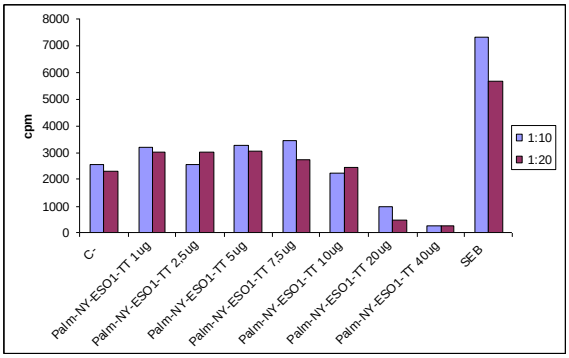

Fig.4. Resultados de la proliferación de linfocitos estimulando las DCs con Palmítico-NY-ESO-1-TT a diferentes concentraciones. La cantidad de péptido utilizada fue 1 µg/ml, 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 7.5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml y 40 µg/ml. Como control positivo se utilizó *Staphylococcus Endotoxin B* (SEB), 10 µg/ml. El control negativo no fue estimulado con ningun péptido. El ensayo se realizó utilizando una relación CDs: linfocitos de 1:10 (barras azules) y 1:20 (barras moradas).

De estos experimentos se pudo concluir que la concentración óptima del péptido **Palmítico-NY-ESO-1-TT** para la inducción de una adecuada respuesta linfocitaria por parte de las células dendríticas se encontraba entre 5 y 7,5 µg/ml. A concentraciones menores y mayores la respuesta inmunológica resultaba menor. A concentraciones superiores a 20 µg/ml el péptido resultaba tóxico para las DCs.

4. Utilización de liposomas como sistema adyuvante y de liberación del péptido.

Los liposomas son vesículas compuestas por bicapas lipídicas y que encapsulan un compartimiento acuoso en su interior. Se preparan a partir de fosfolípidos antipáticos similares a los que se encuentran en las membranas celulares y por ello son compuestos no tóxicos. Los liposomas han sido extensamente estudiados como sistemas de liberación controlada de fármacos debido a su capacidad para encapsular una gran variedad de moléculas que pueden asociarse con el compartimiento acuoso, la bicapa lipídica o la interfase. En 1974, Allison y Gregoriadis demostraron la efectividad de los liposomas como adyuvante inmunológico para la difteria toxoide[15]. Desde entonces, los liposomas han sido ampliamente estudiados como adyuvantes de vacunas. La capacidad adyuvante de los liposomas se debe a varios factores. Por una parte, los antígenos incorporados en liposomas presentan mayor resistencia a la degradación enzimática que da lugar a una mayor exposición del antígeno a las APCs después de la vacunación. Por otro lado, para antígenos asociados a membrana, las bicapas del liposoma proporcionan un entorno que promueve la conformación nativa de la proteína, y esta estabilización de la proteína es importante para la inducción de algunas respuestas inmunológicas. Además, el hecho de que contengan múltiples copias de los epítopos antigénicos y que mimeticen a los patógenos hace que el reconocimiento y la captación de los antígenos por las células fagocíticas se incremente[17,18,19]. Se ha comprobado que antígenos peptídicos encapsulados en liposomas estimulan la proliferación de linfocitos T e inducen una mayor respuesta específica de CTLs comparado con el antígeno soluble[20,21]. Mediante la combinación selectiva de los componentes

lipídicos utilizados en la formulación de los liposomas se puede conseguir una estabilidad controlada de la membrana del liposoma y una liberación selectiva de las sustancias encapsuladas bajo condiciones especiales del entorno. Existen, además, estrategias para aumentar la captación de los liposomas por las APCs que consisten en incluir ligandos específicos en la formulación del liposoma para receptores presentes en estas células[22,23].

En este trabajo, se prepararon liposomas con una composición lipídica que contenía fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilglicerol (PG) en una proporción molar 8:2 y una cantidad de péptido **Palmítico-NY-ESO-1-TT** del 1% molar respecto al lípido. La concentración de lípido total era de 3 mg/ml.

