



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Químicas -Programa de Doctorado en Ciencias con mención en
Química

**Síntesis, simulación molecular y aplicación de nuevos
dendrimeros en el transporte y liberación controlada de
fármacos anticancerígenos.**

**Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en
Química**

Luis Felipe Barraza Ramírez
CONCEPCIÓN-CHILE
2015

Profesor Guía: Joel Alderete Triviños
Dpto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad de Concepción



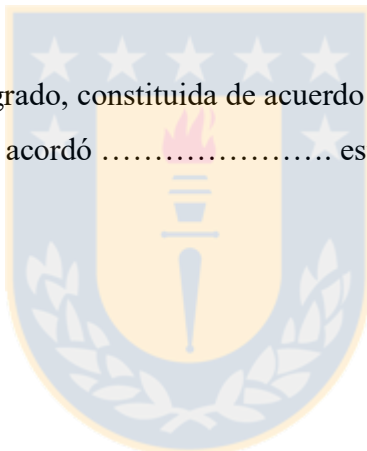
**Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Químicas
Escuela de graduados
Programa de doctorado en ciencias
con mención en Química**



EXAMEN DE GRADO

El día del año 2015, el Sr. Luis Felipe Barraza Ramírez rindió su examen de grado, presentando su tesis titulada **"Síntesis, simulación molecular y aplicación de nuevos dendrímeros en el transporte y liberación controlada de fármacos anticancerígenos"**.

La comisión de examen de grado, constituida de acuerdo al Art. 42 del Reglamento Normativo de la Escuela de Graduados, acordó este examen con la calificación



Dr. Joel Alderete Triviños

Profesor Guía

Dr. Julio Belmar Mellado.

Miembro de la comisión

Dr. Claudio Olea Azar.

Evaluator externo

Dr. Esteban Vöhringer-Martinez

Miembro de la comisión

Concepción, Octubre de 2015

Agradecimientos:

A mi profesor guía, el Dr. Joel Alderete, por apoyar el desarrollo de esta tesis en su laboratorio de investigación y por su espíritu crítico.

A la Dra. Verónica Jiménez, por su gran apoyo, confianza y amistad.

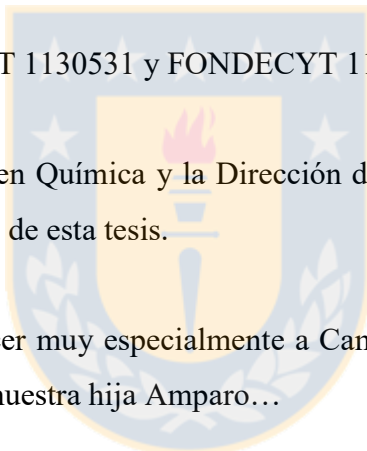
A mi compañeros de laboratorio, por su amistad y por hacer del trabajo diario una actividad llevadera y gratificante.

Al personal técnico de la Facultad de Ciencias Químicas por la gran ayuda prestada.

A los proyectos FONDECYT 1130531 y FONDECYT 1120250.

A la Escuela de graduados en Química y la Dirección de Postgrado por financiar actividades de difusión de los resultados de esta tesis.

Finalmente quisiera agradecer muy especialmente a Camila por su amor y por haberme dado el mejor regalo de mi vida, nuestra hija Amparo...



RESUMEN

En esta tesis doctoral se trabajó en el diseño racional de un nuevo sistema transportador de fármacos anticancerígenos basado en dendrímeros PAMAM pegilados (PEG-PAMAM). Se emplearon simulaciones de dinámica molecular (DM) en conjunto con métodos espectroscópicos (RMN, IR, UV-VIS) para investigar el efecto de la "pegilación" de un dendrímero PAMAM-G4 sobre sus propiedades estructurales y cómo estas influyen en su capacidad de complejación con dos de los fármacos más empleados actualmente en el tratamiento del cáncer, como son 5 fluorouracilo (5FU) y metotrexato (MTX).

Los resultados obtenidos a partir de las simulaciones de DM muestran fuertes dependencias en las estequiometrías de los complejos droga:dendrímero y sitios de interacción, con la naturaleza química de las drogas, sugiriendo que sólo la pegilación parcial del dendrímero ($\leq 50\%$) representa una estrategia sintética adecuada para maximizar su capacidad de complejación, ya que altos grados de pegilación conllevan a una disminución en la cantidad de droga complejada internamente. Estos resultados fueron confirmados experimentalmente mediante experimentos 2D-NOESY y perfiles de solubilidad en disolución acuosa. A partir de estos últimos, se calcularon constantes de afinidad droga:dendrímero $K_{n:l}$, cuyos valores sugieren que los complejos con MTX presentan una interacción fuerte y estable ($K_{n:l} \geq 10^4$), mientras que los complejos con 5FU presentan una interacción débil e inestable ($K_{n:l} \geq 10$).

Se investigó también el efecto de la pegilación sobre la cinética de liberación de ambas drogas mediante el método de diálisis en equilibrio. Los resultados obtenidos muestran que tanto MTX como 5FU siguen una cinética de liberación de primer orden, lo que es indicativo de un mecanismo de liberación controlado por difusión. Por otro lado, los valores de las constantes cinéticas obtenidas sugieren que altos grados de pegilación retardan la fuga de MTX desde los nanotransportadores, mientras que para 5FU se observó el efecto contrario, lo que se atribuyó a que en sistemas con altos grados de pegilación cerca del 90% de las moléculas de 5FU se encuentran complejadas con las cadenas de PEG, desde donde son liberadas con facilidad. Finalmente, se evaluó si la conjugación de un dendrímero PEG-PAMAM con el éster del ácido N-succinimidil-6-maleimidoheptanoico (MHA) permite obtener una liberación controlada de ambas drogas en condiciones de pH fisiológico (7.4) y una liberación acelerada en condiciones de pH similar a la existente en los espacios intersticiales de células cancerígenas ($\text{pH} \leq 5.0$). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en los perfiles de liberación producto de la conjugación con MHA, sin embargo los resultados recopilados durante el desarrollo de esta tesis pueden ser útiles para diseñar nuevos y más eficientes sistemas para la administración de fármacos anticancerígenos basados en dendrímeros PAMAM.

ABSTRACT

In this thesis the rational molecular design of a new drug delivery system for chemotherapy applications based on PEGylated PAMAM dendrimers (PEG-PAMAM) was carried out. In order to tackle these issues, fully atomistic molecular dynamics (MD) simulations together with spectroscopic measurements (RMN, IR, UV-VIS) has been performed to examine the PEGylation effect on the structure and drug loading properties of a fourth generation PAMAM dendrimer (PAMAM-G4), employing 5fluorouracil (5FU) and methotrexate as model anticancer drugs.

MD simulations revealed that the drug:dendrimer complex stoichiometry and supramolecular interaction sites present a strong dependence with the chemical nature of the drugs. In addition, MD simulations suggest that high PEGylation degrees lead to a decrease in the amount of the internally complexed drugs, appearing the partial PEGylation ($\leq 50\%$) as the most suitable synthetic strategy to maximize their drug complexation capabilities. These results were confirmed experimentally by 2D-NOESY experiments and solubility profiles in aqueous solution. From the latter, binding constants per binding site $K_{n:1}$ were estimated, the obtained values suggest that complexes with MTX exhibit a strong and stable interaction ($K_{n:1} \geq 10^4$), while complex with 5FU exhibit weak and unstable interactions ($K_{n:1} \geq 10$).

The PEGylation degree effects on the release kinetics of both drugs were also investigated by the equilibrium dialysis method. Results showed that release profiles for both drugs follow first-order kinetics, suggesting a diffusion-controlled mechanism for drug release. Furthermore, the first order kinetic constants suggest that higher PEGylation degrees induce a decrease in the MTX leakage from nanocarriers, while for 5FU an opposite effect was observed, which can be attributed to high amount of 5FU molecules complexed with PEG chains (close 90%), since where it were quickly released. Finally, a PEG-PAMAM dendrimer was conjugate with 6-maleimidohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (MHA) in order to evaluate if this strategy allows a controlled release of both drugs under physiological pH conditions (7.4) and an accelerated release on pH conditions like to the interstitial spaces of cancer cells ($\text{pH} \leq 5.0$). The results showed no difference between the release profiles of precursor PEG-PAMAM system and the new MHA-PEG-PAMAM system, however the results collected during the development of this thesis can be useful to design new and more efficient drug delivery systems for chemotherapy applications based on PAMAM dendrimers.

Índice general

Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Dendrímeros PAMAM y su aplicación en el transporte de fármacos.	2
1.2 Pegilación de los dendrímeros PAMAM.	4
1.3 Dendrímeros PAMAM pegilados como transportadores de fármacos anticancerígenos.....	5
1.4 Métodos de simulación molecular como herramienta para el diseño racional de sistemas transportadores de fármacos basados en dendrímeros PAMAM.	7
1.5 Liberación controlada de la carga farmacológica en función del pH.	10
1.6 Alcances de la investigación.....	11
1.7 Hipótesis	14
1.8 Objetivos.....	14
Capítulo 2: Metodología.....	15
2.1 Simulación Molecular.....	16
2.1.1 Construcción de los sistemas.....	16
Dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4.....	16
Complejos droga:dendrímero	17
2.1.2 Protocolo de simulación.....	18
2.1.3 Análisis de las simulaciones de DM.	19
Análisis estructural	19
Análisis de la interacción supramolecular en los complejos droga:dendrímero	20
2.2 Parte Experimental.....	22
2.2.1 Síntesis de dendrímeros PAMAM-G4 pegilados (PEG-PAMAM-G4).....	22
Activación de polietilenglicol metiléter.	22
Síntesis de dendrímeros PEG-PAMAM-G4 con distinto grado de pegilación.	22
2.2.2 Caracterización de dendrímeros PEG-PAMAM-G4.....	24
Masa molar y polidispersidad de dendrímeros PEG-PAMAM-G4.....	24
Cálculo del grado de pegilación y masa molar de dendrímeros PEG-PAMAM-G4. 24	
2.2.3 Evaluación de la capacidad de complejación de los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 con drogas anticancerígenas.....	25
Estudios de solubilidad de drogas anticancerígenas en disolución acuosa.	25
Determinación de sitios de interacción supramolecular droga:dendrímero.	25
2.2.4 Liberación de drogas anticancerígenas desde dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4.....	26
2.2.5 Síntesis y caracterización del nuevo sistema de liberación controlada MHA-PEG-PAMAM-G4.	27

2.2.6 Evaluación del efecto del pH en liberación de MTX y 5FU desde el nuevo sistema transportador MHA-PEG-PAMAM-G4.....	28
Capítulo 3: Resultados y discusión.....	30
3.1 Simulación Molecular.....	31
3.1.1 Efectos de la pegilación sobre la estructura de dendrímeros PAMAM.	31
3.1.2 Efectos de la pegilación sobre la capacidad de complejación de los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4.	38
Complejos 5FU:dendrímtero	38
Complejos MTX:dendrímtero	45
3.1.3 Fuerzas intermoleculares implicadas en la formación de complejos supramoleculares droga:dendrímtero.	50
Complejos 5FU:dendrímtero	50
Complejos MTX:dendrímtero	53
3.2 Parte Experimental.....	56
3.2.1 Síntesis de p-nitrofenil carbonato de pegilo (NFC-PEG).....	56
3.2.2 Síntesis y caracterización de dendrímeros PEG-PAMAM-G4.	58
3.2.3 Capacidad de los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 para complejar drogas anticancerígenas.....	61
3.2.4 Sitios de asociación supramolecular droga:dendrímtero.....	65
3.2.5 Estudios de liberación de la carga farmacológica desde los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4.	68
3.2.6 Síntesis y caracterización del nuevo sistema transportador MHA-PEG-PAMAM-G4.....	76
3.2.7 Efecto del pH en la liberación de la carga farmacológica de MTX y 5FU desde el dendrímtero PEG-PAMAM-G4 precursor y el nuevo sistema transportador MHA-PEG-PAMAM-G4.....	77
Capítulo 4: Conclusiones y proyecciones.....	81
4.1 Conclusiones.....	81
4.2 Proyecciones.	86
Bibliografía.....	87

Índice de Figuras

Figura 1: Estructura 2D de un dendrímero poli-amidoamina de cuarta generación (PAMAM-G4).	2
Figura 2: a) Liberación de 5FU desde PAMAM-G4 no pegilado (□) y pegilado (■). b) Diálisis de MTX libre (triángulos) y encapsulado en disolución de PAMAM-G4 pegilado (círculos). Los símbolos con relleno representan solución acuosa a pH 7.4 de baja fuerza iónica y los no coloreados representan soluciones a pH 7.4 de elevada fuerza iónica (NaCl 150 mmol L ⁻¹) ⁴⁰	6
Figura 3: Estructuras de los fármacos anticancerígenos en estudio, 5FU y MTX.	12
Figura 4: Estructura del éster del ácido N-succinimidil-6-maleimidohexanóico (MHA), que será empleado en la conjugación con los dendrímeros PEG-PAMAM-G4 para la formación de bolsillos hidrofóbicos sensibles a las condiciones de pH del medio.	12
Figura 5: Esquema general de los nuevos dendrímeros de liberación controlada, y del efecto que tendrían las condiciones de pH del medio sobre su estructura.	13
Figura 6: Esquema de la reacción para la síntesis de NFC-PEG.....	22
Figura 7: Esquema de la síntesis de dendrímeros PEG-PAMAM-G4.....	23
Figura 8: Esquema de la síntesis del nuevo dendrímero MHA-PEG-PAMAM-G4.....	28
Figura 9: Variación del radio de giro Rg (Å) de los sistemas transportadores en disolución acuosa durante los 20 ns de simulación de dinámica molecular NPT, a 1atm y 300 K.	31
Figura 10: Variación del radio de giro (Rg) con respecto a la masa molecular (M) para el dendrímero PAMAM-G4 y los sistemas pegilados.....	33
Figura 11: Función de distribución radial g (r) y estructuras representativas del fragmento PAMAM-G4 de los sistemas pegilados.....	34
Figura 12: Función de distribución radial g (r) de las cadenas de PEG en los sistemas pegilados y estructuras representativas de estos.....	35
Figura 13: Funciones de distribución radial de las moléculas de agua (a) y los contraiones (b) en función del centro de masas de los sistemas transportadores.	36
Figura 14: Estructuras representativas de los sistemas pegilados al 25% y 75% en disolución y distribución de iones cloruro (esferas verdes) y moléculas de agua (bolas rojas y blancas) hasta 21Å respecto del centro de masas del fragmento PAMAM-G4 (zoom)....	37
Figura 15: Distribución de moléculas de 5FU al inicio y al final de la simulación de DM para los complejos con PAMAM-G4 (a) y los sistemas pegilados al 25% (b) y 100% (c).	39

Figura 16: Evolución temporal del número total de moléculas de 5FU complejadas (N) con los dendrímeros PAMAM-G4 nativo y los sistema pegilados PEG-PAMAM-G4.	40
Figura 17: Perfiles de distribución radial de las moléculas de 5FU respecto del centro de masa de los transportadores en distintas etapas de la simulación de DM.	42
Figura 18: Distribución de moléculas de MTX al inicio y al final de la simulación de DM para los complejos con PAMAM-G4 (a) y los sistemas pegilados al 25% (b) y 100% (c).	46
Figura 19: Evolución temporal del número total de moléculas de MTX complejadas (N) con los dendrímeros PAMAM-G4 nativo y los sistema pegilados al 25% y 100%.	47
Figura 20: Perfiles de distribución radial de las moléculas de MTX respecto del centro de masa de los transportadores en distintas etapas de la simulación de DM.	48
Figura 21: Espectros IR para reactantes (NFC y PEG) y para el producto de la síntesis de p-nitrofenil carbonato de pegilo (NFC-PEG).	57
Figura 22: Espectro de ^1H -RMN (en CDCl_3) de PEG comercial y de NFC-PEG obtenido por síntesis.	57
Figura 23: Espectros IR del dendrímero PAMAM-G4 nativo y los sistemas pegilados sintetizados.	58
Figura 24: Espectros ^1H -RMN y asignación de las señales características de los sistemas PEG-PAMAM-G4.	60
Figura 25: Perfil de solubilidad para MTX en presencia de concentraciones crecientes de dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 a pH 7.0.	61
Figura 26: Perfil de solubilidad para 5FU en presencia de concentraciones crecientes de dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 a pH 7.0.	62
Figura 27: Espectro 2D-NOESY de los complejos supramoleculares formados entre MTX con PAMAM-G4 (a), 34%PEG-PAMAM-G4 (b) y 100%PEG-PAMAM-G4 (c) en D_2O	66
Figura 28: Perfiles de liberación de MTX desde PAMAM-G4 y los sistemas pegilados a 37°C , en una disolución de baja fuerza iónica [símbolos sin relleno □] y en una disolución de fuerza iónica fisiológica [símbolos con relleno ■].	69
Figura 29: Perfiles de liberación de desde 5FU PAMAM-G4 y los sistemas pegilados a 37°C , en una disolución de baja fuerza iónica [símbolos sin relleno □] y en una disolución de fuerza iónica fisiológica [símbolos con relleno ■].	70

Figura 30: Ajuste de los modelos cinéticos de primer orden y de Higuchi a los datos experimentales obtenidos para la liberación de MTX en condiciones de pH y fuerza iónica fisiológicas.....	73
Figura 31: Ajuste de los modelos cinéticos de primer orden y de Higuchi a los datos experimentales obtenidos para la liberación de 5FU en condiciones de pH y fuerza iónica fisiológicas.....	74
Figura 32: Espectros ^1H -RMN y asignación de las señales características del nuevo sistema transportador MHA-PEG-PAMAM-G4 cíclico y abierto, en DMSO d_6	77
Figura 33: Efecto del pH en el perfiles de liberación de 5FU y MTX desde el dendrímero PEG-PAMAM-G4 (precursor) y el nuevo sistema MHA-PEG-PAMAM-G4 a 37°C. La liberación de ambas drogas fue realizada en una disolución 10 mmol L^{-1} de tampón fosfato, (pH=7.4+ 150 mmol L^{-1} de NaCl) y en una disolución 10 mmol L^{-1} de tampón acetato, (pH=4.5+150 mmol L^{-1} de NaCl).	78



Índice de Tablas

Tabla 1: Características físicas y toxicidad observada de los dendrímeros PAMAM en función de su generación.	4
Tabla 2: Composición de los modelos moleculares contruidos para los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 en disolución acuosa a pH 7.....	17
Tabla 3: Composición de los modelos moleculares contruidos para los complejos droga:dendrímeros en disolución acuosa a pH 7.....	18
Tabla 4: Cantidades de reactantes y solvente utilizada en la síntesis de dendrímeros PEG-PAMAM-G4 con distinto grado de pegilación.	23
Tabla 5: Radios de giro promedio (R_g) de los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4, obtenidos a partir de 20ns de simulaciones de dinámica molecular.....	32
Tabla 6: Estequiometrías droga:dendrímero promedio, obtenidas a partir de los últimos 5ns de simulación de Dinámica Molecular (DM) para los complejos 5FU:PAMAM-G4 y 5FU:PEG-PAMAM-G4	43
Tabla 7: Estequiometrías droga:dendrímero promedio obtenidas a partir de los últimos 5ns de simulación de Dinámica Molecular (DM) para los complejos MTX:PAMAM-G4, MTX:25%PEG-PAMAM-G4 y MTX:100%PEG-PAMAM-G4.....	48
Tabla 8: Energías de interacción promedio (kcal mol^{-1}), para los complejos supramoleculares 5FU:PAMAM-G4 y 5FU-PEG-PAMAM-G4, obtenidas a partir de los últimos 5 ns de simulación de dinámica molecular.....	51
Tabla 9: Principales interacciones de enlace de hidrógeno encontradas para los complejos supramoleculares droga-dendrímero formados entre 5FU con el dendrímero PAMAM-G4 y los sistemas pegilados, obtenidas a partir de los últimos 5 ns de simulación de dinámica molecular.....	52
Tabla 10: Energías de interacción promedio (kcal mol^{-1}), para los complejos supramoleculares MTX:PAMAM-G4, MTX:25%PEG-PAMAM-G4 y MTX:100%PEG-PAMAM-G4, obtenidas a partir de los últimos 5 ns de simulación de dinámica molecular.....	53
Tabla 11: Principales interacciones de enlace de hidrógeno encontradas para los complejos supramoleculares droga-dendrímero formados entre MTX con el dendrímero PAMAM-G4 y los sistemas pegilados, obtenidas a partir de los últimos 5 ns de simulación de Dinámica Molecular.....	54

Tabla 12: Caracterización de los dendrímeros PEG-PAMAM-G4.	59
Tabla 13: Estequiometrías promedio y constantes de estabilidad por sitio de interacción $K_{n:1}$ ($\text{mol}^{-1} \text{ L}$) para los complejos supramoleculares formados entre MTX y 5FU con el dendrímero PAMAM-G4 y los sistemas pegilados en disolución acuosa, a temperatura ambiente y $\text{pH} = 7.0$	64
Tabla 14: Constantes cinéticas y coeficientes de correlación (R^2) para la liberación de MTX y 5FU desde PAMAM-G4 y los sistemas pegilados, obtenidos a partir del modelo de liberación de primer orden y el modelo de Higuchi.	72
Tabla 15: Constantes cinéticas de primer orden (k) y coeficientes de determinación (R^2) para la liberación de MTX y 5FU desde PEG-PAMAM-G4 (precursor) y el nuevo sistema MHA-PEG-PAMAM-G4. Los ensayos fueron realizados a $\text{pH} 7.4$ y 4.5 y a una temperatura constante de 37°C	79



Introducción

Las drogas anticancerígenas utilizadas en la quimioterapia corresponden generalmente a moléculas de baja masa molar, por lo que presentan una corta vida media en circulación, además de presentar una baja solubilidad y biodisponibilidad. En consecuencia, para que el tratamiento sea efectivo las dosis suministradas deben ser necesariamente elevadas, lo que conlleva a una descontrolada muerte celular debido al efecto citotóxico que ejercen estas drogas a nivel fisiológico. En este sentido, el uso de sistemas transportadores que aislen a la droga del entorno biológico, mejoren su solubilidad y biodisponibilidad, y que además permitan una liberación controlada y sostenida de la carga farmacológica en las cercanías de las células cancerosas representa una gran oportunidad para disminuir los efectos secundarios de la quimioterapia del cáncer.