Los liposomas que contenían el péptido incorporado se separaron del péptido no encapsulado utilizando una columna de Sepharosa 4B. Mediante análisis de aminoácidos se determinó que la cantidad de péptido incorporado era aproximadamente de un 70% y la pérdida de péptido asociada al proceso de elaboración de los liposomas se estimó en un 18%.

Se realizaron experimentos de proliferación de linfocitos para determinar la capacidad adyuvante de los liposomas con el péptido encapsulado. En la **figura 5** se representan los resultados obtenidos.

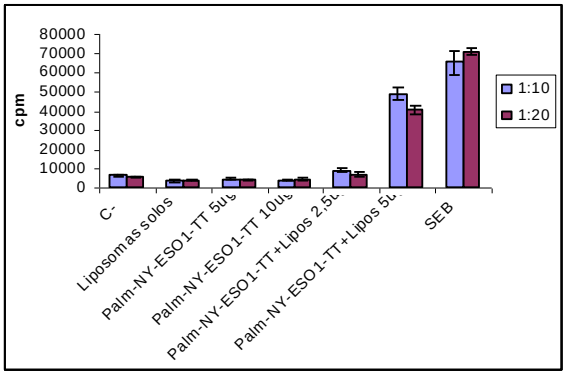

Fig.5. Resultados de la proliferación de linfocitos con el péptido Palmítico-NY-ESO-1-TT libre e incorporado en liposomas. La cantidad de péptido libre utilizada fue 5 µg/ml y 10 µg/ml. La cantidad utilizada de péptido incorporado en liposomas fue 2,5 µg/ml y 5 µg/ml. Como control positivo se utilizó *Staphylococcus Endotoxin B* (SEB), 5 µg/ml. El control negativo no fue estimulado con ningun péptido. El ensayo se realizó utilizando una relación CDs: linfocitos de 1:10 (barras azules) y 1:20 (barras moradas).

Los experimentos de proliferación confirmaron que el encapsulamiento del péptido en liposomas producía una mayor inducción de la proliferación de linfocitos T cuando las DCs eran cargadas utilizando concentraciones iguales o menores a las del péptido libre.
Por otro lado, los liposomas no mostraron un efecto inmunogénico por si solos.

5. Conclusiones

Las diferentes variantes del péptido **NY-ESO-1** sintetizadas no proporcionaron una respuesta inmunológica elevada. Este resultado era esperado, puesto que los péptidos por sí solos son moléculas poco inmunogénicas.

El péptido que contenía el grupo palmitoilo y el fragmento toxoide tetánico resultó ser el más inmunogénico de todos, demostrando que las vacunas peptídicas permiten la modificación de los antígenos naturales para la mejora de la administración y diseño racional de vacunas.

La encapsulación del péptido en liposomas aumentó notablemente la respuesta inmunológica del antígeno. De acuerdo con estos resultados, la utilización de liposomas parece ser una estrategia interesante para el diseño de sistemas adyuvantes que estimulen una respuesta inmunológica contra el cáncer.

CAPÍTULO 2: DENDRÍMEROS BASADOS EN POLIETILENGLICOL COMO SISTEMAS LIBERADORES DE FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

1. Introducción

Los dendrímeros son macromoléculas poliméricas compuestas por una serie de ramas que se extienden a partir de un núcleo central (o "core") formando una estructura tridimensional[24].
Este tipo de moléculas tiene gran cantidad de aplicaciones en el campo de la biomedicina, como por ejemplo, como agentes de contraste para diagnóstico con RMN, como vectores en terapia génica, como sistemas liberadores de fármacos, además de tener también aplicaciones en procesos industriales[25,26].
Los dendrímeros, y en general las macromoléculas, son buenos candidatos para la liberación de citoestáticos, a causa de su fuerte influencia en las propiedades farmacológicas. Podemos destacar dos ventajas respecto a otros sistemas de liberación: a) la solubilidad de los conjugados pueden ser aumentados con el uso de macromoléculas polares y b) la excreción renal puede reducirse dando lugar a mayores tiempos de circulación en el organismo.
El elevado peso molecular de las macromoléculas también hace que los citoestáticos conjugados tengan como diana preferente los tejidos tumorales antes que los sanos, disminuyendo así los posibles efectos secundarios. Éste es el llamado efecto de aumento en la permeabilidad y retención ("enhanced permeability and retention effect" o EPR). Esto es debido a que los vasos sanguíneos de los tejidos tumorales han crecido de forma rápida y anormal en forma y arquitectura, lo que los hace más permeables a moléculas más grandes[27].
El objetivo de este proyecto es el desarrollo de nuevos dendrímeros basados en polietilenglicol, la unión de estas plataformas a un fármaco formando así un nano-conjugado dendrímero-fármaco y el estudio de su aplicación como sistema liberador de dicho fármaco en el tratamiento de cáncer.