Los sistemas transportadores de fármacos utilizados en la actualidad corresponden a especies de variada naturaleza química, entre los que se encuentran micelas¹, ciclodextrinas², péptidos³, liposomas⁴, polímeros⁵ y dendrímeros⁶. Entre ellos, en las últimas décadas los dendrímeros han llamado la atención de la comunidad científica debido a que presentan características particulares y beneficiosas para su aplicación como sistemas transportadores de fármacos, entre las que destacan su nanoestructura altamente ramificada y definida, monodispersidad, buena biocompatibilidad y una superficie multivalente que permite una fácil conjugación con moléculas bioactivas⁷⁻⁹.

Entre la amplia variedad de dendrímeros existentes, los más estudiados en el campo de la asociación con fármacos anticancerígenos son los del tipo poli-amidoamina (PAMAM)¹⁰, los que han demostrado ser capaces de mejorar la solubilidad y la biodisponibilidad de drogas poco solubles en disolución acuosa, prolongar el tiempo de residencia del fármaco en el plasma sanguíneo, protegerlo del entorno biológico, así como también, aumentar la permeabilidad de estos fármacos a través de monocapas celulares^{11,12}. Por todas estas razones, los dendrímeros PAMAM representan una gran alternativa como sistemas para la administración de fármacos contra el cáncer, y su estudio es en la actualidad una de las líneas de investigación más activas en el campo de la nanotecnología con aplicaciones biomédicas y farmacéuticas^{6,9,13-15}.

1.1 Dendrimeros PAMAM y su aplicación en el transporte de fármacos.

Los dendrimeros PAMAM están constituidos por un núcleo central correspondiente a una etilendiamina, desde el cual emergen unidades repetitivas denominadas "ramas" que culminan con grupos amino terciarios^{10,16}. Estas ramificaciones crecen de manera uniforme formando una capa homocéntrica denominada generación (Gn) hasta llegar a la superficie del dendrímoro donde se encuentran grupos amino primarios [Figura 1]. Debido a la presencia de los grupos amino terciarios interiores y los grupos amino primarios superficiales, la estructura y dinámica de los dendrimeros PAMAM en disolución se ve fuertemente influenciada por el pH del medio, pudiendo mostrar distintos estados de protonación, los que determinan gran parte de sus propiedades y aplicaciones¹⁷⁻¹⁹. Por ejemplo, en condiciones de pH fisiológico (pH=7.4) las aminas primarias superficiales se encuentran protonadas (pKa 9.4-9.7), mientras que las aminas terciarias se encuentran en estado neutro (pKa 3-6)²⁰.

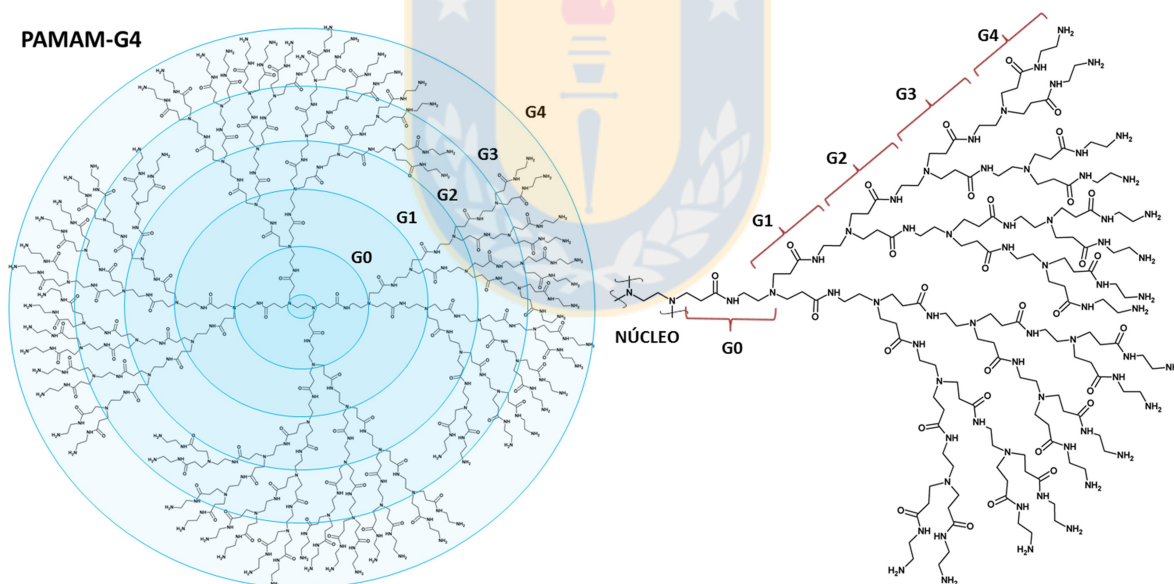


Figura 1: Estructura 2D de un dendrímoro poli-amidoamina de cuarta generación (PAMAM-G4).

Como sistemas transportadores de fármacos los dendrimeros PAMAM han sido empleados bajo dos aproximaciones, estas son: formando conjugados droga-dendrímoro²¹⁻²³ o formando complejos supramoleculares droga-dendrímoro²⁴⁻²⁷. En el primer caso la droga es unida covalentemente a la superficie del dendrímoro, mientras que en el segundo caso, las

moléculas de fármaco son encapsuladas físicamente ya sea en las cavidades internas del dendrímero o interaccionando con los grupos amino superficiales, donde las drogas son estabilizadas mediante fuerzas intermoleculares como enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones electrostáticas^{24,28}.

Los complejos supramoleculares formados entre los dendrímeros PAMAM y drogas de distinta naturaleza, han mostrado mejoras importantes en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos utilizados, tales como la velocidad de disolución, solubilidad en disolución acuosa, biodisponibilidad y estabilidad bajo condiciones fisiológicas^{7,29,30}. El uso de dendrímeros PAMAM también ha ayudado a superar problemas de toxicidad propios de algunas drogas mediante su aislamiento del entorno biológico, lo que es particularmente útil para el uso de estos dendrímeros como sistemas de administración de fármacos contra el cáncer, ya que podrían permitir la reducción de la dosis de fármaco suministrada, y en consecuencia, reducir los efectos secundarios de la quimioterapia. Sin embargo, en condiciones fisiológicas los dendrímeros PAMAM presentan algunos problemas, como una corta vida media en circulación, toxicidad hemolítica y citotoxicidad, lo que limita sus aplicaciones en sistemas biológicos³¹.

Los efectos citotóxicos mostrados por los dendrímeros PAMAM han sido atribuidos a la alta densidad de carga superficial positiva que presentan en condiciones de pH fisiológicas producto de la protonación de sus grupos amino primarios periféricos, los que al interaccionar con las membranas celulares cargadas negativamente provocan la ruptura de la membrana celular, lo que finalmente conllevan a la muerte de la célula^{32,33}. En este sentido, a pesar de producirse un aumento considerable en la carga farmacológica a medida que aumenta la generación del dendrímero, la toxicidad de los dendrímeros PAMAM se hace evidente aún en bajas concentraciones debido al incremento exponencial de sus grupos amino protonados superficiales [Tabla1]. Por lo tanto, para que estos dendrímeros tengan una oportunidad real de uso clínico, primero deben superar los problemas de toxicidad asociados a su carga superficial. En este sentido, la modificación de la superficie de los dendrímeros PAMAM por grupos que a pH fisiológico se encuentren en estado neutro o en forma de aniones, reduce la citotoxicidad inherente de estos sistemas^{34,35}.

Tabla 1: Características físicas y toxicidad observada de los dendrímeros PAMAM en función de su generación.

Generación	Masa Molecular (g/mol)	Diámetro (nm)	Grupos amino superficiales	Toxicidad observada
0	517	1.6	4	-
1	1430	2.2	8	-
2	3256	2.9	16	Citotóxico a $[] > [0.7 \text{ mmol L}^{-1}]^{32}$
3	6909	3.6	32	Citotóxico en el rango de $[0.01-0.1 \text{ mmol L}^{-1}]^{32}$. Toxicidad hemolítica a $[] > [1 \text{ mg/mL}]^{30}$
4	14215	4.5	64	Citotóxico en el rango de $[0.01-0.1 \text{ mmol L}^{-1}]^{32}$. 18% de toxicidad hemolítica.

1.2 Pegilación de los dendrímeros PAMAM.

Entre las variadas alternativas de modificación superficial que apuntan a disminuir la toxicidad de los dendrímeros PAMAM se encuentra la conjugación con cadenas de polietilenglicol (PEG), estrategia denominada pegilación^{36,37}. En un trabajo de Bhadra y colaboradores se estudió el efecto de la pegilación como un medio para reducir la toxicidad hemolítica producida por un dendrímero PAMAM de la cuarta generación (PAMAM-G4), estudio en el que se encontró una reducción significativa de la toxicidad hemolítica³⁸. Por su parte, Jevprasesphant y colaboradores examinaron el efecto de la pegilación sobre la citotoxicidad de este mismo sistema (PAMAM-G4) encontrando una clara disminución de la muerte celular respecto al dendrímero sin pegar³². Por otro lado, un estudio sistemático respecto de los efectos de la pegilación sobre la citotoxicidad de dendrímeros PAMAM realizado por Kim y su grupo, mostró que en general, un aumento en el grado de pegilación trae consigo una disminución de la toxicidad de estos sistemas³⁶.

Además de reducir la toxicidad de los dendrímeros PAMAM, la pegilación aporta nuevas propiedades a estos sistemas, las que potencian su aplicabilidad como sistemas para la administración de drogas anticancerígenas, tales como mejorar la eficiencia de encapsulación, aumentar los tiempos de circulación de las drogas en el plasma sanguíneo,

disminuir el riesgo de opsonización, permitir una liberación más controlada de la carga farmacológica³⁸⁻⁴⁰, además de favorecer la acumulación del agente quimioterapéutico en células cancerígenas a través de un fenómeno conocido como efecto EPR^{41,42} (Enhance Permeability and Retention).

1.3 Dendrímeros PAMAM pegilados como transportadores de fármacos anticancerígenos.

Debido a los grandes beneficios que trae consigo la pegilación de dendrímeros PAMAM es que en los últimos quince años los trabajos dirigidos en estudiar la asociación de drogas anticancerígenas con dendrímeros PAMAM pegilados (PEG-PAMAM) ha ido en aumento⁴³⁻⁴⁵. En el año 2000, Kojima y colaboradores estudiaron la capacidad de encapsulación de dendrímeros PEG-PAMAM empleando dos drogas anticancerígenas, Adiamicina (AD) y Metotrexato (MTX)⁴⁶. En este trabajo los autores evaluaron el efecto de la generación del dendrímero y el largo de cadena de PEG, utilizando dendrímeros PAMAM-G3 y PAMAM-G4, los cuales fueron pegilados en un 100% empleando largos de cadena de 550 g/mol y 2000 g/mol. Los resultados mostraron un aumento en la capacidad de encapsulación para ambos fármacos cuando se utilizó el dendrímero de mayor generación (PAMAM-G4) y la cadena de PEG de mayor masa molecular (2000 g/mol). El sistema que mostró la mejor eficiencia en la encapsulación de ambos fármacos logró complejar en promedio 6.5 moléculas de AD y 26 moléculas de MTX. Sin embargo, al no ser contrarrestada la capacidad de complejación de los dendrímeros PEG-PAMAM con los dendrímeros PAMAM sin pegilar, no es posible evaluar el efecto de la pegilación sobre la cantidad de droga complejada. En este sentido, en 2010 Jiang reportó la complejación de MTX en un dendrímero PAMAM-G4 y dendrímeros PEG-PAMAM-G4 con grados de pegilación del 17%, 33% y 43%, donde se emplearon cadenas de PEG de 5000 g/mol⁴⁷. Los resultados mostraron un incremento sostenido de la capacidad de complejación con el aumento del grado de pegilación, lo que sugiere que altos grados de pegilación conllevan a una mayor capacidad de complejación. Sin embargo, al no ser considerados grados de pegilación mayores al 43%, desde los resultados obtenidos en este trabajo, no es posible extrapolar la existencia de un grado de pegilación que optimice la complejación de drogas anticancerígenas, lo que hasta la fecha sigue siendo una interrogante a resolver.

En cuanto al efecto que tiene la pegilación de dendrímeros PAMAM sobre la liberación de drogas anticancerígenas, Bhadra y colaboradores reportaron que los dendrímeros PEG-PAMAM con cadenas de 5000 g/mol logran retener más eficientemente la carga farmacológica de 5 fluorouracilo (5FU) respecto de los dendrímeros PAMAM sin pegar, considerando como medio de liberación una disolución acuosa y pH neutro [Figura 2 a]³⁸. Sin embargo, en los trabajos de Kojima y Jiang citados anteriormente, se encontró que cuando los complejos droga-dendrímero son expuestos a un medio de fuerza iónica similar a la que se encuentra en el plasma sanguíneo (150 mmol L⁻¹ de NaCl), altos porcentajes de la droga complejadas (>75%) son liberados desde los dendrímeros antes de las 6 horas de análisis, independientemente del grado de pegilación [Figura 2b], lo que limitaría la acumulación de la droga en el sitio de acción farmacológica^{40,47}. Por lo tanto, a pesar de las ventajas que conlleva la pegilación de dendrímeros PAMAM, la rápida liberación de la droga complejada en condiciones de pH y salinidad fisiológicas, sugiere la necesidad de diseñar un sistema transportador de fármacos que reúna todas las propiedades de los dendrímeros PEG-PAMAM, pero que logre superar el limitado poder de retención de la carga farmacológica que estos sistemas han mostrado en condiciones fisiológicas.

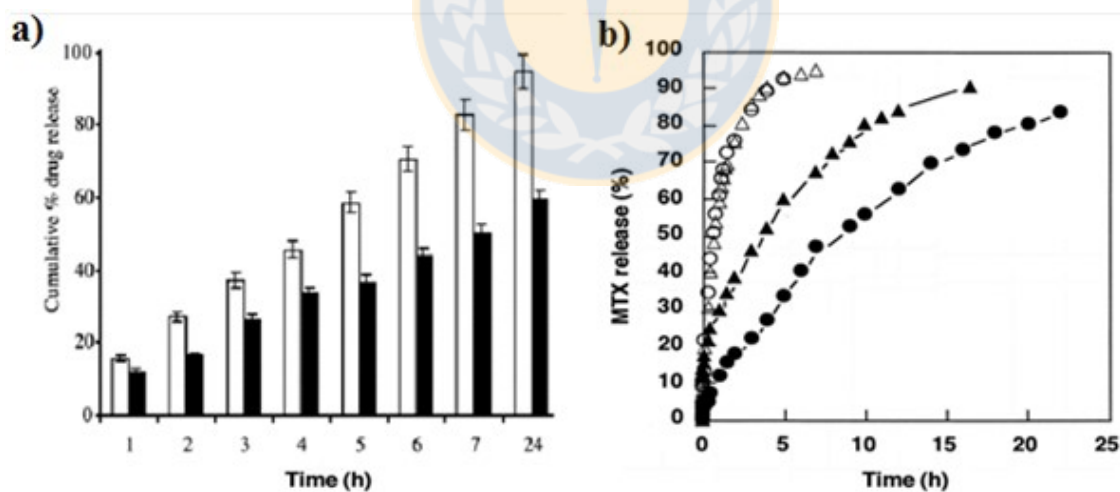


Figura 2: a) Liberación de 5FU desde PAMAM-G4 no pegilado (□) y pegilado (■)³⁸. b) Diálisis de MTX libre (triángulos) y encapsulado en disolución de PAMAM-G4 pegilado (círculos). Los símbolos con relleno representan solución acuosa a pH 7.4 de baja fuerza iónica y los no coloreados representan soluciones a pH 7.4 de elevada fuerza iónica (NaCl 150 mmol L⁻¹)⁴⁰.

Para hacer frente a esta problemática, los métodos de simulación molecular representan una herramienta valiosa, ya que permiten obtener una comprensión a nivel atómico acerca del proceso de formación de complejos supramoleculares droga:dendrímico, además de proveer información acerca de aspecto estructurales y dinámicos que conlleva la modificación superficial de los dendrímico PAMAM, lo que podría guiar el diseño racional y optimización de nuevos sistemas de liberación controlada basado en dendrímicos PEG-PAMAM, reduciendo considerablemente el número de ensayos experimentales y los costos asociados a dichos ensayos⁴⁸.

1.4 Métodos de simulación molecular como herramienta para el diseño racional de sistemas transportadores de fármacos basados en dendrímicos PAMAM.

Los métodos de simulación molecular han demostrado ser una poderosa herramienta para estudiar las propiedades macroscópicas de las moléculas y sus interacciones a escala atómico-molecular. La información desprendida desde los métodos de simulación molecular puede ser de gran utilidad para optimizar las propiedades estructurales de un sistema molecular, y específicamente, en el caso de los sistemas transportadores de fármacos, esta información podría ser de utilidad para realizar un diseño racional de nuevos sistemas transportadores con propiedades mejoradas. En este sentido, estudios de simulación molecular han apoyado el trabajo experimental proporcionando información sobre la estructura y dinámica de dendrímicos en disolución, además de aportar una visión molecular acerca de las interacciones de estos sistemas con moléculas de distinta naturaleza⁴⁹.

Entre los variados métodos de simulación molecular existentes, la dinámica molecular (DM) ha sido ampliamente empleada durante los últimos 20 años para describir aspectos estructurales y propiedades dinámicas de dendrímicos PAMAM en disolución a distintas condiciones de pH y fuerza iónica, mostrando una excelente correlación con datos experimentales obtenidos a partir de experimentos SANS, SAXS, RMN, entre otros⁵⁰⁻⁵³. Sin embargo, el uso de simulaciones de DM para estudiar los fenómenos implicados en el proceso de complejación de drogas con dendrímicos sigue siendo un tema en desarrollo. Por lo tanto, los trabajos dirigidos a describir las interacciones presentes en la formación de complejos droga-dendrímico, y aquellos enfocados a la estimación de energías de

interacción en estos sistemas, representan hoy en día una de las líneas de investigación más activas en el campo de las aplicaciones biomédicas y farmacéuticas de los dendrímeros PAMAM, ya que estos factores son los que regulan la afinidad entre el dendrímero y la droga de interés, sirviendo como guía para el diseño de nuevos transportadores más eficientes.

Entre los trabajos dirigidos a abordar el fenómeno de formación de complejos droga-dendrímero, algunos han optado por insertar arbitrariamente la droga dentro de las cavidades hidrofóbicas del dendrímero, para luego obtener estructuras de mínimo a partir de un docking molecular. Posteriormente las mejores conformaciones obtenidas se han empleado como punto de partida para realizar simulaciones de DM. Finalmente se han realizado cálculos de energía libre de interacción mediante el método MM-GBSA, tal como se ha descrito para los complejos supramoleculares formados entre PAMAM-G5 nativo y acetilado con dexametasona 21-fosfato (Dp21)⁵⁴, tramadol y morfina⁵⁵. Otros autores han reportado el uso de métodos como PMF (potencial of mean force) y ABF (adaptive biasing force) para obtener perfiles de energía libre de interacción entre los dendrímeros PAMAM y moléculas de fármaco bajo diferentes condiciones de pH, como se ha descrito para la complejación de ácido nicotínico con PAMAM-G3⁵⁶ o la interacción entre PAMAM-G4 y el péptido de lisina-flanqueado (KALP)⁵⁷. Sin embargo, estos enfoques consideran solo la interacción entre una molécula de fármaco con el dendrímero, aproximación que está lejos de representar las estequiometrías experimentales reportadas para este tipo de complejos supramoleculares, los que se caracterizan por presentar estequiometrías droga:dendrímero del tipo $n:1$ (donde $n>1$).

Con el propósito de hacer frente a esta problemática, se ha reportado una tercera aproximación para estudiar la formación de complejos droga-dendrímero considerando condiciones experimentales. En esta aproximación se considera un exceso de fármaco respecto de la concentración del dendrímero. Ejemplos de esta metodología han sido reportados para la asociación entre PAMAM-G3 con ibuprofeno⁵⁸, piroxicam²⁸ y ácido mefenámico²⁴. En estos reportes los autores consideraron un exceso de droga igual al número de grupos superficiales del dendrímero (32 en el caso de PAMAM-G3). Los resultados reportados por el uso de esta metodología han mostrado una buena correlación

entre los valores de las estequiometrías droga:dendrúmero estimadas a partir de las simulaciones de DM con datos experimentales obtenidos a partir de perfiles de solubilidad en disolución acuosa. Adicionalmente, este enfoque ha mostrado un buen nivel de acuerdo entre los sitios de interacción supramolecular detectados respecto de los determinados experimentalmente a partir de estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), lo que sustenta la validez de esta metodología para abordar los aspectos estructurales implicados en la formación de los complejos supramoleculares droga-dendrúmero.

En cuanto al estudio de dendrímeros PEG-PAMAM mediante simulaciones de DM, un reciente reporte de Yang y colaboradores ha mostrado el efecto que presenta la pegilación de dendrímeros PAMAM sobre su estructura en disolución acuosa, considerando para ello distintos grados de pegilación y utilizando cadenas de PEG de distintas dimensiones (500 y 1000 g/mol)⁵⁹. En este trabajo, se encontró que la pegilación conlleva un aumento en el tamaño del dendrúmero, mientras que no afecta la solvatación de aminas primarias terminales, resultados que están de acuerdo con observaciones experimentales obtenidas a partir de experimentos SANS y SAXS⁶⁰. Las simulaciones de DM también han mostrado que cadenas de PEG de baja masa molar interactúan estrechamente con la superficie cargada del dendrúmero, proporcionando una barrera que podría jugar un rol preponderante tanto el proceso de complejación de drogas, así como también, en el perfil de liberación de los agentes terapéuticos⁵⁹.

A la luz de estos resultados, las simulaciones de DM podrían representar una estrategia adecuada para evaluar como las propiedades estructurales de los dendrímeros PEG-PAMAM influyen en el proceso de formación de complejos supramoleculares con drogas anticancerígenas, lo que permitiría entre otras cosas, estudiar la evolución temporal de la formación de los complejos droga-dendrúmero, identificar las principales fuerzas intermoleculares involucradas en la estabilización de los complejos, determinar grados de pegilación que maximicen la capacidad de complejación de los nanotransportadores, y a partir de esta información, decidir la estrategia sintética más adecuada con el objetivo de superar la rápida liberación de la carga farmacológica que presentan los dendrímeros PEG-PAMAM en condiciones de pH y fuerza iónica fisiológicas^{40,47}.

1.5 Liberación controlada de la carga farmacológica en función del pH.

Un problema recurrente en la quimioterapia del cáncer son los efectos secundarios que conlleva el uso de medicamentos anticancerígenos altamente citotóxicos, los que son distribuidos de forma aleatoria en el cuerpo humano, provocando una muerte celular no específica. En consecuencia, un sistema transportador de drogas anticancerígenas eficiente debería ser capaz de liberar la carga farmacológica preferentemente en las cercanías del entorno tumoral. Con esto en mente, una de las estrategias más convenientes para abordar esta problemática es aprovechar las diferencias de pH existentes entre el plasma sanguíneo (7.4) y las células cancerosas, las que en sus tejidos presentan un pH promedio de 6.5 unidades, mientras que en los compartimentos intracelulares, tales como los endosomas, el pH puede descender hasta 4.8 unidades^{61,62}. En este contexto, Jin y colaboradores reportaron que la conjugación de dendrímeros PEG-PAMAM con cadena de poli [2-(N,N-dietil amino) etil metacrilato] (PDDA) condujo a cambios en el perfil de liberación de 5FU en función del pH del medio de liberación⁶³. Los autores observaron que a pH 6.5 la liberación de 5FU fue mucho más rápida que a pH 7.4, lo que atribuyeron al cambio de las cadenas PDEA las que pasan de tener un carácter hidrofóbico a $\text{pH} \geq 7.4$, a un estado hidrófilo a $\text{pH} \leq 6.5$, condiciones en las que las cavidades interiores del dendrímero están abiertas para liberar la carga farmacológica sin el impedimento estérico observado a pH 7.4.

Aunque en este reporte no se evaluó el efecto de la fuerza iónica presente en condiciones fisiológicas sobre la liberación de la droga, este nuevo sistema transportador basado en dendrímeros PEG-PAMAM mostró una larga vida media después de la administración intravenosa en ratones, no produjo efectos citotóxicos y presentó una orientación preferente hacia zonas tumorales, por lo que presenta un gran potencial como vehículo transportador de drogas para la terapia del cáncer. Una alternativa a este enfoque, podría ser la conjugación de dendrímeros PEG-PAMAM con cadenas alifáticas que presenten en su extremo grupos que en condiciones de pH fisiológicas (7.4) se encuentren en forma de aniones (como es el caso de los grupos carboxilo), con el objetivo de formar bolsillos hidrofóbicos mediante la interacción electrostática entre los extremos aniónicos de estos grupos con los grupos amino superficiales de los dendrímeros PAMAM, los que en estas

mismas condiciones de pH se encuentran cargados positivamente. Dicha interacción podría perder fuerza en condiciones más ácidas, en donde los grupos carboxilo se encuentran protonados, lo que facilitaría la liberación de la droga encapsulada desde el dendrímero. En base a lo anterior, en esta tesis doctoral se propone el desarrollo de una nueva familia de sistemas transportadores de fármacos anticancerígenos basado en dendrímeros PEG-PAMAM, donde la liberación de la carga farmacológica será impulsada aprovechando la diferencia de pH existente entre el plasma sanguíneo (7.4) y los compartimentos intracelulares de las células cancerígenas. ($\text{pH} \leq 5.0$)^{61,62}.

1.6 Alcances de la investigación.

Esta tesis doctoral tiene por objetivo principal diseñar un nuevo sistema transportador de fármacos basado en dendrímeros PEG-PAMAM, el que deberá presentar una baja polidispersidad, una masa molar adecuada para presentar el efecto EPR⁶⁴, una elevada capacidad de encapsulación para contar con una buena carga farmacológica, además de presentar una respuesta a estímulos químicos (diferencias de pH), que genere cambios conformacionales que permitan obtener una liberación controlada y sostenida del fármaco en función del pH.

Por otro lado, para obtener información respecto del efecto que tiene el grado de pegilación de dendrímeros PAMAM sobre su capacidad de complejación y el mecanismo mediante el cual las drogas complejadas son liberadas desde los nanotransportadores, se estudiaron dendrímeros con grados de pegilación variable entre 0-100%. La estrategia de investigación consistió en realizar un estudio combinado de técnicas de simulación molecular en conjunto de ensayos experimentales, con el fin de evaluar en una primera etapa el efecto del grado de pegilación sobre la estructura de los sistemas transportadores y evaluar cómo influye en la capacidad de complejación de dendrímeros PAMAM pegilados y en los perfiles de liberación de drogas utilizadas en la quimioterapia. Para ello se emplearon dos drogas anticancerígenas de distinta naturaleza química como son 5FU y MTX, cuyas estructuras se presentan en la Figura 3.

En base a la información del grado de pegilación que permita maximizar la carga farmacológica y optimizar el perfil de liberación con cada uno de estos fármacos, se

modificó la estructura de este dendrímero parcialmente pegilado, sustituyendo parte de los grupos amino superficiales libres por compuestos que presenten un grupo carboxi en uno de sus extremos. El compuesto elegido para este propósito fue el éster del ácido N-succinimidil-6-maleimidohexanóico (MHA) [Figura 4], el cual puede ser hidrolizado en medio básico para obtener un grupo carboxi.

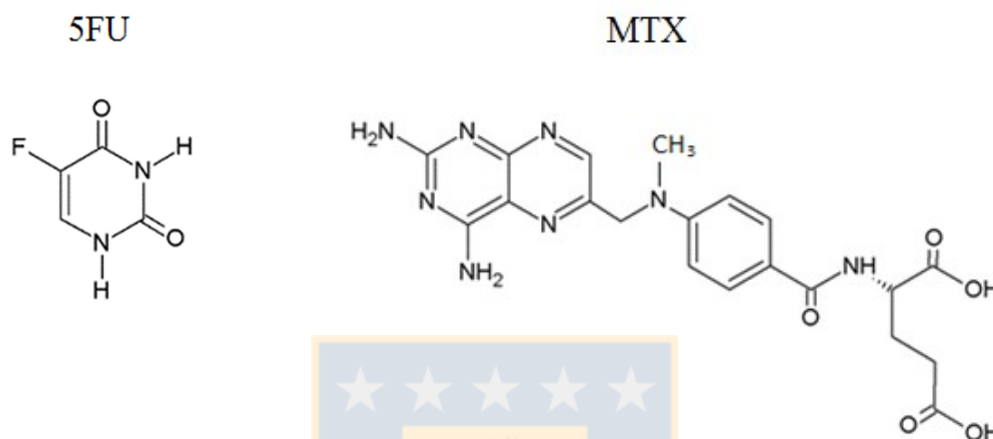


Figura 3: Estructuras de los fármacos anticancerígenos en estudio, 5FU y MTX.



Figura 4: Estructura del éster del ácido N-succinimidil-6-maleimidohexanóico (MHA), que será empleado en la conjugación con los dendrímeros PEG-PAMAM-G4 para la formación de bolsillos hidrofóbicos sensibles a las condiciones de pH del medio.

Gracias a la libertad conformacional y las propiedades ácido-base que presentan los dendrímeros PEG-PAMAM-G4 en disolución, es que su conjugación con MHA podría impulsar la formación de bolsillos hidrofóbicos a pH fisiológico, lo que permitiría retener un alto porcentaje de la carga farmacológica en estas condiciones, y liberar dicha carga en

condiciones de pH más ácidas debido a la apertura de estos bolsillos hidrofóbicos como se esquematiza en la Figura 5.

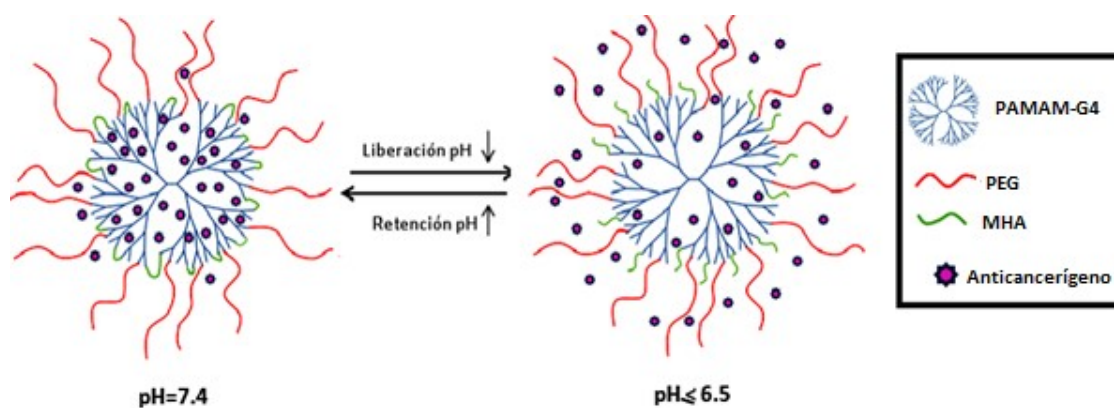


Figura 5: Esquema general de los nuevos dendrímeros de liberación controlada, y del efecto que tendrían las condiciones de pH del medio sobre su estructura.



1.7 Hipótesis

El nuevo sistema MHA-PEG-PAMAM-G4 podría presentar una mayor retención de la carga farmacológica a pH fisiológico (respecto a los dendrímeros PEG-PAMAM) y un alto porcentaje de liberación en condiciones de pH más ácidas (4.5), debido a la formación de bolsillos hidrofóbicos entre los grupos amino protonados del dendrímero y los grupos carboxilatos de las cadenas de MHA.

1.8 Objetivos

Objetivo General

- Desarrollar una nueva familia de dendrímeros capaz de retener un alto porcentaje de carga farmacológica de MTX y 5FU en condiciones de pH y salinidad similares a las que presenta el plasma sanguíneo, y liberar rápidamente dicha carga en condiciones de pH más ácidas ($\text{pH} < 5.0$).

Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de la pegilación sobre las propiedades estructurales de dendrímeros PEG-PAMAM-G4 considerando un 25%, 50%, 75% y 100% de pegilación.
2. Determinar el grado de pegilación que permita maximizar la relación dendrímero-fármaco para cada uno de los sistemas en estudio, y caracterizar las interacciones responsables de la asociación de los fármacos con los transportadores.
3. Sintetizar dendrímeros PEG-PAMAM-G4 con grados de pegilación de 25%, 50%, 75% y 100% y el nuevo sistema MHA-PEG-PAMAM-G4 con el grado de pegilación determinado como óptimo.
4. Determinar y caracterizar la cinética de liberación farmacológica de ambas drogas desde los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 en condiciones fisiológicas.
5. Determinar el efecto del pH sobre la liberación de las drogas en estudio desde el nuevo sistema MHA-PEG-PAMAM-G4.

Metodología

En este capítulo se detallan los métodos empleados para el desarrollo de esta tesis doctoral, los que se dividen en dos secciones. La primera de ellas guarda relación con los aspectos computacionales, protocolos de simulación, parámetros de campo de fuerza y programas utilizados en el estudio del efecto de la pegilación sobre factores estructurales de los dendrímeros PAMAM y la evaluación de cómo estos factores condicionan la capacidad de complejación que presentan estos sistemas en disolución acuosa. En la segunda sección, se detallan los materiales, el equipamiento y todos los aspectos experimentales que fueron utilizados para llevar a cabo la síntesis de los sistemas pegilados y su posterior evaluación como sistemas transportadores de fármacos anticancerígenos.



2.1 Simulación Molecular.**2.1.1 Construcción de los sistemas****Dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4**

La primera etapa en este estudio consistió en diseñar modelos moleculares para los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 con distinto grado de pegilación. La estructura inicial del dendrímero PAMAM-G4 fue construida a partir de un dendrímero PAMAM de tercera generación (PAMAM-G3), la cual se rescató desde de trabajos previos^{24,28}. A partir de la estructura de PAMAM-G4 se construyeron los sistemas pegilados considerando grados de pegilación del 25%, 50%, 75% y 100%, utilizando para ello el programa de visualización molecular Gaussview 5. En cuanto a la distribución de las cadenas de PEG en la estructura del dendrímero PAMAM-G4, estas fueron distribuidas simétricamente entre las ramas superficiales del dendrímero con el fin de minimizar la repulsión entre ellas, de acuerdo con lo descrito por Lee y Larson⁶⁵. El número de cadenas de PEG enlazadas en cada uno de los sistemas pegilados fueron 16, 32, 48 y 64 para grados de pegilación del 25%, 50%, 75% y 100%, respectivamente. Las estructuras iniciales de estos sistemas fueron sometidos a un proceso de optimización estructural a nivel semiempírico PM3 en fase gaseosa⁶⁶, utilizando para ello el software Gaussian03⁶⁷.

Las estructuras optimizadas de los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 fueron utilizadas como estructuras de partida para realizar las simulaciones de DM de estos sistemas. Se construyeron archivos de topología para estos sistemas, los que contienen las cargas atómicas, tipos de átomos y conectividades de los sistemas a simular. Los parámetros del campo de fuerza para el dendrímero PAMAM-G4 fueron obtenidos desde el campo de fuerza CHARMM27⁶⁸, mientras que para las cadenas de PEG se utilizaron los parámetros de campo de fuerza CHARMM C35r⁶⁹. A partir de las coordenadas atómicas rescatadas desde la optimización geométrica en fase gas y las topologías de los sistemas se construyeron modelos moleculares en disolución acuosa para cada uno de los sistemas transportadores a estudiar mediante simulaciones de DM. Estos modelos moleculares contemplaron una molécula de dendrímero dispuesta en una caja de agua de agua cúbica, para la cual se emplearon moléculas de solvente explícitas del tipo TIP3P⁷⁰. Las dimensiones de las cajas de agua para cada sistema fueron elegidas contemplando una capa

de solvatación de 15 Å alrededor de la estructura del dendrímero. Los sistemas fueron contruidos considerando pH neutro (7.0), por lo tanto, todos los grupos amino primarios superficiales de los dendrímeros fueron considerados en su forma catiónica debido a los valores de pK_a reportados para estos sistemas, los que están en el rango de 9.4 a 9.7 unidades²⁰. En este sentido, para conservar la neutralidad eléctrica de los sistemas se incluyeron contraiones cloruro (Cl^-). La Tabla 2 resume en detalle la composición de los sistemas contruidos.

Tabla 2: Composición de los modelos moleculares contruidos para los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 en disolución acuosa a pH 7.

Sistema	Átomos del sistema [†]	Moléculas de agua	Volumen de la caja de agua ($\times 10^{-6}$ Å ³)	Carga del dendrímero	Número iones Cl^-
PAMAM-G4	2308	25642	0.84	64	64
25% PEG-PAMAM-G4	7428	59888	1.98	48	48
50% PEG-PAMAM-G4	12548	100166	3.31	32	32
75% PEG-PAMAM-G4	17668	160628	5.27	16	16
100% PEG-PAMAM-G4	22788	235503	6.35	0	0

[†] Sin considerar moléculas de agua y contraiones.

Complejos droga:dendrímero

Se contruyeron modelos moleculares para los complejos droga:dendrímero partir de la estructura optimizada de los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4. Cada complejo contempló una molécula de dendrímero en presencia de un exceso de moléculas de fármaco (5FU o MTX) distribuidas aleatoriamente a una distancia entre 12 y 15 Å desde la superficie del dendrímero. Cada uno de estos complejos fue solvatado con moléculas de solvente explícitas, utilizando el modelo de agua TIP3P, añadiendo también contraiones cloruro (Cl^-) o sodio (Na^+) para mantener la neutralidad eléctrica de los sistemas, según el fármaco utilizado en cada complejo. En base a los valores de pK_a de las drogas en estudio, para representar sistemas en disolución acuosa a pH 7, las moléculas de 5FU fueron consideradas en estado neutro⁷¹, mientras que las moléculas de MTX como dianión⁷². En cuanto a la topología y parámetros de campo de fuerza de estos fármacos, estos fueron obtenidos de la interfaz web SwissParam, la que proporciona parámetros derivados del campo de fuerza

MMFF9 para pequeñas moléculas orgánicas⁷³. En la Tabla 3 se suministra un resumen de la composición de los distintos complejos droga:dendrímico construidos.

Tabla 3: Composición de los modelos moleculares construidos para los complejos droga:dendrímicos en disolución acuosa a pH 7.

Complejos droga:dendrímico	Átomos del sistema	Moléculas de agua	Volumen de la caja de agua ($\times 10^{-6} \text{ \AA}^3$)	Carga del dendrímico	Iones Cl^- o Na^+
5FU:PAMAM-G4	3568	56260	1.80	64	64 Cl^-
5FU:25%PEG-PAMAM-G4	11232	175712	5.50	48	48 Cl^-
5FU:50% PEG-PAMAM-G4	16352	174148	5.45	32	32 Cl^-
5FU:75% PEG-PAMAM-G4	21472	170889	5.45	16	16 Cl^-
5FU:100% PEG-PAMAM-G4	26592	167175	5.54	0	0 Cl^-
MTX:PAMAM-G4	5700	158057	4.97	64	64 Na^+
MTX:25%PEG-PAMAM-G4	12728	181603	5.83	48	152 Na^+
MTX:100%PEG-PAMAM-G4	28088	171483	5.96	0	128 Na^+

2.1.2 Protocolo de simulación

Para llevar a cabo las simulaciones de DM de los dendrímicos PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 y sus respectivos complejos supramoleculares con 5FU y MTX, se utilizó el protocolo de simulación descrito por Barraza y colaboradores⁷⁴. Este protocolo de simulación consistió en una minimización de energía potencial de 1000 pasos, proceso durante el cual la estructura de los dendrímicos se mantuvo fija para permitir la reorganización de las moléculas de agua, contraiones y drogas (en el caso de los complejos droga:dendrímico) con el fin eliminar contactos inadecuados. Una segunda minimización de 1000 pasos fue realizada sobre la estructura de los dendrímicos, dejando fijas esta vez las moléculas de agua y los otros componentes del sistema. Una última minimización de 1000 pasos fue realizada sobre el sistema completo, seguida de un proceso de calentamiento el que permite hacer una rápida exploración del espacio conformacional de los dendrímicos, además de equilibrar aún más los sistemas en términos de la distribución de moléculas de solvente y contraiones. Este proceso de calentamiento consistió en una serie de simulaciones de DM cortas (200 ps) a diferentes temperaturas, calentando

progresivamente el sistema desde 300K a 800K con incrementos sucesivos de 100K. Luego, el sistema fue enfriado disminuyendo la temperatura en intervalos de 100 K hasta alcanzar los 300K, temperatura a la cual se realizó una dinámica de equilibrio de 500 ps. El equilibrio de los sistemas se evaluó mediante el seguimiento de la desviación cuadrática media RMSD, la cual es una medida de la fluctuación de una estructura en el tiempo respecto a una estructura de referencia. Alcanzado el equilibrio, una serie de simulaciones de DM de "producción" fueron realizadas para cada uno de los sistemas en estudio. Las dinámicas de producción contemplaron un tiempo de simulación de 20 ns para los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4, mientras que en el caso de los complejos droga:dendrímero se contemplaron 30 ns de producción. Estas simulaciones se llevaron a cabo utilizando el colectivo isobárico-isotérmico (NPT), manteniendo constante la temperatura y presión a 300K y 1atm respectivamente. Todas las etapas de este protocolo se aplicaron a los sistemas descritos en las Tablas 2 y 3, empleando para ello el software NAMD⁷⁵.