2. 5-Fluorouracilo

El 5-fluorouracilo (5-FU) es un antimetabolito que se utiliza en varios tipos de cáncer, como por ejemplo, en cáncer de colon, recto, seno, estómago, páncreas y también de piel. En este último caso se puede administrar de forma tópica mientras que en el resto de casos de forma sistémica[28].
Se consideró el 5-FU como un buen candidato para la conjugación a los dendrímeros ya que es un fármaco disponible comercialmente y fácilmente derivatizable debido a su pequeño tamaño y estructura relativamente sencilla.
Su mecanismo de acción radica en su similitud con el ácido nucleico uracilo, de manera que compite con éste por la unión con la enzima timidilato sintasa. El 5-fluorouracilo se une de forma irreversible con dicha enzima bloqueando la reacción de metilación del ácido desoxiuridílico e impidiendo de esta forma que se sintetice timidina, base nitrogenada esencial para la síntesis de ADN. De esta manera, las células con elevadas tasas de reproducción, como las tumorales, se ven más afectadas que las células que no están en crecimiento[29,30].
Aunque el 5-fluorouracilo es un fármaco antitumoral eficaz usado en quimioterapia para el cáncer colorectal avanzado y otros tumores sólidos, alrededor de un 9% de pacientes sufren de serios, y a veces fatales, efectos adversos en la terapia de 5-fluorouracilo, como hemotoxicidad, que no puede predecirse fácilmente con criterios clínicos y farmacocinéticas convencionales.
En general, la toxicidad relacionada con la administración de 5-FU incluye síntomas gastrointestinales, mielosupresión y, excepcionalmente (<1%), neurotoxicidad. Se estima que más de un 80% del 5-fluorouracilo administrado es eliminado a través de la ruta catabólica de las pirimidinas. La dihidropirimidina deshidrogenada (DPD) es la enzima limitante de esta degradación; de manera que el déficit o sobreexpresión de esta encima puede determinar de forma importante la toxicidad o eficacia del 5-fluorouracilo[31]. En los sujetos con déficit de DPD, la administración de 5-FU desencadena un cuadro similar al que tendría lugar en una situación de sobredosificación accidental, incluyendo fiebre (asociada a una marcada neutropenia), mucositis, estomatitis y diarrea. En los casos más graves aparecen complicaciones neurológicas tales como ataxia cerebelar, alteraciones de la función cognitiva y disminución del nivel de consciencia llegando a presentarse un estado comatoso e incluso la muerte[32].

El 5-fluorouracilo es solamente uno de los ejemplos entre los muchos fármacos antitumorales que presentan importantes efectos secundarios. Es por ello que es tan importante la búsqueda de nuevos sistemas de liberación que disminuyan estos efectos y aumenten la especificidad para este tipo de terapias.