2.1.3 Análisis de las simulaciones de DM.

Análisis estructural

Las trayectorias de las simulaciones de DM de producción fueron empleadas para determinar propiedades estructurales de los dendrímeros PAMAM-G4, PEG-PAMAM-G4 y sus complejos con 5FU y MTX respectivamente. En este sentido, para obtener información acerca de cómo influye el grado de pegilación sobre el tamaño de los sistemas transportadores se calculó su radio de giro (R_g), el que para un sistema de N átomos está dado por la ecuación 1.

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{M} [\sum_{i=1}^N m_i |r_i - R|^2] \quad (1)$$

Donde R representa el centro de masas del sistema, r_i es la posición de iésimo átomo de masa m_i y M es la masa total del sistema.

Para evaluar la distribución espacial de los constituyentes de cada sistema se calculó la función de distribución radial (fdr). La fdr describe la distribución entre pares de átomos (o grupos de átomos) contenidos en un volumen determinado dentro del sistema molecular,

que es caracterizada por un pico de intensidad relativa a la permanencia de la interacción entre el grupo de átomos seleccionados en función de la distancia desde el centro de masa de dicho sistema. Por lo tanto, esta función fue empleada para describir la distribución de las ramas del dendrímero PAMAM, de las cadenas de PEG, de las moléculas de agua y contraiones en los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 respectivamente. En el caso de los complejos droga:dendrímero, esta función fue utilizada para evaluar la evolución temporal del proceso de asociación de las drogas con los dendrímeros, identificar los sitios preferenciales de interacción y determinar las correspondientes estequiometrías de los complejos supramoleculares formados. En cada caso, se consideró como punto de referencia el centro de masas del dendrímero PAMAM-G4, utilizando el Rg calculado para este dendrímero como parámetro de referencia para discriminar las moléculas de droga complejadas internamente de las externamente complejadas y de aquellas que no forman parte del complejo supramolecular.

Análisis de la interacción supramolecular en los complejos droga:dendrímero

Con el objetivo de establecer la naturaleza de la formación de los complejos supramoleculares droga:dendrímero, se calculó la energía de van der Waals (E_{vdW}) y la energía electrostática (E_{elec}) a partir de las trayectorias de DM de estos complejos. La energía de van der Waals se calculó empleando un potencial de Lennard-Jones 12-6 (U_{LJ}), mientras que la energía electrostática se calculó usando el potencial de Coulomb (U_{elec}), ecuaciones 2 y 3, respectivamente.

$$U_{LJ} = \sum_{i,j>1-4} E_{i,j} \left[\left(\frac{r_{i,j}^{\min}}{r_{i,j}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{i,j}^{\min}}{r_{i,j}} \right)^6 \right] \quad (2)$$

Donde $r_{i,j}$ es la distancia entre los átomos i y j , $E_{i,j}$ es el valor de E_{vdW} en el mínimo de la curva de interacción y $r_{i,j}^{\min}$ es la distancia entre los átomos i y j , en el mínimo de la curva de interacción.

$$U_{elec} = \sum_{i,j \geq 1,4} \left(\frac{Q_i \cdot Q_j}{\epsilon_r \cdot r_{i,j}} \right) \quad (3)$$

Donde Q_i y Q_j son las cargas de los átomos i y j , $r_{i,j}$ la distancia entre ellos y ϵ_r es la constante dieléctrica del medio.

Las energías calculadas fueron normalizadas por el número promedio de moléculas de droga encontradas interaccionando con cada segmento del sistema nanotransportados, es decir con el segmento correspondiente al dendrímero PAMAM-G4 y con las cadenas de PEG. Además de las energías de interacción de van der Waals y electrostática, también se evaluó la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre las moléculas de droga y los dendrímeros. Como criterio para identificar la formación de los enlaces de hidrógeno se consideró que la distancia entre los átomos electronegativos aceptores y donantes debía ser menor o igual a 3.2 Å, que el ángulo de enlace correspondiente fuese mayor que 120° y por último, que la permanencia de dicha interacción fuese superior al 50%⁷⁴.

Todos los análisis de las simulaciones de DM, así como la visualización y diseño de figuras de los sistemas transportadores y sus complejos con 5FU y MTX fueron realizados empleando el programa VMD⁷⁶. La determinación de las estequiometrias, energías de interacción y enlaces de hidrógeno en los complejos droga:dendrímero se realizó durante los últimos 5 ns de las correspondientes dinámicas de producción.



2.2 Parte Experimental.

2.2.1 Síntesis de dendrímeros PAMAM-G4 pegilados (PEG-PAMAM-G4).

Activación de polietilenglicol metileter.

La activación de polietilenglicol metileter comercial (PEG) de masa molecular promedio 2000 g/mol, se realizó mediante la síntesis de p-nitrofenil carbonato de pegilo (NFC-PEG) siguiendo el procedimiento desarrollado por Kojima⁴⁶, el cual se esquematiza en la Figura 6. Se mezclaron 3.6 mmol de PEG con 2 equivalentes de p-nitrofenil cloroformato (NFC) disueltos en 360 mL de THF anhidro. A la mezcla se añadieron 2 equivalentes de trietilamina para neutralizar el HCl producido durante el avance de la reacción. La mezcla reaccionante se mantuvo bajo agitación constante durante 5 días a temperatura ambiente. Concluida la reacción, la mezcla fue filtrada para eliminar la sal formada, y luego se eliminó el solvente de la mezcla en un equipo de evaporación rotatoria a presión reducida. La mezcla obtenida fue disuelta en metanol y pasada a través de una columna de exclusión molecular Sephadex LH-20 para remover el NFC en exceso del producto de interés, utilizando metanol como fase móvil. El análisis de las distintas fracciones se siguió por cromatografía en capa fina utilizando placas TLC Silica gel 60 F₂₅₄. La formación del producto de interés fue confirmada mediante espectroscopía de ¹H RMN e IR.

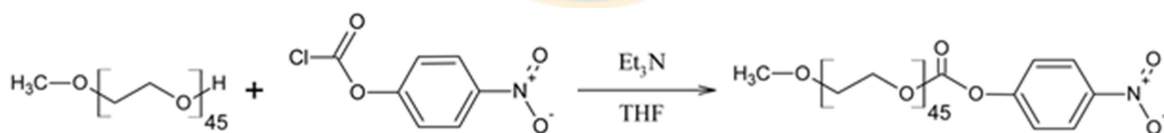


Figura 6: Esquema de la reacción para la síntesis de NFC-PEG.

Síntesis de dendrímeros PEG-PAMAM-G4 con distinto grado de pegilación.

Para la síntesis de dendrímeros pegilados se utilizó una variante del protocolo descrito por Kojima y colaboradores⁴⁶. Se preparó una serie de disoluciones de dendrímero PAMAM-G4 comercial (5.7 μmol, 81.3mg) en dimetil sulfóxido (DMSO), a las que se agregaron distintas cantidades de NFC-PEG para la obtención de dendrímeros con distinto grado de pegilación (25%, 50%, 75% y 100% fueron considerados). En la Tabla 4 se detallan las

cantidades de NFC-PEG utilizadas para la obtención de los distintos dendrímeros PEG-PAMAM-G4 y un esquema de la síntesis se muestra en la Figura 7.

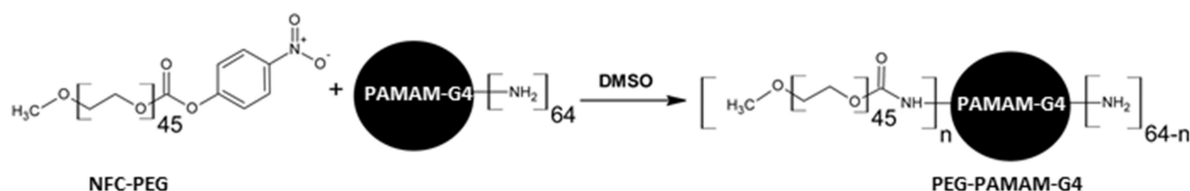


Figura 7: Esquema de la síntesis de dendrímeros PEG-PAMAM-G4.

Las distintas mezclas de reacción se dejaron en agitación constante durante 3 días a temperatura ambiente. Concluido el tiempo de reacción, cada mezcla fue diluida con agua destilada hasta un volumen total de 30 mL y cargada en una bolsa de diálisis con tamaño de poro de 25 kDa (spectrolab). Las bolsas de diálisis fueron selladas herméticamente y puestas en agitación dentro de un baño de agua destilada conteniendo 100 veces el volumen de la mezcla a dializar. El proceso de diálisis fue llevado a cabo durante 3 días a temperatura ambiente, renovando el agua del baño cada 12 horas. Las mezclas dializadas fueron lavadas con abundante agua destilada y reconcentradas en un equipo de ultrafiltración utilizando una membrana de exclusión molecular de 10 kDa, para luego ser llevados a sequedad en una estufa de vacío a 40°C durante 12 horas.

Tabla 4: Cantidades de reactantes y solvente utilizada en la síntesis de dendrímeros PEG-PAMAM-G4 con distinto grado de pegilación.

Grado de pegilación. (%)	Relación molar PEG:PAMAM (n:1)	Masa PEG. (mg)	Volumen DMSO (mL)
25	32:1	387	10
50	48:1	580	10
75	64:1	775	15
100	128:1	1550	15

La pureza de los productos obtenidos fue evaluada mediante cromatografía de gel permeable (GPC), utilizando como criterio de pureza el índice de polidispersidad (IP) de los sistemas pegilados respecto del IP del dendrímero PAMAM-G4 comercial, mientras que el grado de pegilación obtenido en cada producto de reacción fue determinado por integración de las señales características presentes en los correspondientes espectros de ^1H RMN.

2.2.2 Caracterización de dendrímeros PEG-PAMAM-G4.

Masa molar y polidispersidad de dendrímeros PEG-PAMAM-G4.

La masa molar y polidispersidad de los dendrímeros PEG-PAMAM-G4 sintetizados fueron estimadas por cromatografía de gel permeable (GPC) en un equipo HPLC Perkin Elmer Series 200 provisto con un detector IR y una columna PL-AQUAGEL OH. Se prepararon disoluciones de dendrímeros PEG-PAMAM-G4 (10.0 mg/mL) disueltas en una solución de NaNO_3 0.1 mol/L, las que fueron expuestas a ultrasonido durante 5 minutos previo análisis. Como eluyente se utilizó una solución de NaNO_3 0.1 mol/L, con un flujo de 0.5 mL/min a una temperatura constante de 40°C. Para la determinación de la masa molar promedio de los sistemas transportadores, el GPC fue calibrado utilizando una serie de estándares de polietilenglicol de distintas masa moleculares (232, 17900 y 271000 g/mol)⁴⁶.

Cálculo del grado de pegilación y masa molar de dendrímeros PEG-PAMAM-G4.

El grado de pegilación de los distintos dendrímeros PEG-PAMAM-G4 fue evaluado por espectroscopía ^1H -RMN. Se prepararon soluciones de los distintos dendrímeros PEG-PAMAM-G4 obtenidos por síntesis, disolviendo 5.00 mg de dendrímero en 500 μL de D_2O 99.9% (Merck). Las disoluciones fueron analizadas en un espectrómetro Bruker AscendTM 400 MHz. El grado de pegilación efectivo de los dendrímeros PEG-PAMAM-G4 fue determinado mediante la relación obtenida entre las integrales correspondientes a las señales de las cadenas de PEG y las señales de los metilenos del dendrímero PAMAM-G4. Determinado el grado de pegilación, se calculó la masa molar "nominal" de los dendrímeros PEG-PAMAM-G4 considerando que la masa molar del dendrímero PAMAM-G4 es 14215 g/mol y la masa molar de las cadenas de PEG es 2000 g/mol, tal y como informa el fabricante (Sigma-Aldrich[®]).

2.2.3 Evaluación de la capacidad de complejación de los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 con drogas anticancerígenas.

Estudios de solubilidad de drogas anticancerígenas en disolución acuosa.

Se realizaron estudios de solubilidad en disolución acuosa para obtener evidencia experimental sobre la estequiometría y la constante de asociación de los complejos droga:dendrímoro formados entre MTX y 5FU y los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 a pH 7.0. Para ello, se prepararon disoluciones de complejos droga:dendrímoro considerando un exceso de droga (2 mg de MTX y 10 mg 5FU), añadiendo volúmenes constantes de 500 μL de las soluciones de dendrímeros en un rango de concentraciones de 0.0 a 100.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para los complejos con MTX y entre 0.0 y 50.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para los complejos con 5FU. El pH de las distintas disoluciones se ajustó a 7.0 unidades, usando para ello pequeñas porciones de HCl, debido a que se ha observado que la utilización de tampones salinos provoca una fuerte interferencia en el proceso de asociación droga-dendrímoro¹⁸. Las disoluciones se agitaron mecánicamente durante 48 h en el caso de los complejos con MTX⁴⁶, y durante 7 días en el caso de los complejos con 5FU⁷⁷, con el fin de alcanzar el equilibrio de saturación a una temperatura constante de 22°C. Una vez alcanzado el equilibrio, las disoluciones se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min. La concentración de fármaco en las soluciones sobrenadantes se determinó a 301nm y 256nm para MTX y 5FU respectivamente, mediante espectrofotometría UV-Vis empleando para ello un espectrofotómetro Spectroquant UV-vis Pharo 300, Merck. El aumento de solubilidad de las drogas en presencia de concentraciones crecientes de dendrímoro se estudió empleando la técnica de solubilidad de fases reportado por Higuchi y Connors⁷⁸. Los perfiles de solubilidad fueron obtenidos graficando la solubilidad de la droga (mol L^{-1}) versus la concentración de dendrímoro (mol L^{-1}), mientras que las constantes de afinidad droga:dendrímoro fueron determinadas a partir de los perfiles de solubilidad empleando la formulación de Higuchi y Connors para múltiples sitios de interacción⁷⁸.

Determinación de sitios de interacción supramolecular droga:dendrímoro.

Los sitios de interacción supramolecular de los complejos droga:dendrímoro formados entre MTX y 5FU con los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 fue investigado en disolución acuosa (D_2O) a pD=7.0 mediante experimentos 2D-NOESY RMN^{26,79}. Una

serie de disoluciones de dendrímero fueron preparadas en 500 μL de D_2O 99.9% ($100.0 \text{ mmol L}^{-1}$) a las que se añadieron 1 mg MTX y 5 mg de 5FU respectivamente. Las disoluciones fueron agitadas vigorosamente y analizadas en un espectrómetro Bruker AscendTM 400 MHz. Los espectros 2D-NOESY fueron obtenidos a 400.13 MHz usando un tiempo de mezcla de 300 ms y un pulso de 90° durante 8.7 μs .

2.2.4 Liberación de drogas anticancerígenas desde dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4.

La liberación de las drogas complejadas en los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 fue investigada utilizando el método de diálisis en equilibrio³⁸. Para ello, se preparó una serie de disoluciones de dendrímero ($100.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) en un volumen constante de 1mL de agua destilada. A estas disoluciones se añadieron 2 mg MTX o 10 mg de 5FU respectivamente. Las disoluciones se agitaron mecánicamente durante 48 horas en el caso de los complejos con MTX, y durante 7 días en el caso de los complejos con 5FU a una temperatura constante de 22°C . Una vez alcanzado el equilibrio, las disoluciones se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min. Las soluciones sobrenadantes fueron congeladas a una temperatura de -56°C en un baño de metanol durante dos horas y posteriormente fueron liofilizadas durante la noche, obteniendo polvos sólidos de color amarillo y blanco que corresponden a los complejos MTX:dendrímero y 5FU:dendrímero respectivamente.

Los complejos fueron disueltos en 1mL de una solución tampón fosfato (10 mmol L^{-1} ; $\text{pH}=7.4$). Este procedimiento se repitió disolviendo cada complejo en una solución tampón fosfato (10 mmol L^{-1}) a la que se añadió una concentración de 150 mmol L^{-1} de NaCl con el fin de imitar la fuerza iónica presente en el plasma sanguíneo. Las soluciones de los complejos droga:dendrímero fueron cargadas en bolsas de diálisis con tamaño de poro 10 kDa, estas se sellaron herméticamente y fueron puestas en contacto con 100 mL de la misma disolución fosfato (conteniendo o no la solución de NaCl 150 mmol L^{-1}) a 37°C , bajo agitación constante. Luego, se retiraron alícuotas de 500 μL desde cada disolución externa, reemplazando dicha alícuota por 500 μL de solución tampón para mantener el volumen de la solución externa constante.

La cantidad de droga liberada desde las bolsas de diálisis se determinó por espectrofotometría UV-vis, realizando mediciones de absorbancia de las alícuotas retiradas a 301nm y 256 nm para los complejos con MTX y 5FU respectivamente. La liberación de ambas drogas en condiciones fisiológicas (es decir pH=7.4 fosfato 10 mmol L⁻¹ + 150 mmol L⁻¹ de NaCl) desde los distintos sistemas fue caracterizada ajustando la data experimental a dos modelos cinéticos de liberación, los que fueron el modelo de primer orden⁸⁰ y el modelo de Higuchi⁸¹. Para evaluar el modelo que presentó el mejor ajuste con la data experimental se utilizó como criterio el valor del coeficiente de correlación (R²). Los ajustes de los modelos cinéticos teóricos a la data experimental se realizaron utilizando un método de regresión no lineal con el complemento *solver* implementado en Microsoft Excel.

2.2.5 Síntesis y caracterización del nuevo sistema de liberación controlada MHA-PEG-PAMAM-G4.

Se modificó la estructura de un dendrímero PEG-PAMAM-G4 conjugándolo el éster del ácido N-succinimidil-6-maleimidohexanóico (MHA). Para ello, se preparó una disolución de dendrímero PEG-PAMAM-G4 previamente caracterizado y purificado que contenía alrededor de un 60% de pegilación (5.7 μ mol, 81.3mg) en DMSO, a dicha disolución se agregaron 16 equivalentes de MHA, y la mezcla resultante se dejó en agitación constante por dos días a temperatura ambiente. El producto obtenido fue purificado empleando el método de diálisis descrito en la sección 2.1.1 para eliminar el DMSO y el MHA en exceso. Concluida la síntesis, se tomó y guardó una alícuota del producto obtenido para ser caracterizado, mientras que el grueso del producto obtenido se cargó en una bolsa de diálisis y fue hidrolizado en medio básico empleando una solución tampón NaOH/NaCOOH 0.1 mol L⁻¹ (pH=10.0) para producir la ruptura del anillo de maleimida⁸². El producto obtenido de la hidrólisis en medio básico fue lavado con abundante agua destilada y reconcentrado en una celda de ultrafiltración, para luego ser llevado a sequedad en una estufa de vacío a 40°C durante 12 horas. Un esquema de la síntesis del dendrímero MHA-PEG-PAMAM-G4 se presenta en la Figura 8. Los productos obtenidos fueron caracterizados por espectroscopía ¹H-RMN.