3. Dendrímeros basados en PEG

Los dendrímeros basados en polietilenglicol (PEG) presentan grandes ventajas como son gran solubilidad con todo tipo de disolventes, especialmente en agua, una buena biocompatibilidad, baja toxicidad e inmunogenicidad, lo que los convierte en buenos candidatos para ser utilizados como sistemas de administración de fármacos[33]. Una ventaja adicional del tipo de dendrímeros que se han desarrollado en este proyecto, frente a otro tipo de polímeros o dendrímeros es su carácter completamente monodisperso al obtener el producto con un peso molecular único gracias al proceso sintético que se realiza para su obtención. Además permite explorar de modo controlado la diferenciación de los grupos funcionales de la superficie pudiendo obtener plataformas multifuncionales que permitieran introducir de modo controlado distintos fármacos, ligandos, fluoróforos, etc.
En el momento de iniciar el presente proyecto el grupo tenía a punto una síntesis de este tipo de compuestos. Esta síntesis que estaba especialmente pensada para la obtención de dendrímeros con todos los grupos funcionales equivalentes, daba resultados más erráticos cuando se intentaba tener algún punto diferenciado o al intentar obtener bloques de construcción que nos permitieran construir el dendrímero de modo convergente acelerando así el proceso de crecimiento del mismo. Con el fin de buscar una solución a este tipo de problemas, se planteó un nuevo proceso sintético del bloque de construcción del dendrímero, que contemplara la diferenciación controlada de la superficie desde el inicio y que se desarrollara con buenos rendimientos. Este proceso se basa en la construcción de la unidad ramificadora DPTA (ácido dietilentriaminpentaacetico) mediante un esquema sintético que permite disponer de los carboxílicos bloqueados con distintos grupos protectores que nos permitirán diferenciar desde el origen la superficie del dendrímero. Se ha explorado y desarrollado la síntesis de DPTA con dos puntos de diferenciación controlados con buenos rendimientos permitiéndonos obtener este compuesto a escala de más de 1 gramo y una pureza de más del 95%[34,35,36].
Una vez optimizada la obtención del DPTA se procedió a la síntesis de la primera generación del dendrímero manteniendo las dos posiciones diferenciadas que permite utilizarlo como bloque de construcción para la obtención de generaciones más elevadas. La incorporación de las cadenas de PEG se realiza mediante la utilización de PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol 1-iloxitris (pirrolidinio) fosfonio) como agente acoplante controlando el pH a 8 ya que ha sido de las condiciones exploradas la que da mejores rendimientos y buenas purezas en los crudos de reacción. Así, el dendrímero de primera generación se obtiene con un rendimiento del 88% y en una escala de aproximadamente 1 gramo.
Se ha comprobado también que en este dendrímero de generación 1, que a la vez es bloque de construcción para dendrímeros de generaciones más elevadas, se podían desproteger selectivamente los ácidos carboxílicos diferenciados mediante grupos protectores ortogonales con buenos rendimientos y purezas. Este paso es importante porque permite el crecimiento del dendrímero de modo fácil y con buenos rendimientos.
Se ha procedido también a explorar los pasos de crecimiento del dendrímero hacia generaciones superiores. Tomando el dendrímero de generación 2 como modelo, se han explorado las mismas condiciones de acoplamiento que rindieron de modo óptimo en el dendrímero de generación 1 dando resultados correctos, pero con impurezas difíciles de eliminar lo que no los convertía en recomendables para la realización del crecimiento del dendrímero. Con el fin de mejorar el rendimiento final y la pureza, se han estudiado otras condiciones encontrándose que la formación del ester pentafluofenilo (OPbf) en los bloques de construcción que se incorporan al dendrímero de generación 1 y su posterior acoplamiento a éste en medio básico (pH 8) es el mejor método que permite obtener dendrímeros de tallas superiores con mejores rendimientos y purezas.
En todos estos procesos sintéticos se han explorado métodos de purificación que permitieran obtener los distintos dendrímeros con alto rendimiento y buenas purezas. Las estrategias de purificación que han dado mejores resultados han sido una combinación de extracciones en medio básico y

precipitaciones, con purificaciones con alúmina básica en el caso que fuera necesario. Esto permite obtener los compuestos en cantidad suficiente y con elevadas purezas.
Estos compuestos se han caracterizado mediante MALDI, HPLC y RMN. También se han estudiado mediante cromatografía de exclusión en un sistema de HPLC acoplado a un detector de "light scattering" (MALS), lo que nos ha permitido corroborar lo observado en espectrometría de masas: que son compuestos de gran pureza y monodispersos, es decir, de peso molecular único.
Paralelamente a la optimización de la obtención de estos dendrímeros se ha explorado la incorporación en ellos de distintos marcadores fluorescentes como son la rhodamina (Rho) y fluoróforos basados en cianina (Cy5.5). Se han probado ambos fluoróforos para disponer de compuestos que emitan en distintos rangos y poder incorporar uno u otro según la necesidad. En un principio se escogió la Rhodamina B debido a que su longitud de onda máxima de emisión está por encima de 600 nm y esto nos permite obtener imágenes disminuyendo mucho los problemas de autofluorescencia. No obstante, se abandonó esta idea debido a la pérdida de fluorescencia del compuesto por la formación de la espirolactama a pH básico[37]. Por tanto, se decidió utilizar la sulforodhamina B, que presentaba gran estabilidad química y rango de emisión deseado, y derivatizarla para obtener un fluorocromo que se pudiese unir al dendrímero[15]. Ésta se tuvo que modificar convenientemente con una diamina monoprotegida (Boc-etilendiamina) para disponer de un grupo reactivo que pudiera reaccionar fácilmente con el ácido carboxílico del dendrímero y que fuera estable. La decisión de sintetizar este derivado y no utilizar el producto comercial fue debido al elevado coste de éste. Por otro lado se realizaron también pruebas de acoplamiento del producto comercial Rhodamina B Isotiocianato[38], dando pésimos resultados debido a que el producto que llegó tenía una pureza baja. Este hecho hizo más evidente la necesidad de sintetizar el derivado de sulforhodamina nosotros mismos.
Así, el derivado de sulforhodamina se obtenía mediante acoplamiento de la Boc-etilendiamina a la sulforhodmina B y posterior eliminación del grupo Boc con HCl en dioxano. Este derivado se incorpora al dendrímero a través del ácido carboxílico. Se ha explorado también la eliminación del grupo Boc que protegía las aminas de la superficie del dendrímero para determinar si la sulforhodamina era estable a estas condiciones observándose que mantenía su integridad química y espectral.
Para realizar los estudios de localización del dendrímero *in vivo* era necesario marcarlo con un fluoróforo cuya longitud de onda máxima de emisión estuviera por encima del de la Rhodamina B. Para ello se decidió marcarlo con el fluoróforo comercial de tipo cianina Cy5.5. Este fluoróforo se encontraba derivatizado en forma de ester de N-hidroxisuccinimida (Cy5.5 NHS éster) que reacciona de forma eficiente con los grupos amino a un pH entre 7 y 9. Para el marcaje del dendrímero de primera generación con el Cy5.5 se probaron varias estrategias y la que mejor resultó fue la unión del Cy5.5 NHS éster al dendrímero modificado previamente con una diamina en el grupo carboxílico para que reaccionase directamente con el grupo NHS mientras que los grupos amino de las ramas del dendrímero fueron acetilados previamente.

4. 5FU: derivatización y unión a G1

La unión del antitumoral 5-FU al dendrímero requería la previa derivatización del 5-FU para poder unirlo a los grupos amino de las ramas del dendrímero. Se eligió como primera estrategia la unión mediante un enlace ester entre las ramas de PEG del dendrímero y el 5-FU.
Se han descrito pro-fármacos del 5-fluorouracilo en los que el anillo está derivatizado en la posición del nitrógeno 3 (**Figura 6**). Estos pro-fármacos en forma de éster se hidrolizan y el alcohol resultante se transforma rápidamente en 5-fluorouracilo *in vivo*[39,40]. Para obtener este tipo de compuestos es necesario primero proteger la posición del N1 del anillo de 5-fluorouracilo ya que esta posición es mucho más reactiva que la posición 3. Así pues, el N1 se protegió con un grupo Z (benciloxicarbonilo) y posteriormente se hizo reaccionar con formaldehído y anhídrido succínico para poder unirlo a las aminas de las ramas del dendrímero mediante un enlace amida[41,42]. Una vez el fármaco se ha unido al dendrímero se elimina el grupo protector Z del 5-FU. La liberación del fármaco tiene lugar cuando el enlace éster del 5-FU se hidroliza quedando éste en forma de alcohol que descompone *in vivo* dando lugar al fármaco 5-FU libre.
El conjugado dendrimero-5FU se obtuvo con alto rendimiento y pureza a escala de 1 gramo.