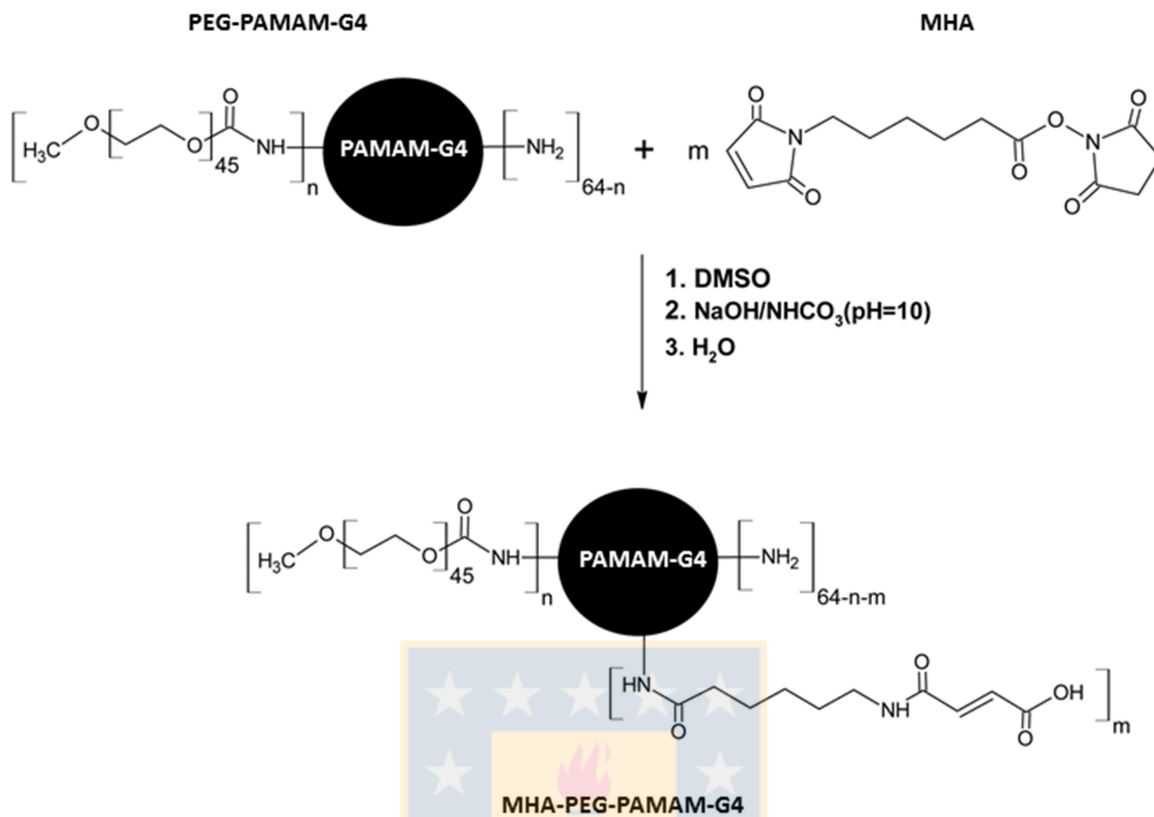


Figura 8: Esquema de la síntesis del nuevo dendrímero MHA-PEG-PAMAM-G4

2.2.6 Evaluación del efecto del pH en liberación de MTX y 5FU desde el nuevo sistema transportador MHA-PEG-PAMAM-G4.

La liberación de las drogas complejadas en los dendrímeros PEG-PAMAM-G4 precursor y MHA-PEG-PAMAM-G4 fue investigada utilizando el método de diálisis en equilibrio descrito en la sección 2.1.4. Para ello una serie de disoluciones de dendrímero ($100.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) fueron preparadas en un volumen constante de 1mL de agua destilada ajustando el pH a 7.0 unidades, empleando para ello pequeñas porciones de HCl. A estas disoluciones se añadieron 2 mg MTX o 10 mg de 5FU respectivamente. Estas disoluciones se agitaron mecánicamente durante 48 horas en el caso de los complejos con MTX, y durante 7 días en el caso de los complejos con 5FU, todas ellas a una temperatura constante de 22°C . Alcanzado el equilibrio, las disoluciones se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, y las soluciones sobrenadantes obtenidas fueron liofilizadas obteniendo sólidos correspondientes a los complejos supramoleculares formados por las drogas (MTX y 5FU) y los dendrímeros

PEG-PAMAM-G4 precursor y MHA-PEG-PAMAM-G4. Los complejos sólidos fueron disueltos en 1mL de una solución tampón fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH=7.4) y en una solución tampón acetato 10 mmol L⁻¹ (pH=4.5), cada una conteniendo adicionalmente 150 mmol L⁻¹ de NaCl para simular condiciones de fuerza iónica fisiológicas. Estas disoluciones fueron cargadas en bolsas de diálisis con tamaño de poro de 10 kDa, las que fueron selladas herméticamente y puestas en contacto con 100 mL de la disolución tampón correspondiente, a 37°C y bajo agitación constante. Luego, se retiraron alícuotas de 500µL desde cada disolución externa, reemplazando dicha alícuota por 500 µL de solución tampón para mantener el volumen de la solución externa constante. La cantidad de droga liberada desde las disoluciones droga:dendrúmero se determinó por espectrofotometría UV-vis, realizando mediciones de absorbancia de las alícuotas retiradas a 301nm y 256 nm para los complejos con MTX y 5FU respectivamente.



Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los principales resultados obtenidos en esta tesis doctoral, los que se dividen en dos secciones. La primera de ellas guarda relación con los estudios de dinámica molecular (DM), los que fueron empleados para determinar el efecto de la pegilación sobre la estructura de los dendrímeros PAMAM y cómo estos factores influyen en su capacidad de complejación con 5FU y MTX. A partir del análisis de las funciones de distribución radial de los fármacos respecto del centro de masas de los transportadores, se obtuvieron estequiometrías promedio para los complejos droga:dendrímero y se estimaron los sitios de interacción supramolecular. Finalmente, se realizó un estudio sobre las fuerzas de interacción responsables de la estabilización de los complejos droga:dendrímero, donde se observó la influencia de la naturaleza química de la droga en el tipo y magnitud de la interacción.

En la segunda sección se presentan los resultados obtenidos en la parte experimental, donde se sintetizaron una serie de sistemas PEG-PAMAM con diferentes grados de pegilación para evaluar su influencia sobre la capacidad de complejación de los sistemas transportadores, utilizando un dendrímero PAMAM-G4 como precursor. Estos sistemas se evaluaron como vehículos transportadores de los fármacos 5FU y MTX. Utilizando el método de solubilidad en disolución acuosa, se obtuvieron las estequiometrías droga:dendrímero y las constantes de afinidad de los complejos. Adicionalmente, se llevaron a cabo experimentos 2D-NOESY con el fin de identificar los sitios de interacción responsables de la asociación de las drogas. Por otro lado, se empleó el método de diálisis para estudiar la liberación de estos fármacos a partir del dendrímero PAMAM-G4 nativo y los sistemas pegilados, donde también se evaluó la influencia de la fuerza iónica en la liberación de las drogas. La cinética de liberación en condiciones fisiológicas fue caracterizada mediante el ajuste de la data experimental con dos modelos matemáticos de liberación. Finalmente, se sintetizó un nuevo sistema transportador basado en dendrímeros PEG-PAMAM (MHA-PEG-PAMAM-G4), y se estudió el perfil de liberación de ambas drogas desde este nuevo sistema, considerando dos condiciones de pH (7.4 y 4.5).

3.1 Simulación Molecular.

3.1.1 Efectos de la pegilación sobre la estructura de dendrímeros PAMAM.

Para evaluar el efecto que tiene la pegilación de dendrímeros PAMAM sobre su estructura y las conformaciones que adoptan estos sistemas en disolución acuosa, se realizaron simulaciones de DM para un dendrímero PAMAM-G4 y para dendrímeros PEG-PAMAM-G4 con grados de pegilación en un rango del 25-100%. A partir de las trayectorias obtenidas de las simulaciones de DM, se evaluó el efecto de la pegilación sobre el tamaño que presentan estos sistemas en disolución calculando su radio de giro (R_g), el cual es un indicador cuantitativo del tamaño que presenta un sistema molecular. En la Figura 9 se muestra la evolución temporal del R_g de los sistemas transportadores a lo largo de los 20 ns de simulación de DM. En esta figura, se observa un incremento gradual del R_g con el aumento del grado de pegilación, mientras que las fluctuaciones observadas en los valores de R_g durante la simulación molecular, dan cuenta de la libertad conformacional que presentan estos sistemas en disolución acuosa^{50,74}.

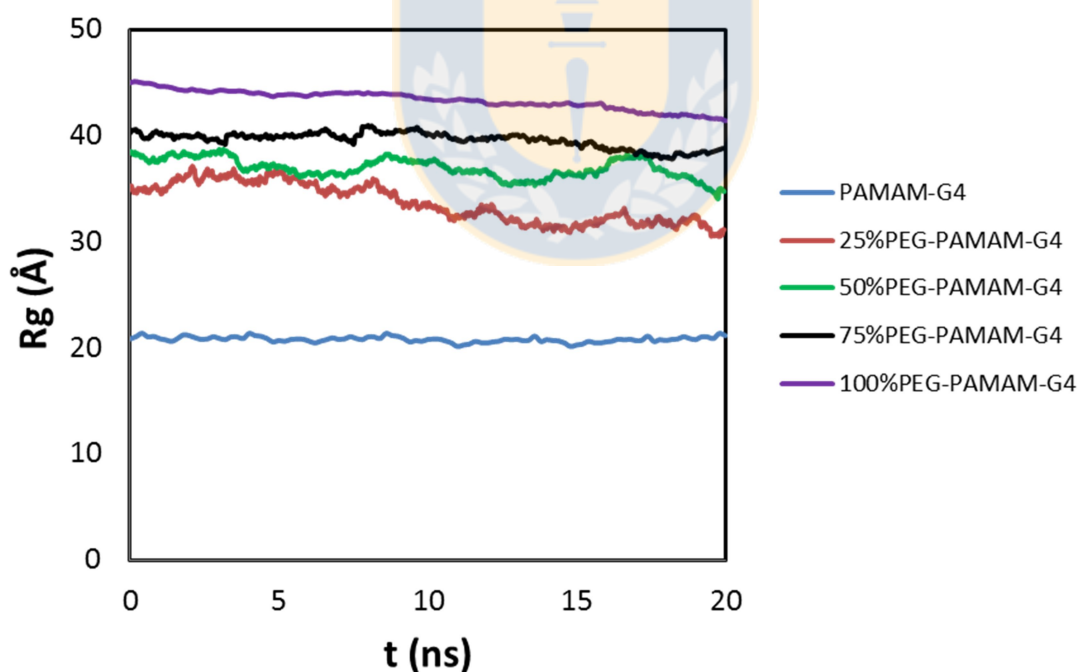


Figura 9: Variación del radio de giro R_g (Å) de los sistemas transportadores en disolución acuosa durante los 20 ns de simulación de dinámica molecular NPT, a 1atm y 300 K.

Para el dendrímero PAMAM-G4 nativo se obtuvo un valor de $R_g = 20.7 \text{ \AA}$, cercano a mediciones experimentalmente y a otros resultados obtenidos a partir de simulaciones moleculares (Tabla 5), lo que apoya la validez del campo de fuerza CHARMM27 para describir las propiedades estructurales de los dendrímeros PAMAM.

En el caso de los dendrímeros PEG-PAMAM-G4, hasta la fecha no existen valores experimentales reportados para el R_g de estos sistemas, pero el incremento observado en su tamaño producto del aumento en el grado de pegilación es concordante con observaciones experimentales en los que se consideraron otros largos de cadena de PEG³⁶. La validez de estos resultados es apoyado por el buen desempeño mostrado por el campo de fuerza CHARMM Cr35 para describir las propiedades estructurales (radios hidrodinámicos y radio de giro) de cadenas de PEG en disolución acuosa^{59,69}.

Tabla 5: Radios de giro promedio (R_g) de los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4, obtenidos a partir de 20ns de simulaciones de dinámica molecular

Sistema	$R_g (\text{\AA})$		
	Este trabajo	Experimental ⁸³	Otras simulaciones de DM ⁶⁵
PAMAM-G4	20.7 ± 0.4	21.5 ± 0.5	21.7 ± 0.1
25% PEG-PAMAM-G4	34.2 ± 0.6		
50% PEG-PAMAM-G4	36.4 ± 0.7		
75% PEG-PAMAM-G4	39.3 ± 0.6		
100% PEG-PAMAM-G4	42.9 ± 0.4		

Adicionalmente, se evaluó la variación que muestra el R_g de los dendrímeros PEG-PAMAM-G4 en función de su masa molecular (M). Los resultados obtenidos sugieren que a medida que el grado de pegilación aumenta, estos sistemas crecen de acuerdo con una ley de potencias del tipo $R_g \sim M^\alpha$, donde $\alpha = 0.32$, como se muestra en la Figura 10. Esta ley de crecimiento es del mismo tipo que la reportada para el crecimiento de dendrímeros PAMAM nativos en función de la generación¹⁹, resultado que indica que estos sistemas no presentan un crecimiento lineal con el aumento de su masa molar, sino que sufren un colapso superficial al alcanzar cierto tamaño crítico⁷⁴.

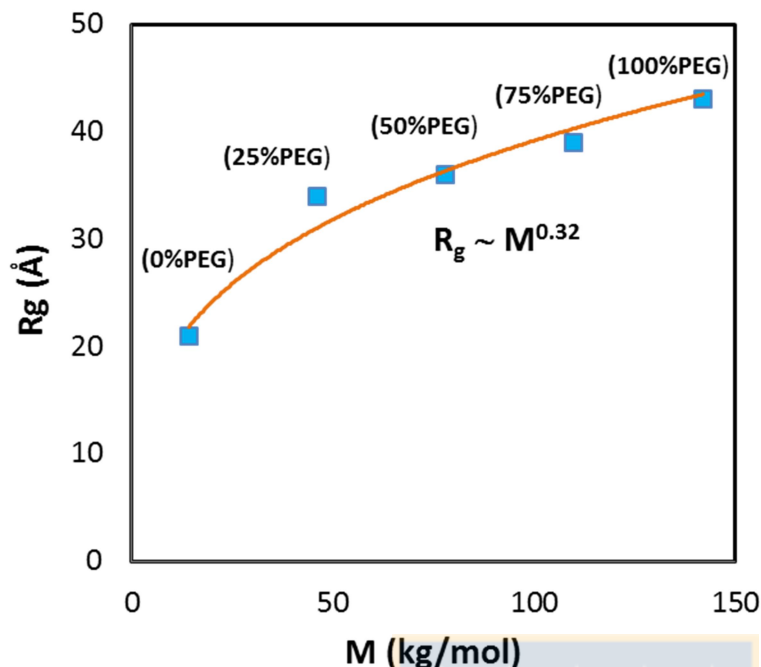


Figura 10: Variación del radio de giro (R_g) con respecto a la masa molecular (M) para el dendrímero PAMAM-G4 y los sistemas pegilados.

Por otro lado, para determinar el efecto que tiene la pegilación sobre las conformaciones que adquiere la estructura interna de los dendrímeros PEG-PAMAM-G4, se calculó la función de distribución radial (fdr) del fragmento PAMAM-G4 y de las cadenas de PEG de forma independiente para cada uno de los sistemas transportadores con distinto grado de pegilación (25-100%). En la Figura 11, se presentan los perfiles de fdr obtenidos a partir de las trayectorias de DM junto con una estructura representativa del fragmento PAMAM-G4 para cada sistema. En esta figura las cadenas de PEG, moléculas de agua y contraiones se han omitido para permitir una visualización más clara de la conformación del fragmento PAMAM-G4. Los resultados indican que en la zona comprendida entre el núcleo y las ramas internas del dendrímero (0-5Å), los sistemas tienden a adoptar una estructura menos densa a medida que el grado de pegilación aumenta, mientras que en la región comprendida por las ramas intermedias y externas del dendrímero (5-20Å), se observó que estos adquieren una estructura más compacta y densa con el aumento del grado de pegilación, en concordancia con lo reportado previamente por Lee y Larson⁶⁵. Esta redistribución de masas conduce a una expansión del núcleo y las ramas internas del dendrímero formando

cavidades más amplias, las que podrían facilitar la complejación de drogas al interior de las cavidades más internas presentes en la estructura del dendrímero.

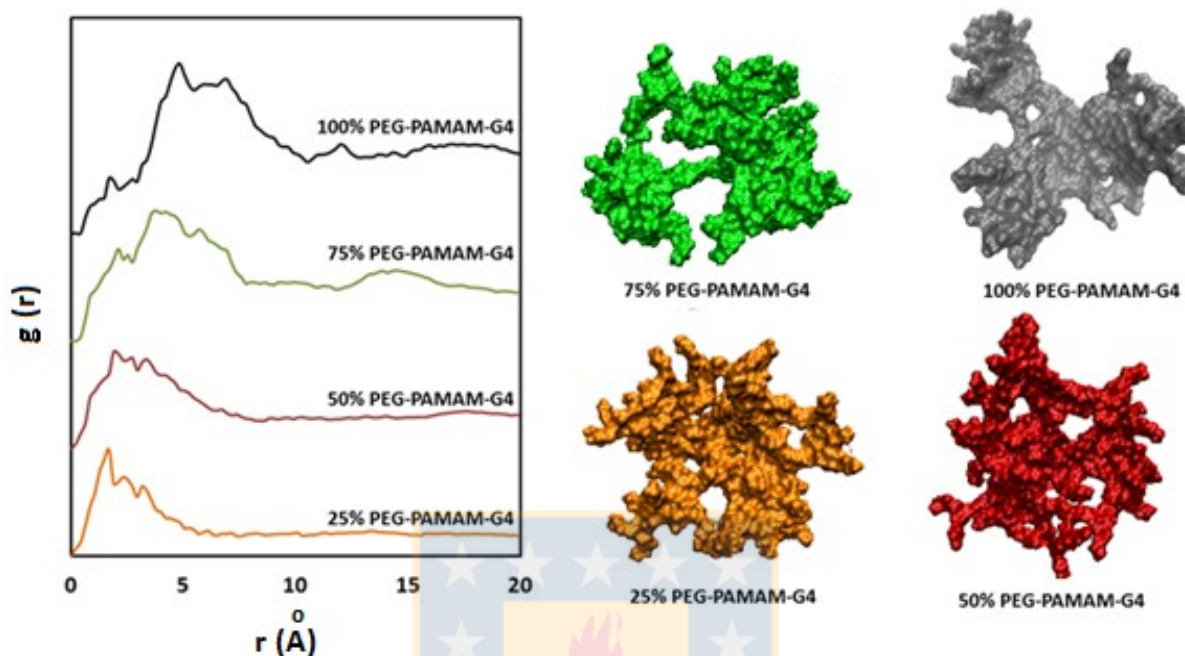


Figura 11: Función de distribución radial $g(r)$ y estructuras representativas del fragmento PAMAM-G4 de los sistemas pegilados.

En cuanto a la conformación que adoptan las cadenas de PEG en los sistemas PEG-PAMAM-G4, los resultados de los perfiles de fdr indican que estas cadenas se desplazan hacia la periferia de los dendrímero a medida que aumenta el grado de pegilación, como se muestra en la Figura 12. Estos resultados son consistentes con datos experimentales y con otras simulaciones de DM reportados previamente, las que indican que producto de la pegilación los dendrímero pasan de presentar una estructura esférica a una estructura micelar^{36,65}. Las conformaciones adoptadas por las cadenas de PEG durante la simulación sugieren que altos grados de pegilación podrían afectar la capacidad de encapsulación de estos dendrímeros debido a una reducción de la superficie accesible para la complejación de fármacos en las cavidades internas del fragmento PAMAM-G4.

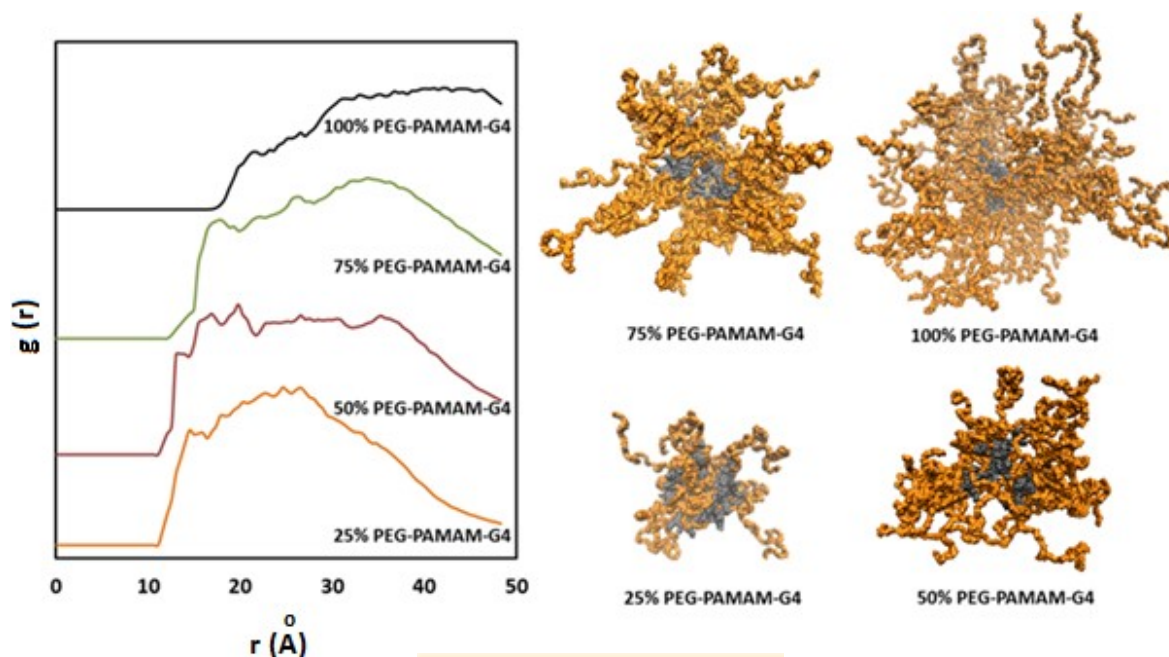


Figura 12: Función de distribución radial $g(r)$ de las cadenas de PEG en los sistemas pegilados y estructuras representativas de estos.

Respecto a las cavidades de los dendrímeros PAMAM nativos, estas se caracterizan por presentar un carácter hidrofóbico, por lo que permiten albergar en su interior moléculas orgánicas de baja polaridad²⁷. De esta manera, este tipo de drogas ven incrementada su solubilidad en disolución acuosa producto de la asociación con los dendrímeros PAMAM²⁴. Para evaluar la influencia de la pegilación sobre la hidrofobicidad de las cavidades de los transportadores, se calculó la fdr de las moléculas de agua respecto del centro de masas del fragmento correspondiente al dendrímero PAMAM-G4 para cada sistema, incluido el dendrímero PAMAM-G4 nativo. Los resultados revelan que producto de la pegilación se genera una disminución en las moléculas de agua presentes dentro de la estructura del fragmento PAMAM-G4 (0-20 $\text{\AA}$) como se muestra en la Figura 13a. De acuerdo con estos resultados, la pegilación reduce la penetración de moléculas de agua en la estructura del dendrímero, lo que puede interpretarse como una mejora o aumento del carácter hidrofóbico de las cavidades internas de estos sistemas como consecuencia de la pegilación⁷⁴. Esta observación podría ser beneficiosa para la complejación interna de drogas apolares dentro de la estructura de los sistemas pegilados.

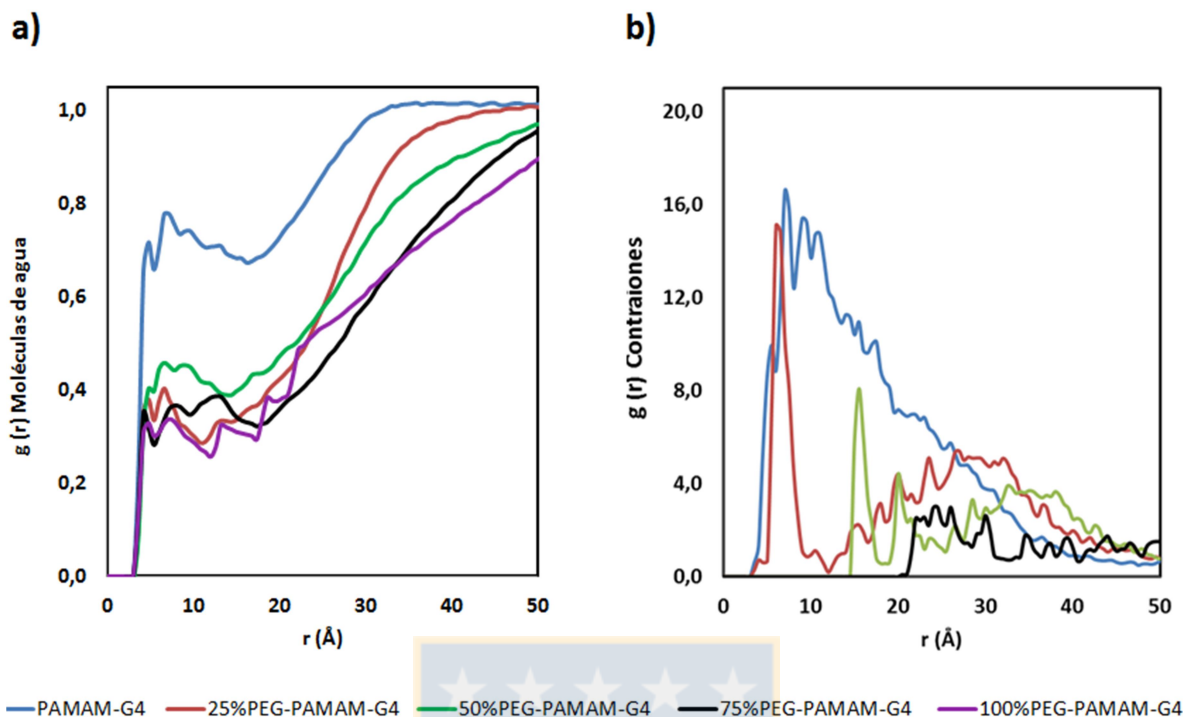


Figura 13: Funciones de distribución radial de las moléculas de agua (a) y los contraiones (b) en función del centro de masas de los sistemas transportadores.

Se evaluó también el efecto de la pegilación sobre la penetración de los contraiones presentes en disolución en la estructura de los sistemas transportadores, ya que se ha observado experimentalmente que la fuerza iónica juega un rol importante en la rápida liberación de drogas complejadas con los dendrímeros PAMAM y PEG-PAMAM. Los perfiles de distribución radial para iones cloruro [Figura 13b], revelan que estos iones penetran sin problemas en las cavidades más internas del dendrímero PAMAM-G4 nativo y en el sistema pegilado en un 25%, mientras que para los sistemas con grados de pegilación mayores, no se observan iones cloruro localizados en las cercanías del fragmento PAMAM.G4 (0-21 Å respecto del centro de masa del dendrímero), como se muestra en la Figura 14. Estos resultados sugieren que la pegilación de dendrímeros PAMAM con grados superiores al 25% podría ayudar a lograr una retención de la carga farmacológica por un periodo de tiempo más prolongado, ya que altos grados de pegilación podrían aislar de mejor forma a las moléculas de droga complejadas del efecto de la fuerza iónica, lo que está en concordancia con la evidencia experimental⁴⁰.

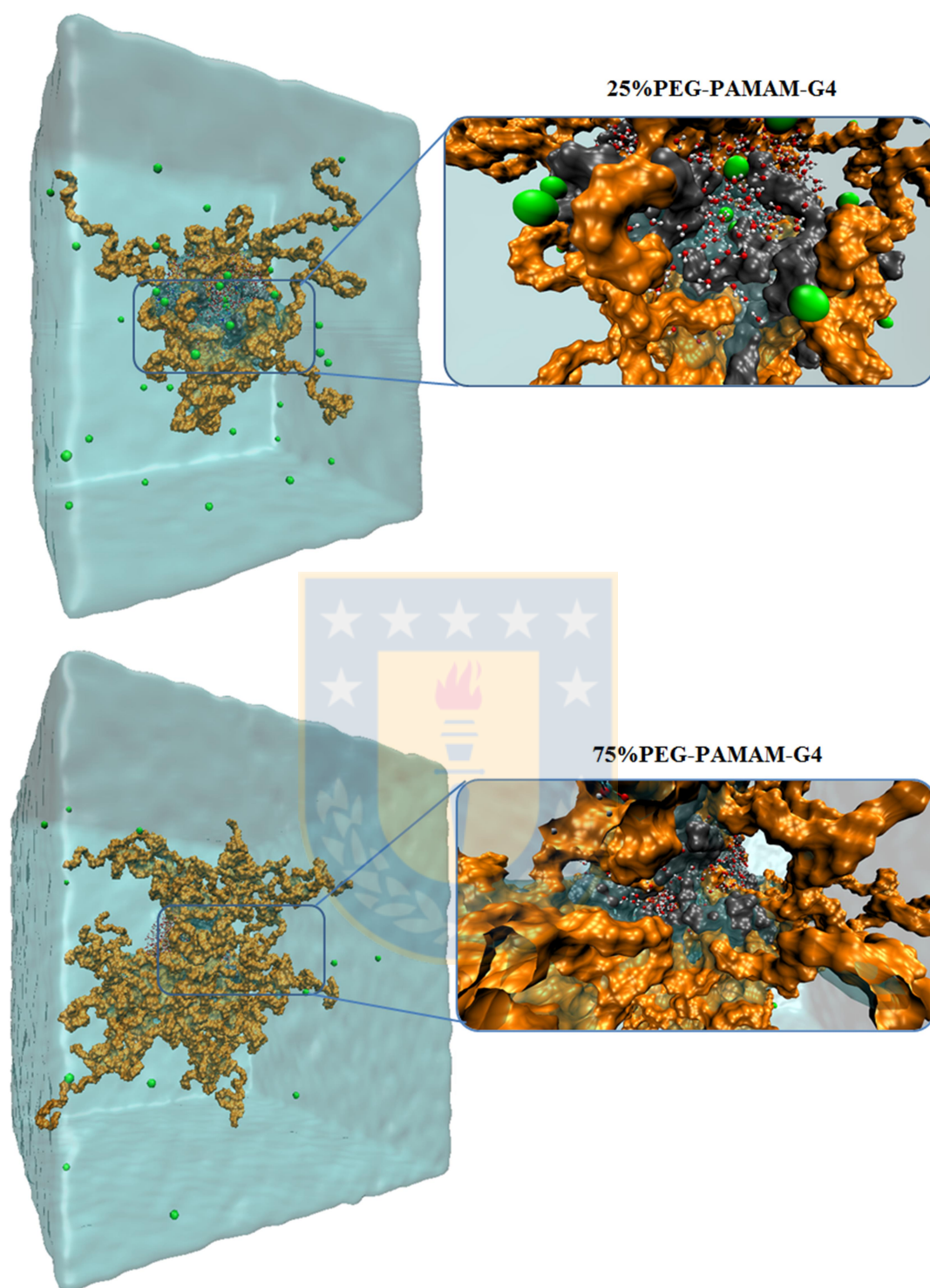


Figura 14: Estructuras representativas de los sistemas pegilados al 25% y 75% en disolución y distribución de iones cloruro (esferas verdes) y moléculas de agua (bolas rojas y blancas) hasta 21Å respecto del centro de masas del fragmento PAMAM-G4 (zoom).

Con el fin de determinar la influencia que presenta la pegilación en la formación de complejos supramoleculares droga-dendrímico, en la siguiente sección se presentan los resultados obtenidos a partir de simulaciones de DM para el estudio de los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 en presencia de moléculas de 5FU y MTX.

3.1.2 Efectos de la pegilación sobre la capacidad de complejación de los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4.

Evidencia experimental ha mostrado que la pegilación de dendrímeros PAMAM además reducir la toxicidad de estos sistemas hasta hacerlos biomiméticos, también conlleva notables mejoras en la eficiencia de encapsulación, biodistribución y en la solubilidad de distintos tipos de drogas anticancerígenas, incluidas entre ellas 5FU y MTX^{12,34,38,40,84}. Sin embargo, a la fecha existe una falta de información respecto al grado de pegilación que permita obtener el mejor rendimiento en el proceso de complejación con estos fármacos, información que resulta crucial a la hora de diseñar un sistema eficiente de administración de fármacos contra el cáncer basado en dendrímeros PEG-PAMAM.

Con el fin de obtener información acerca de los aspectos moleculares implicados en el proceso de asociación de fármacos anticancerígenos con los dendrímeros PAMAM pegilados, se realizaron simulaciones de DM en disolución acuosa para dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 con diferentes grados de pegilación en presencia de un exceso de moléculas de droga (5FU y MTX), a modo de simular las condiciones experimentales descritas en capítulo 2.

Complejos 5FU:dendrímico

En una primera etapa se estudió la complejación de 5FU con el dendrímico PAMAM-G4 nativo y con los sistemas pegilados con grados de pegilación variables entre un 25-100%. Los resultados obtenidos indican que finalizados los 30 ns de simulación de DM, algunas de las moléculas de fármaco distribuidas inicialmente alrededor de la estructura de los transportadores están complejadas con los dendrímeros, mientras que una gran porción de ellas quedan en disolución como se muestra en la Figura 15. En la Figura también se observa que las moléculas de 5FU, se distribuyen entre las cavidades hidrófobas y los grupos amino superficiales en el sistema PAMAM-G4 (a).

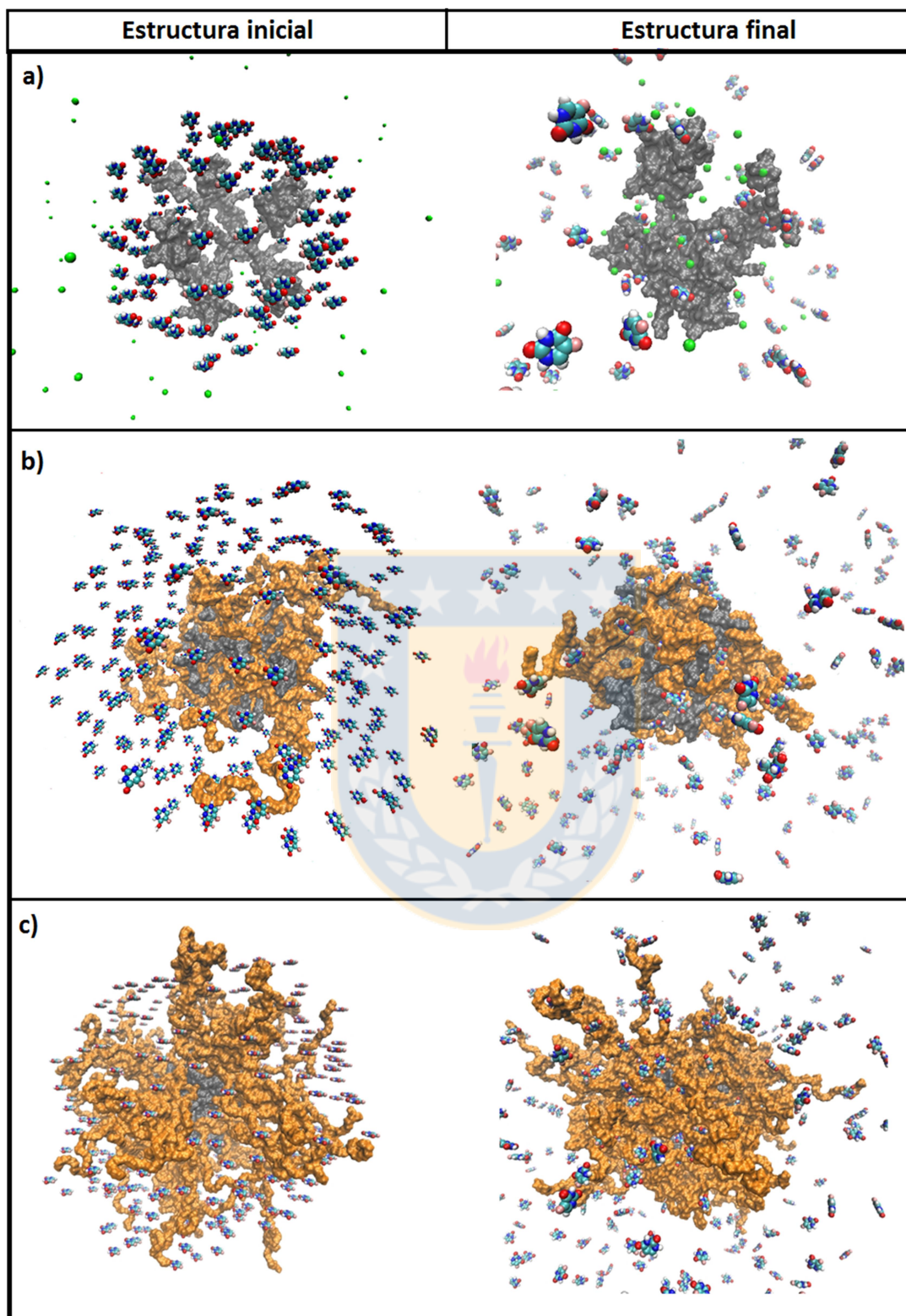


Figura 15: Distribución de moléculas de 5FU al inicio y al final de la simulación de DM para los complejos con PAMAM-G4 (a) y los sistemas pegilados al 25% (b) y 100% (c).

En el sistema con un 25% de pegilación (b), se observan moléculas de droga complejadas interaccionando tanto con el fragmento PAMAM-G4 (en gris), como con las cadenas de PEG periféricas (en naranja), a lo que llamaremos complejación interna y externa respectivamente. En cuanto al sistema con un grado de pegilación del 100% [Figura 15 (c)] no se aprecia claramente la existencia de moléculas de 5FU complejadas internamente, mientras que la complejación externa de esta droga parece haber tenido un aumento sustancial respecto del sistema con un 25% de pegilación.

A partir de las trayectorias de DM para los complejos 5FU:dendrímtero, se evaluó la evolución temporal del proceso de complejación de las moléculas de 5FU en estos sistemas transportadores. Los resultados obtenidos sugieren que el proceso de complejación parece haber alcanzado una condición de equilibrio dinámico durante los últimos 5-10 ns de simulación, lo que se refleja en la estabilización del número total de moléculas de droga complejadas dentro de los sistemas PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 [Figura 16].

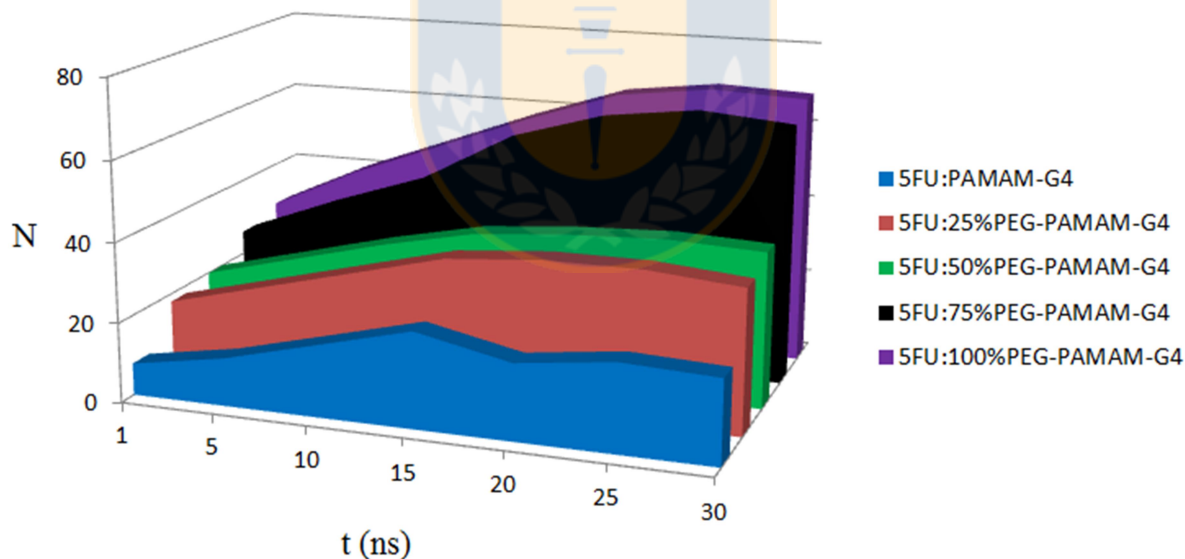


Figura 16: Evolución temporal del número total de moléculas de 5FU complejadas (N) con los dendrímeros PAMAM-G4 nativo y los sistema pegilados PEG-PAMAM-G4.

En esta condición de equilibrio, el número promedio de moléculas de 5FU complejadas permanece estable en el tiempo. Para evaluar la distribución de las moléculas de droga complejadas en función del tiempo de simulación y determinar las correspondientes estequiometrías droga:dendrúmero, se calculó la fdr de las moléculas de 5FU en función del centro de masas de los sistemas transportadores en diferentes etapas de las simulaciones de DM. Para ello, se utilizó el radio de giro (R_g) del dendrúmero PAMAM-G4 (20.7 Å) como criterio para discriminar entre las moléculas de fármaco complejadas internamente de las externamente complejadas. De acuerdo a los perfiles de distribución radial [Figura 17], después de los 20 ns de simulación se maximiza el número de drogas complejadas internamente y los sistemas parecen alcanzar un estado de equilibrio dinámico durante los últimos 5ns. Además, los perfiles de fdr indican que la pegilación tiene un fuerte efecto sobre la distribución espacial de las moléculas de fármaco complejadas con todos los sistemas transportadores. En el dendrúmero PAMAM-G4 nativo, las moléculas de 5FU penetran la región más interna del dendrúmero (5-10 Å) en todas las etapas de simulación, mientras que para el sistema 25%PEG-PAMAM-G4 se observa que la encapsulación de estas drogas en la zona más interna comienza a partir de los 10 ns de simulación. Este resultado indica que la difusión de moléculas de 5FU se ve disminuida producto de la pegilación, sin embargo grados de sustitución del 25% no parecen limitar la capacidad de complejación interna del nanotransportador. En los sistemas con grados de pegilación superiores al 50%, la encapsulación interna de 5FU se produce preferentemente entre las ramas intermedias y externas del fragmento PAMAM-G4, en la región comprendida entre 10-20 Å desde el centro de la masa dendrúmero. Por otra parte, en estos sistemas con altos grados de pegilación pasados los 20 ns de simulación se observan zonas de máximos en la función de distribución, en el intervalo radial comprendido entre 20 y 42 Å, que corresponde a las moléculas de 5FU complejadas con las cadenas de PEG. Estos resultados confirman la hipótesis preliminarmente planteada acerca de la disminución en la capacidad de encapsulación interna en dendrúmeros PAMAM-G4 con altos grados de pegilación como consecuencia de la alta densidad superficial ejercida por las cadenas de PEG, las que bloquean la difusión de moléculas de fármaco hacia las cavidades más interiores del fragmento PAMAM-G4 en sistemas con altos grados de pegilación.