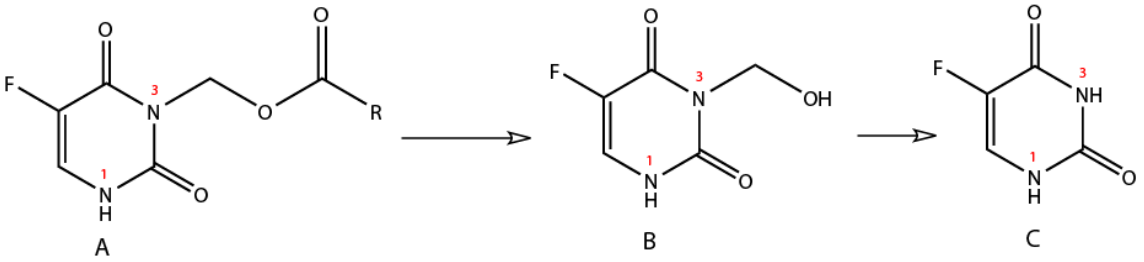

Figura 6: A) pro-fármaco del 5-fluorouracilo, B) pro-fármaco en forma de alcohol, C) fármaco 5-fluorouracilo

5. Citotoxicidad

Para determinar la actividad antitumoral de los conjugados dendrimero-5FU se realizaron ensayos de citotoxicidad *in vitro* mediante el ensayo con el reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.
Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo con las siguientes líneas celulares: HCT-116 (línea celular humana de cáncer de colon), HT-29 (línea celular humana de cáncer de colon) y LNCaP-Fluc (línea celular humana de adenocarcinoma de próstata, transfectadas con Luciferasa).
Para las líneas celulares HCT-116 y HT-29 se determinó la IC_{50} a los 3 y 6 días después de la adición del conjugado, mientras que para la línea celular LNCaP se determinó la IC_{50} a los 3 días después de la adición del conjugado.
La IC_{50} del fármaco 5FU y del conjugado dendrímero-fármaco (G1-5FU) fue del mismo orden de magnitud para las tres líneas celulares estudiadas. En las **figuras 7, 8** y **9** se muestran las curvas de IC_{50} para dichas líneas celulares.
Además, los controles del dendrímero sin fármaco (con las aminas libres y las aminas acetiladas) no resultaron tóxicos para las líneas celulares incluso a concentraciones superiores a las utilizadas para el conjugado. Este hecho nos demuestra que el dendrímero por si solo no resulta nocivo en las condiciones del experimento y que la actividad citotóxica es debido al fluorouracilo conjugado a los dendrímeros.

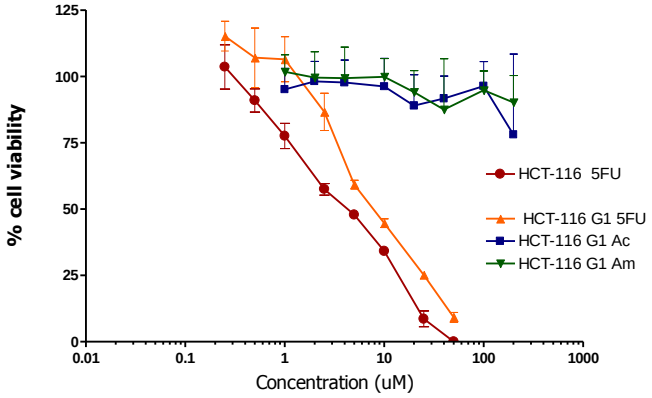

Figura 7: Valores de IC_{50} en la línea celular HCT-116:
5FU: 4,051 (3.620-4.532) µM
G1-5FU: 8,687 (7.430-10.16) µM
Control G1-Acetilado: No es tóxico
Control G1-aminas libres: No es tóxico.