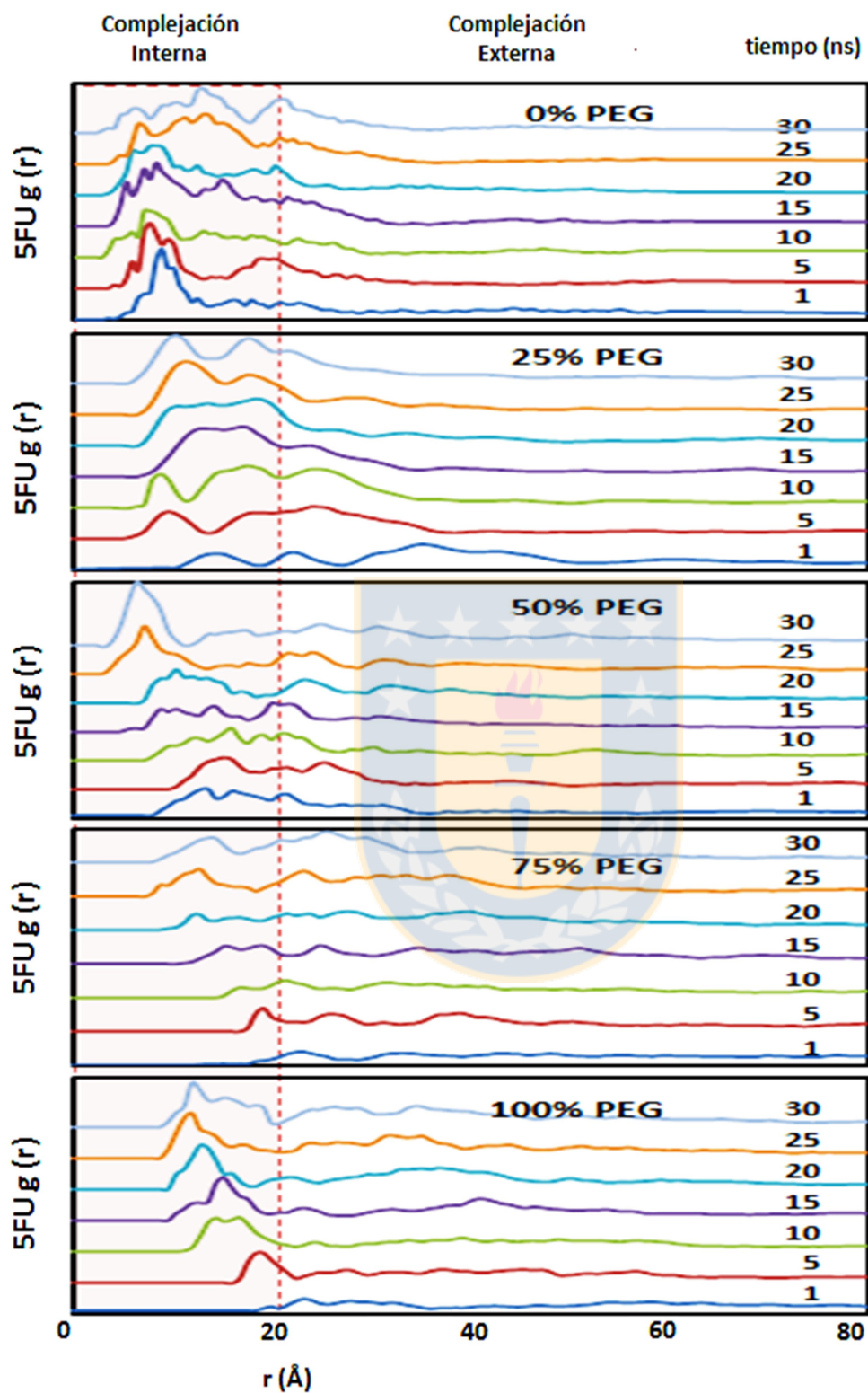


Figura 17: Perfiles de distribución radial de las moléculas de 5FU respecto del centro de masa de los transportadores en distintas etapas de la simulación de DM.

Para determinar las estequiometrías promedio de los complejos 5FU:dendrúmero, se consideraron sólo los últimos 5 ns de simulación, debido a que en este periodo de tiempo se observó una estabilización en el número promedio de drogas complejadas. En la Tabla 6, se reportan las estequiometrías promedio calculadas para estos complejos junto con el número promedio de drogas complejadas interna y externamente. Los resultados muestran que el dendrúmero PAMAM-G4 logró complejar en promedio 22 moléculas de 5FU, valor que está muy próximo a los reportes experimentales de Buczkowski y su equipo⁷⁷, trabajo en el cual mediante análisis de calorimetría isotérmica de titulación los autores encontraron que existían 25 ± 3 moléculas de 5FU complejadas por molécula de dendrúmero PAMAM-G4. Este resultado es altamente auspicioso teniendo en cuenta la complejidad de los sistemas simulados y las limitaciones propias de muestreo que presentan las simulaciones de MD clásicas. Además, este resultado sustentan la validez del enfoque químico-computacional utilizado para estudiar la formación de complejos supramoleculares entre drogas y dendrúmeros PAMAM, lo que motivó su aplicación en sistemas para los que hasta la fecha no existe información experimental, como es el caso de varios de los dendrúmeros PEG-PAMAM estudiados en esta tesis doctoral.

Tabla 6: Estequiometrías droga:dendrúmero promedio, obtenidas a partir de los últimos 5ns de simulación de Dinámica Molecular (DM) para los complejos 5FU:PAMAM-G4 y 5FU:PEG-PAMAM-G4 .

Complejo	Estequiometría droga:dendrúmero promedio	Moléculas de droga complejadas internamente	Moléculas de droga complejadas externamente
5FU:PAMAM-G4	22:1	15 ± 1	7 ± 2
5FU:25% PEG-PAMAM-G4	37:1	15 ± 2	22 ± 4
5FU:50% PEG-PAMAM-G4	39:1	9 ± 1	30 ± 3
5FU:75% PEG-PAMAM-G4	65:1	8 ± 1	57 ± 3
5FU:100% PEG-PAMAM-G4	69:1	8 ± 1	61 ± 4

Los resultados obtenidos para los complejos formados entre 5FU y los sistemas pegilados muestran un aumento sostenido en la capacidad de complejación de los transportadores con el incremento del grado de pegilación, lo que reproduce satisfactoriamente la información experimental acerca del aumento en la capacidad de complejación que presentan los dendrímeros PAMAM producto de la pegilación. En la Tabla 6 se observa un aumento en la cantidad total de droga complejada con el aumento del grado de pegilación, encontrando una máxima de 69 moléculas de 5FU complejadas al utilizar el sistema con un 100% de pegilación (100%PEGPAMAM-G4), las que representan aproximadamente el doble de moléculas de 5FU complejadas con respecto al sistema pegilado en un 25%.

En cuanto a la cantidad de moléculas de fármaco interna y externamente complejadas, los resultados evidencian una disminución sustancial en el número de moléculas de 5FU complejadas internamente en sistemas con grados de pegilación mayores al 50%. Por ejemplo, en el sistemas con un 25% de pegilación se encontraron en promedio 15 ± 2 moléculas de 5FU distribuidas entre las cavidades del fragmento PAMAM-G4, las que representan cerca del 40% del total complejo. Este resultado indica que este sistema mantiene la capacidad de complejación interna presentada por el dendrímero PAMAM-G4 nativo. Mientras tanto, en los sistemas con un 75% y un 100% de pegilación sólo se encontraron 8 ± 1 moléculas de 5FU distribuidas dentro de las ramas del fragmento PAMAM-G4, indicando una reducción de la capacidad de complejación interna cercana al 50% en estos sistemas, mientras que la proporción de las moléculas de 5FU complejadas con las cadenas de PEG representa más del 85% del total de droga complejada.

La reducción en la capacidad de complejación interna de los sistemas con altos grados de pegilación ($\geq 50\%$) podría ser consecuencia del impedimento estérico producido por cadenas de PEG, las que podrían dificultar la difusión de las moléculas de 5FU hacia las cavidades más interiores del dendrímero, como se anticipó en la sección anterior. Adicionalmente, esta disminución casi sistemática en la cantidad de droga complejada internamente producto del aumento del grado de pegilación, podría ser también producto de la mayor afinidad de esta droga de carácter polar por las cadenas de PEG (de fuerte carácter hidrofílico), que por las cavidades interiores del dendrímero, que como se discutió previamente en la sección 3.1.1, ven incrementado su carácter hidrófobo producto de la

pegilación. En base a estos resultados, la pegilación parcial (25%) del dendrímero PAMAM-G4 parece proporcionar el mejor rendimiento en la capacidad de complejación de 5FU, ya que la utilización de grados de pegilación mayores al 50% dificulta la complejación interna de esta droga, a pesar del alto número de moléculas de fármaco complejadas en estos sistemas, que surge exclusivamente de la interacción de esta droga con las cadenas de PEG periféricas, desde donde la droga tiende a escapar más fácilmente del complejo debido a su elevada solubilidad en disolución acuosa.

Complejos MTX:dendrímero

Se estudió la complejación de moléculas de MTX, una droga de baja solubilidad y presente como un dianión en disolución acuosa con el dendrímero PAMAM-G4 nativo y sistemas pegilados en un 25% y 100% de pegilación. Los resultados muestran que finalizados los 30 ns de simulación de DM, gran parte las moléculas de MTX presentes inicialmente en disolución son complejadas con los sistemas transportadores [Figura 18]. En el complejo formado con el dendrímero nativo [Figura 18 (a)], se observa que las moléculas de MTX complejadas son distribuidas tanto en la periferia, donde existe una fuerte interacción electrostática entre los grupos carboxilato de la droga y los grupos amino protonados del dendrímero, como con las cadenas hidrofóbicas del dendrímero. En el sistema pegilado al 25% [Figura 18 (b)], se observa la interacción de moléculas de MTX tanto con las cadenas de PEG, como con las ramas del dendrímero, interacción que se ve limitada en el sistema pegilado al 100% [Figura 18 (c)].

Al igual que para los complejos 5FU:dendrímero, en los complejos MTX:dendrímero se evaluó la evolución temporal del proceso de complejación a partir de las trayectorias de DM. Los resultados obtenidos sugieren que después de los 20 ns de simulación se maximiza el número de drogas complejadas y el proceso de complejación parece haber alcanzado una condición de equilibrio dinámico durante los últimos 10 ns de simulación, lo que se desprende de la estabilización en el número total de moléculas de droga complejadas con los sistemas transportadores [Figura 19].

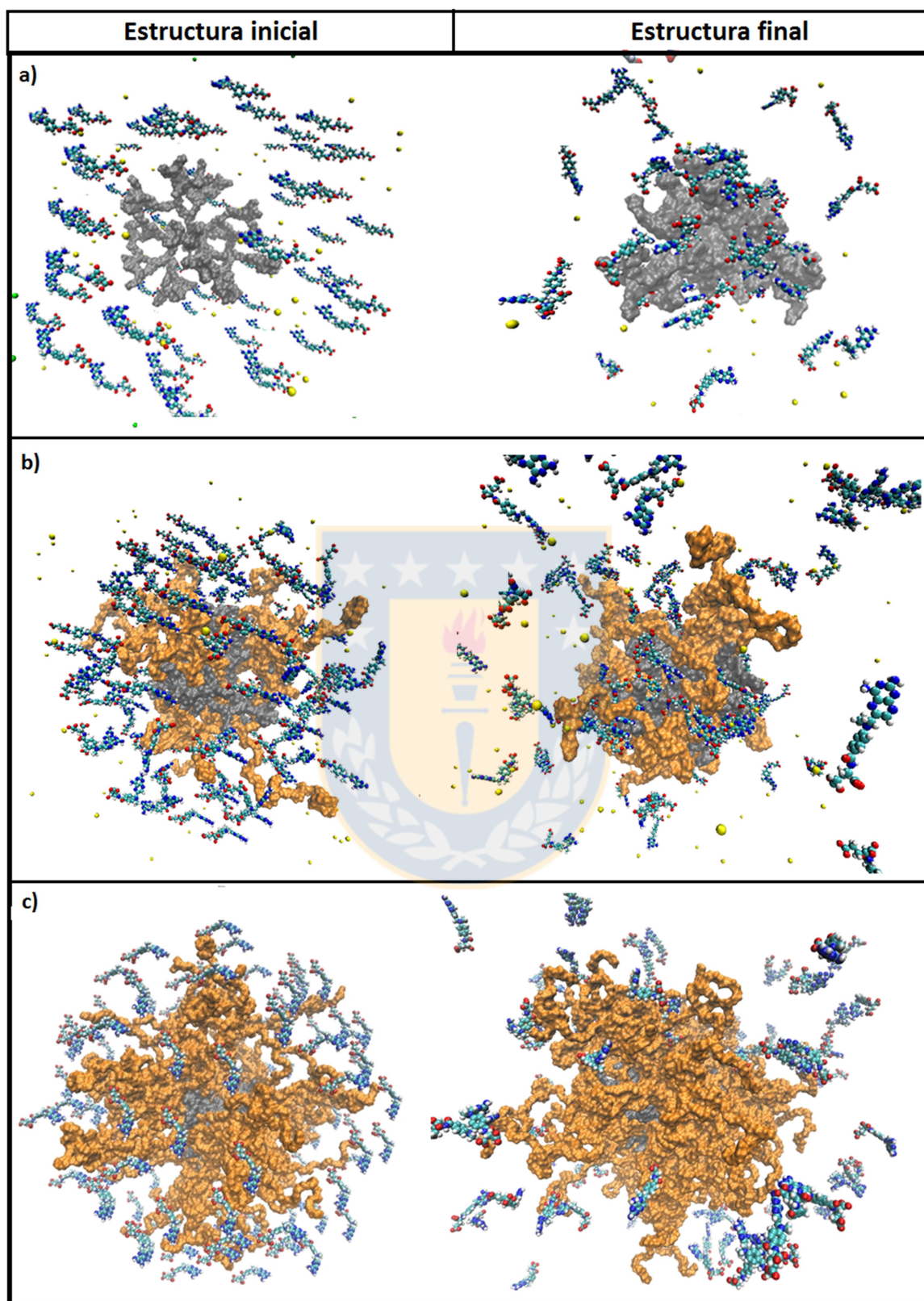


Figura 18: Distribución de moléculas de MTX al inicio y al final de la simulación de DM para los complejos con PAMAM-G4 (a) y los sistemas pegilados al 25% (b) y 100% (c).

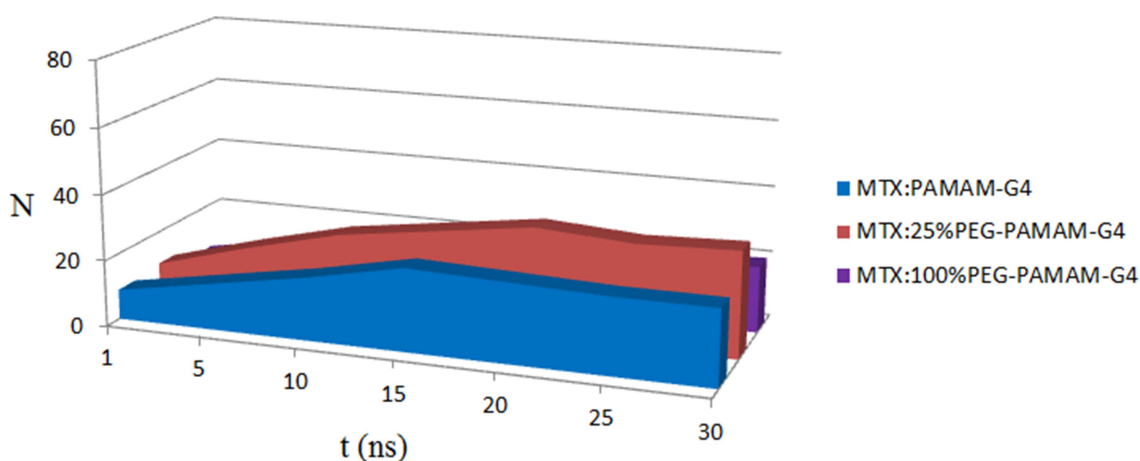


Figura 19: Evolución temporal del número total de moléculas de MTX complejadas (N) con los dendrímeros PAMAM-G4 nativo y los sistemas pegilados al 25% y 100%.

Se evaluó la distribución de moléculas de MTX complejadas en diferentes etapas de las trayectorias obtenidas a partir de simulaciones de DM, mediante el cálculo de la fdr de la droga en función del centro de masa de los sistemas transportadores [Figura 20]. Los resultados sugieren que en el dendrímero nativo la complejación interna de MTX parece ser predominante sobre la complejación externa, la que es producto de la interacción carga-carga entre los grupos carboxilato de MTX y los grupos amino protonados superficiales del dendrímero. Este resultado podría ser atribuido al fuerte carácter hidrofóbico que presenta MTX. En el sistema pegilado al 25%, se observan perfiles de distribución equivalentes entre la complejación interna y externa, mientras que en el sistema con un 100% de pegilación, es la complejación externa la interacción predominante.

En base a lo observado en la evolución temporal del proceso de complejación de las moléculas de MTX, se determinaron las estequiometrías promedio para los complejos MTX:dendrímero, y el número promedio de moléculas de fármaco interna y externamente complejadas considerando solamente los últimos 5 ns de simulación, resultados que se presentan en la Tabla 7.

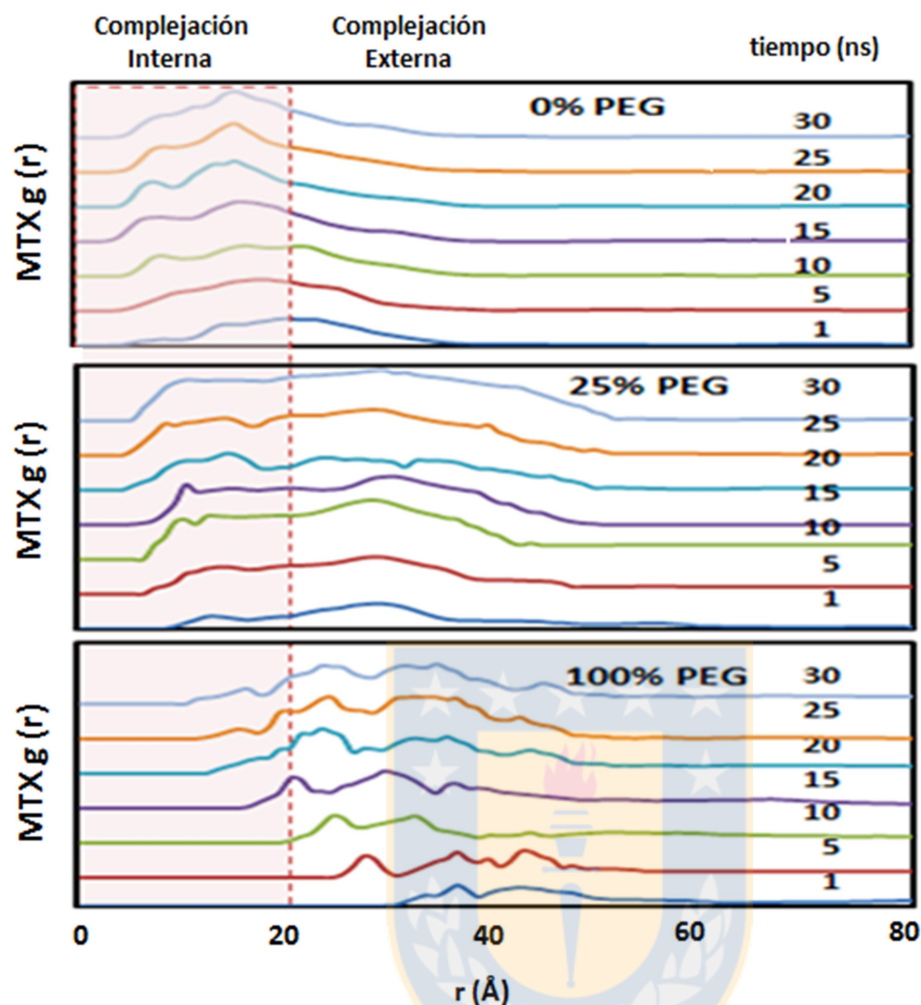


Figura 20: Perfiles de distribución radial de las moléculas de MTX respecto del centro de masa de los transportadores en distintas etapas de la simulación de DM.

Tabla 7: Estequiometrías droga:dendrímtero promedio obtenidas a partir de los últimos 5ns de simulación de Dinámica Molecular (DM) para los complejos MTX:PAMAM-G4, MTX:25%PEG-PAMAM-G4 y MTX:100%PEG-PAMAM-G4.