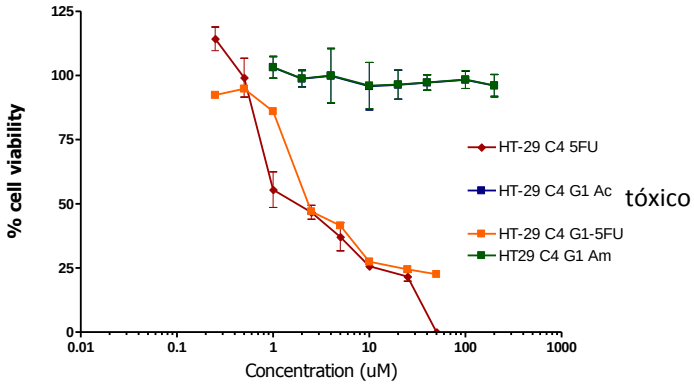

Figura 8: Valores de IC_{50} en la línea celular HT-29:
5FU: 4,844 (3.587 to 6.543) µM
G1-5FU: 10,03 (8.536 to 11.78) µM
Control G1-Acetilado: No es tóxico
Control G1-aminas libres: No es tóxico.

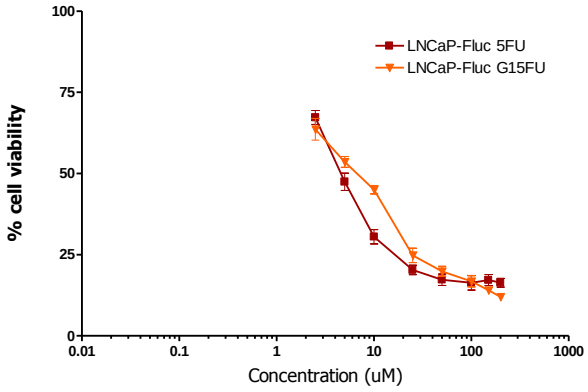

Figura 9: Valores de IC_{50} en la línea celular LNCaP:
5FU: 4,551 (3.735-5.545) µM
G1-5FU: 6,137 (5.654-6.662) µM

6. Conclusiones

- Se ha establecido un protocolo de síntesis de los sistemas dendríticos que permite su obtención de una manera eficiente con altos rendimientos y elevadas purezas. Los sistemas que se obtienen son de carácter monodisperso lo que facilita su caracterización y posteriores análisis y pueden ser de distintas tallas (generaciones). Disponer de este esquema de síntesis optimizado nos permitirá obtener los nanoconjugados con mayor rapidez.

- Se ha estudiado la incorporación de dos fluoróforos de distinto carácter (Sulforhodamina y Cy5.5) pudiendo encontrar condiciones óptimas para su incorporación al sistema dendrítico.

- Se ha obtenido de forma eficiente, con altos rendimientos y pureza el conjugado dendrímero-5FU y se han realizado ensayos de citotoxicidad *in vitro* que demuestran que la actividad del nano-conjugado dendrímero-5FU es del mismo orden de magnitud que el 5FU sin conjugar lo que sugiere que el fármaco 5-FU es liberado de forma eficiente.

BIBLIOGRAFIA

[1] Le Poole, I.C., *Expert Opinión Investig. Drugs*, **2003**, 12, 971.
[2]van der Bruggen, P., *Science*, **1991**, 254, 1643.
[3]W.Purcell, James McCluskey, *Nature Reviews,* **2007**, 6, 404-414.
[4]D.C.Jackson A.W.Purcell, *Curr. Drug Target*, **2002**, 3, 175-196.
[5]Céline Douat-Casassus, *American Chemical Society*, **2007** (doi:10.1021/jm0613368).
[6]Andrew I.Webb, A.W.Purcell, *The Journal of Biol. Chem*, **2004**, 279, 23438-23446.
[7]Shannon Bonds, *Journal of Immunotherapy*, **2001**, 24, 1-9.
[8]Gang Zeng, *Int. J. Cancer*, **2005**, 114, 268-273.
[9]Maja Mandic *et al*., *The Journal of Immunology*, **2005**, 174, 1751-1759.
[10]Murty V. Chengalvala, *Vaccine*, **1999**, 17, 1035-1041.
[11]Nishizawa, Toshiki (Tokyo, JP), **2004**, PCT/JP WO2004/087767 A1.
[12]Chkrabartty A, Doig AJ, *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1993**, 90, 11332-11336.
[13]E.Lazoura and Vasso Apostolopoulos, *Curr.Med.Chemistry*, **2005**, 12, 1481-1494.
[14]Owen Proudfoot, V.Apostolopoulos, *Molecular Pharmaceutics*, **2006**, 4, 58-72.
[15]Ming Tao Liang, *Current Drug Delivery*, **2006**, 3, 379-388.
[16]BenMohamed L, Gras-Masse H, *Eur J Immunol.*, **1997**, 5, 1242-53.
[17]J. Fernández-Carneado, E. Giralt, *J. Peptide Res*., **2005**, 65, 580–590.
[18]Sai T.Reddy, *Trends in Immunology*, **2006**, 27, 573-579.
[19]Paul J.Tacken, Carl G.Figdor, *Immunobiology*, **2006**, 211, 599–608.
[20]Joseph G.Altin, Christopher R.Parish, *Methods*, **2006**, 40, 39–52.
[21]Dhirendra Kumar Malik, Javed Ali, *Current Drug Delivery,* **2007,** 4, 141-151.
[22]Lee Leserman, *Journal of Liposome Research*, **2004**, 14, 175–189.
[23]Crispin R.Dass, Peter F.M.Choong, *Peptides*, **2006**, 27, 3020-3028.
[24] Crespo, Laia; Sanclimens, Gloria; Pons, Miquel; Giralt, Ernest; Royo, Miriam; Albericio, Fernando. *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)*, **2005**, 105(5), 1663-1681.
[25] Lee, C. C et al. *Nat. Biotechnol*., **2005**, 23, 1517-1526
[26] Tekade, R. K et al. *Chem. Rev*., **2009**, 109, 49-87
[27] Kapp, Timo; Francke, Peter; Gust, Ronald. *ChemMedChem.,* **2008**, 3(4), 635-641.
[28] Eng, Cathy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **2009**, 6(4), 207-218.
[29] Longley Daniel B; Harkin D Paul; Johnston Patrick G. *Nature reviews, Cancer*, **2003**, 3(5), 330-8
[30] Rich, Tyvin A.; Shepard, Robert C.; Mosley, Stephen T., *Journal of Clinical Oncology*, **2004**, 22(11), 2214-2232
[31] Lazar, A.; Jetter, A. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, **2008**, 133(28/29), 1501-1504.
[32] Sioka,Chrissa; Kyritsis, Athanassios P., *Cancer Chemotherapy and Pharmacology,* **2009**, 63(5), 761-767.
[33] Veronese, F. M. et al. *Drug Discov. Today*, **2005**, 10, 1451-1458
[34] Williams, Matthew A.; Rapoport, Henry. *Journal of Organic Chemistry*, **1993**, 58(5), 1151-8
[35] Anelli, Pier Lucio; Fedeli, Franco; Gazzotti, Ornella; Lattuada, Luciano; Lux, Giovanna; Rebasti, Fabrizio, *Bioconjugate Chemistry,* **1999**, 10(1), 137-140.
[36] Mallia, Madhava B.; Subramanian, Suresh; Banerjee, Sharmila; Sarma, H. D.; Venkatesh, Meera. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, 14(23), 7666-7670
[37] Mier, Walter; Beijer, Barbro; Graham, Keith; Hull, William E., Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2002**, 10(8), 2543-2552.
[38] Yang, Hua; Vasudevan, Sundar; Oriakhi, Christopher O.; Shields, Jay; Carter, Rich G., *Synthesis*, **2008**, (6), 957-961
[39] Menger, Fredric M.; Rourk, Michael J., *Journal of Organic Chemistry*, **1997**, 62(26), 9083-9088
[40] Taylor, H. Elizabeth; Sloan, Kenneth B., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1998**, 87(1), 15-20
[41] Toshio Nagase, Shoichiro Ozaki, *Chemistry Letters*, **1988,** 1381-1384
[42] Ozaki, Shoichiro, *Medicinal Research Reviews*, **1996**, 16(1), 51-86