Complejo	Estequiometría droga:dendrímtero promedio	Moléculas de droga complejadas internamente	Moléculas de droga complejadas externamente
MTX:PAMAM-G4	23:1	15 ± 2	8 ± 3
MTX:25% PEG-PAMAM-G4	32:1	16 ± 1	16 ± 4
MTX:100%PEG-PAMAM-G4	20:1	6 ± 1	14 ± 6

Los resultados obtenidos muestran que una molécula de dendrímero PAMAM-G4 logra complejar en promedio, 23 moléculas de MTX, resultado que guarda buena relación con las determinaciones experimentales de Jiang y coautores⁴⁷, trabajo en donde a partir de curvas de solubilidad, se reportó una estequiometría de 22:1. Sumado a esto, los resultados aquí expuestos revelan que la complejación de esta droga se ve favorecida solo producto de la pegilación parcial del dendrímero, alcanzando un máximo en el total de droga complejada al utilizar el sistemas con un grado de pegilación del 25%, el cual logró complejar en promedio 32 moléculas de MTX. En cuanto a la complejación interna, en este sistema no se observó una disminución en la cantidad de droga complejada internamente (con respecto al dendrímero PAMAM-G4 nativo), la que representó un 50% del total complejado. En cambio, el sistema con un 100% de pegilación presentó una disminución tanto en la cantidad total de droga complejada, como en la droga complejada internamente. En este sistema se obtuvo una estequiometría promedio de 20:1, en concordancia con valores experimentales reportados previamente por Kojima y colaboradores para la estequiometría de este complejo (26:1), lo que da cuenta del buen desempeño de los parámetros utilizados y de la validez de la metodología empleada para estudiar la formación de los complejos droga:dendrímero. Por otro lado, se observó una fuerte disminución en la capacidad de complejación interna de este sistema, para el que se encontraron 6 ± 1 moléculas de MTX albergadas entre las ramas del fragmento PAMAM-G4, las que representan tan solo un 30% del total complejado.

Los resultados presentados en esta sección dan cuenta de una fuerte dependencia en los sitios preferenciales de interacción y la capacidad de complejación de los sistemas transportadores con la naturaleza química de la droga utilizada. Por lo tanto, con el objetivo de lograr una comprensión más acabada acerca de la dependencia que existe entre la naturaleza química de los fármacos en estudio y la formación de los complejos droga:dendrímero, en la siguiente sección se proporcionan detalles acerca de las fuerzas intermoleculares responsables de la estabilización de las drogas complejadas y sobre aspectos moleculares implicados en la formación de estos complejos supramoleculares.

3.1.3 Fuerzas intermoleculares implicadas en la formación de complejos supramoleculares droga:dendrímico.

Con el fin de proporcionar información respecto a la influencia de naturaleza química de las drogas en estudio sobre fenómeno de asociación droga-dendrímico, se calcularon las energías de van der Waals y energías electrostáticas para los complejos supramoleculares formados entre 5FU y MTX con el dendrímico PAMAM-G4 nativo y los sistemas pegilados durante los últimos 5 ns de simulación de DM, tiempo en el cual se alcanzó un estado de equilibrio dinámico, de acuerdo con el análisis de los perfiles de fdr discutidos anteriormente. Además de las energías de interacción de van der Waals y electrostáticas, se determinó la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre las moléculas de fármaco y los nanotransportadores.

Complejos 5FU:dendrímico

Las energías de van der Waals y electrostáticas calculadas para la interacción entre moléculas de 5FU y los transportadores fueron normalizadas por el número promedio de moléculas de droga que interactúan con cada segmento del sistema transportador, es decir con el segmento PAMAM-G4 y con cadenas de PEG, como se muestra en la Tabla 8. Los resultados obtenidos revelan que la estabilización de las moléculas de 5FU albergadas al interior de las cavidades hidrofóbicas del fragmento PAMAM-G4 (tanto del dendrímico nativo, como de los sistemas pegilados) está mediada por contribuciones equivalentes de la energía de interacción electrostática ($\sim 6 \pm 2 \text{ kcal mol}^{-1}$) y las interacciones de van Waals ($\sim 7 \pm 1 \text{ kcal mol}^{-1}$). Por su parte, las moléculas de 5FU complejadas con las cadenas de PEG son estabilizadas por ambas energías de interacción, pero los resultados sugieren que las fuerzas de van der Waals representan la interacción predominantes para la complejación externa de 5FU. En términos cuantitativos, los altos valores obtenidos en las energías de interacción de van der Waals para la complejación de 5FU con las cadenas de PEG ($\sim 11 \pm 1 \text{ kcal mol}^{-1}$) pueden estar asociados a un efecto acumulativo de múltiples interacciones entre esta droga con las cadenas de PEG (2000 g/mol), que son de un tamaño considerablemente mayor en comparación con las ramas del fragmento PAMAM-G4. Por lo tanto, la disminución en la capacidad de complejación interna de los sistemas con altos grados de pegilación ($\geq 50\%$) surge debido a que la complejación externa de las moléculas

de 5FU es energéticamente más favorable que la complejación interna, lo que sumado al impedimento estérico de las cadenas de PEG, podrían limitar la ulterior migración de esta droga hacia las cavidades hidrofóbicas del fragmento PAMAM-G4.

Tabla 8: Energías de interacción promedio (kcal mol^{-1}), para los complejos supramoleculares 5FU:PAMAM-G4 y 5FU-PEG-PAMAM-G4, obtenidas a partir de los últimos 5 ns de simulación de dinámica molecular.

Sistema	Interacción droga-PAMAM		Interacción droga-PEG	
	E_{vdw} (kcal mol^{-1})	E_{elec} (kcal mol^{-1})	E_{vdw} (kcal mol^{-1})	E_{elec} (kcal mol^{-1})
5FU:PAMAM-G4	-8.3 ± 1.0	-6.8 ± 1.8	-	-
5FU:25%PEG-PAMAM-G4	-6.6 ± 0.8	-6.2 ± 1.9	-9.3 ± 0.9	-6.2 ± 1.0
5FU:50%PEG-PAMAM-G4	-7.6 ± 1.1	-7.9 ± 1.8	-11.7 ± 0.7	-7.8 ± 0.9
5FU:75%PEG-PAMAM-G4	-7.1 ± 1.0	-6.3 ± 1.3	-11.6 ± 0.9	-7.3 ± 0.8
5FU:100%PEG-PAMAM-G4	-7.7 ± 1.3	-6.4 ± 1.8	-11.2 ± 0.5	-8.1 ± 0.9

Otra de las fuerzas intermoleculares importantes a considerar en la formación de cualquier complejo supramolecular son los enlaces de hidrógeno, los que pueden llegar a contribuir alrededor de 5 kcal mol^{-1} a la estabilidad de los complejos. La contribución de los enlaces de hidrógeno intermoleculares a la formación de los complejos droga-dendrímico se evaluó a partir de una serie de análisis de funciones de distribución radial entre pares de átomos donante-aceptor de enlace hidrógeno presentes en las drogas y los sistemas transportadores. Se consideró como criterio para la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares que la distancia interatómica entre los heteroátomos dador-aceptor debería ser igual o inferior a la suma de sus respectivos radios de van der Waals ($3.2 \text{ \AA}$), que el ángulo de enlace correspondiente fuese mayor de 120° y que dicha interacción presente una ocupancia mayor al 50%. De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 9, el dendrímico PAMAM-G4 nativo actúa principalmente como aceptor de hidrógeno con 5FU a través de la interacción entre los átomos de oxígeno carbonílicos de sus ramas de la segunda, tercera, y cuarta generación, (es decir, O-G2, O-G3 y O-G4, respectivamente) con los átomos de

nitrógeno de la droga (N1-H y N3-H). En los sistemas pegilados, el fragmento PAMAM además de actuar como aceptor de hidrógeno, también actúa como dador de hidrógeno a través de la interacción de los grupos amida presentes en las ramas de la segunda, tercera y cuarta generación (NH-G2, NH-G3, y NH-G4, respectivamente) con átomos de oxígeno carbonílicos de 5FU (O2 y O4). En el caso de las moléculas de 5FU complejadas con las cadenas de PEG, se observó una serie de enlaces de hidrógeno, donde la droga actuó principalmente como dador de hidrógeno y las cadenas de PEG como aceptores de hidrógeno a través de la interacción de los grupos NH de la droga con los oxígenos de las cadenas de PEG (OPEG).

Tabla 9: Principales interacciones de enlace de hidrógeno encontradas para los complejos supramoleculares droga-dendrímico formados entre 5FU con el dendrímico PAMAM-G4 y los sistemas pegilados, obtenidas a partir de los últimos 5 ns de simulación de dinámica molecular.

Sistema	Átomos presentes en la formación de enlaces de hidrógeno y porcentaje de ocupancia de la interacción (%)			
	Interacción droga-PAMAM	Ocupancia (%)	Interacción droga-PEG	Ocupancia (%)
5FU:PAMAM-G4	O2-NH ₃	57		
	N ₃ H-OcG4	53		
	N ₃ H-OcG3	57		
	N ₁ H-OcG2	53		
	N ₁ H-OcG4	51		
5FU:25% PEG-PAMAM-G4	N ₁ H-OcG2	58	N ₁ H-OPEG	94
	O2-NHG2	55	N ₃ H-OPEG	(50-94)%
5FU:50% PEG-PAMAM-G4	N ₁ H-OcG2	55	N ₁ H-OPEG	(61-96)%
	O2-NHG4	51	N ₃ H-OPEG	(69-94)%
5FU:75% PEG-PAMAM-G4	N ₁ H-OcG4	57	N ₁ H-OPEG	(63-91)%
	O4-NHG3	58	N ₃ H-OPEG	(67-96)%
5FU:100%PEG-PAMAM-G4	O4-NHG3	52	N ₁ H-OPEG	(61-96)%
			N ₃ H-OPEG	(64-98)%

Complejos MTX:dendrímico

Las energías de interacción calculadas para los complejos MTX:dendrímico (Tabla 10), indican que las moléculas de MTX internamente complejadas son estabilizadas por ambas energías de interacción, pero en el dendrímico nativo y el sistema con un 25% de pegilación la contribución de la energía electrostática a la estabilidad del complejo supramolecular es claramente predominante, mientras que en el sistema 100% pegilado la interacción electrostática cae abruptamente, siendo las fuerzas de van der Waals las predominantes en este sistema. Los elevados valores obtenidos para la energía electrostática en los complejos MTX:PAMAM-G4 y MTX:25%PEG-PAMAM-G4 debe ser producto principalmente de la fuerte interacción carga-carga entre los grupos carboxilato de MTX y los grupos amino protonados de PAMAM-G4, lo que explicaría la fuerte caída de la componente electrostática en la estabilización del complejo formado entre MTX y el sistema 100%PEG-PAMAM-G4, el que no presenta grupos amino protonados en su estructura.

Analizando la magnitud de la energía de van der Waals en los complejos MTX:dendrímico es posible observar que esta interacción es prácticamente constante en todos los sistemas, y su contribución a la estabilidad de estos complejos es alrededor de 10 kcal mol⁻¹ más estabilizante que en el caso de los complejos supramoleculares formados con 5FU, resultado que da cuenta del fuerte carácter hidrofóbico de MTX.

Tabla 10: Energías de interacción promedio (kcal mol⁻¹), para los complejos supramoleculares MTX:PAMAM-G4, MTX:25%PEG-PAMAM-G4 y MTX:100%PEG-PAMAM-G4, obtenidas a partir de los últimos 5 ns de simulación de dinámica molecular.

Sistema	Interacción droga-PAMAM		Interacción droga-PEG	
	E _{Vdw} (kcal mol ⁻¹)	E _{elec} (kcal mol ⁻¹)	E _{Vdw} (kcal mol ⁻¹)	E _{elec} (kcal mol ⁻¹)
MTX:PAMAM-G4	-15.4 ± 1.8	-41.8 ± 4.2	-	-
MTX:25%PEG-PAMAM-G4	-16.8 ± 1.3	-31.9 ± 3.6	-12.9 ± 0.5	-20.4 ± 1.7
MTX:100%PEG-PAMAM-G4	-17.2 ± 1.5	-6.9 ± 2.1	-8.1 ± 1.2	-14.9 ± 2.5

En cuanto a la complejación externa de MTX en los sistemas pegilados, los resultados indican una predominancia de la componente electrostática sobre las fuerzas de van der Waals en ambos sistemas. Sumado a esto, se evidencia una disminución de alrededor de 5 kcal mol⁻¹ en ambas interacciones supramoleculares en el complejo MTX:100%PEG-PAMAM-G4 respecto de los valores presentados por el complejo MTX:25%PEG-PAMAM-G4, resultado que es concordante con la disminución en la capacidad de complejación presentada por los sistemas con altos grados de pegilación.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los estudios de formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre MTX y los transportadores (Tabla 11) indican que esta droga participa exclusivamente como aceptor de enlace de hidrógeno a través de la interacción de los oxígenos cargados negativamente de sus grupos carboxilato (O1 y O2 respectivamente) con los grupos amino primarios del fragmento PAMAM-G4 (NH₃), interacciones que se pierden completamente en el sistema con un 100% de pegilación.

Tabla 11: Principales interacciones de enlace de hidrógeno encontradas para los complejos supramoleculares droga-dendrímero formados entre MTX con el dendrímero PAMAM-G4 y los sistemas pegilados, obtenidas a partir de los últimos 5 ns de simulación de Dinámica Molecular.

Sistema	Átomos presentes en la formación de enlaces de Hidrógeno y porcentaje de ocupancia de la interacción (%)			
	Interacción droga-PAMAM	Ocupancia (%)	Interacción droga-PEG	Ocupancia (%)
MTX:PAMAM-G4	O1-NH ₃	(73-98)	-	-
	O2-NH ₃	(67-99)		
	O1- NHG4	65		
	O2- NHG3	(52-70)		
	O1- NHG3	(53-68)		
MTX:25%PEG-PAMAM-G4	O1-NH ₃	(50-96)		
	O2-NH ₃	(51-88)		
	O1- NHG3	54		
	O2- NHG2	56		
MTX:100%PEG-PAMAM-G4	O1- NHG4	52		
	O2- NHG4	57		

Se observó también la formación de enlaces de hidrógeno entre los oxígenos O1 y O2 de la droga con los grupos amida presentes en las ramas de la tercera y segunda generación (NH-G3 y NH-G2), las que también disminuyen considerablemente con el aumento del grado de pegilación. Por otro lado, no se observó formación de enlaces de hidrógeno entre MTX y las cadenas de PEG, ya que estas últimas no presentan grupos dadores de enlace de hidrógeno y MTX actúa principalmente como aceptor. Estos resultados dan cuenta de una marcada diferencia en la capacidad de los sistemas transportadores de formar enlaces de hidrógeno de las dos drogas en estudio, ya que mientras 5FU forma un gran número de enlaces de hidrógeno con las cadenas de PEG periféricas, MTX presenta varias interacciones de enlaces de hidrógeno con el fragmento PAMAM-G4 más interno, diferencias que pueden ser relevante en la capacidad de los sistema transportadores para retener la carga farmacológica de dichas drogas.



3.2 Parte Experimental.

3.2.1 Síntesis de p-nitrofenil carbonato de pegilo (NFC-PEG).

Polietilenglicol metileter (PEG) comercial de masa molar promedio 2000 g/mol fue conjugado covalentemente con p-nitrofenil cloroformato (NFC) para obtener p-nitrofenil carbonato de pegilo (NFC-PEG), el que posteriormente se utilizó para la síntesis de los dendrímeros pegilados. Terminada la reacción se obtuvieron 2.07 mmol de un compuesto sólido amarillento, lo que representa un rendimiento del 57.6%. La formación del producto de interés fue confirmada mediante espectroscopía IR y ^1H -RMN.

En la Figura 21 se muestran los espectros IR para los reactantes utilizados y el producto obtenido, el que presenta las señales características de ambos reactantes, que son la señal a $1740\text{ (cm}^{-1}\text{)}$, correspondiente a la tensión del grupo carbonilo de NFC, y las señales a $1100\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ y $2870\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ que corresponden a la tensión C-O de las cadenas de PEG y a la tensión C-H de los metilenos alifáticos de PEG, respectivamente. En la Figura 22 se muestran los espectros de RMN ^1H en CDCl_3 para PEG comercial y NFC-PEG, en ella se observa que el producto de la reacción presenta las señales características de PEG, como el singlete correspondiente a los protones del grupo metoxilo terminal de PEG ($\text{Hd } \delta=3.31$), y la señal de alta intensidad correspondiente a los metilenos de PEG ($\text{Hx } \delta=3.85\text{-}3.44$), junto con un par de dobletes a campo bajo ($\text{Ha } \delta=7.37$ y $\text{Hb } \delta=8.26$) que corresponden a los núcleos de hidrógeno del anillo aromático del grupo p-nitrofenilo de NFC, y el triplete correspondiente al metileno unido al átomo de oxígeno del carbonato ($\delta=4.46$), lo que confirma la unión covalente entre las cadenas de PEG y NFC³⁶. La relación obtenida para las señales mencionadas fue 3:178:2.1:2.1:1.9, lo que sugiere que el producto obtenido se encuentra libre de PEG sin reaccionar.

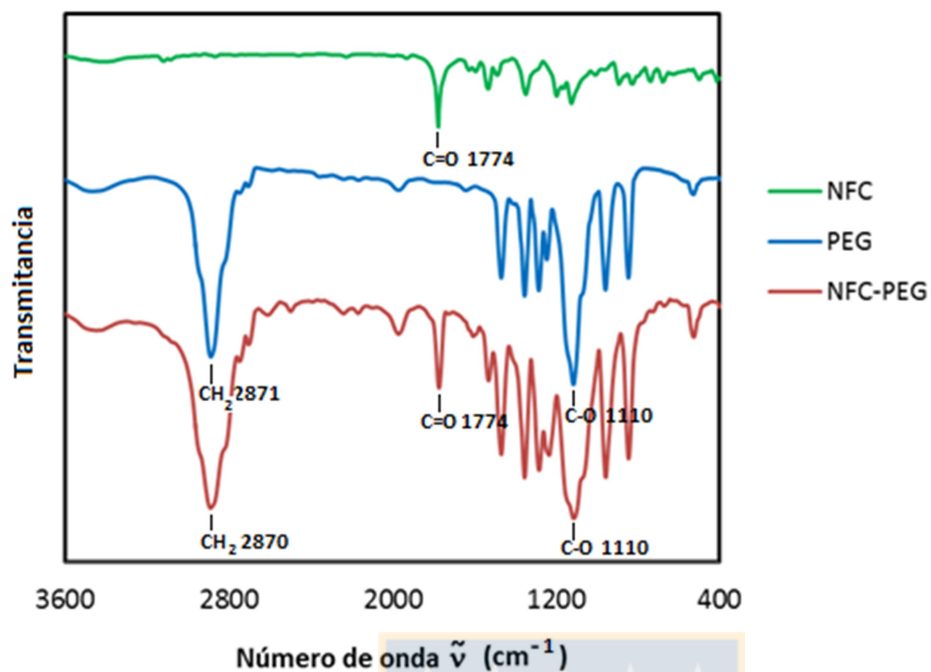


Figura 21: Espectros IR para reactantes (NFC y PEG) y para el producto de la síntesis de p-nitrofenil carbonato de pegilo (NFC-PEG).

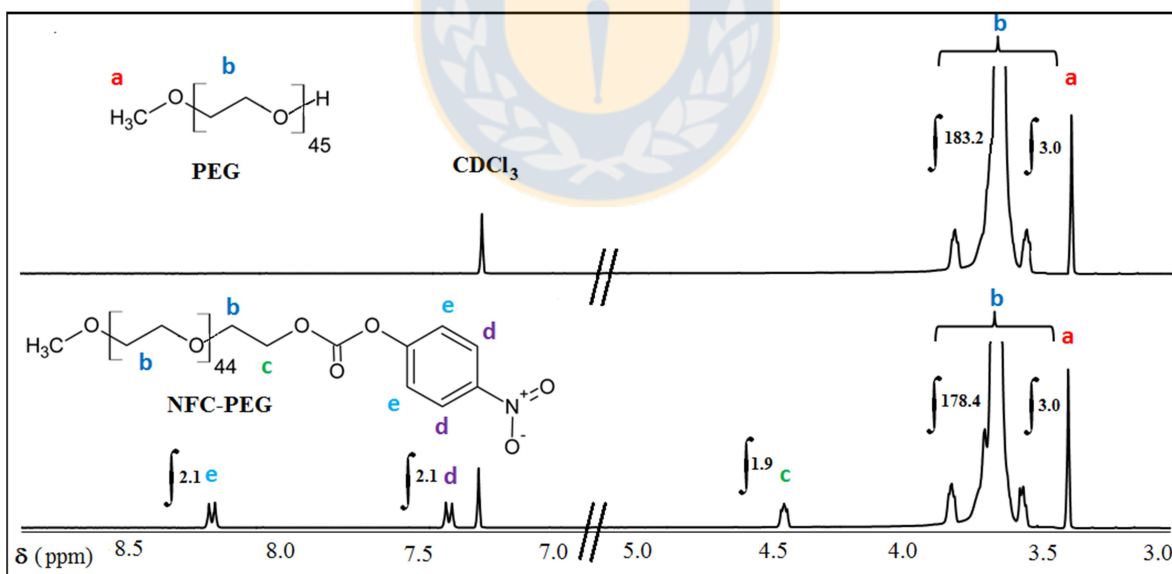


Figura 22: Espectro de ^1H -RMN (en CDCl_3) de PEG comercial y de NFC-PEG obtenido por síntesis.

3.2.2 Síntesis y caracterización de dendrímeros PEG-PAMAM-G4.

Se sintetizaron dendrímeros PEG-PAMAM-G4 con diferentes grados de pegilación a partir de un dendrímero PAMAM-G4 comercial y el NFC-PEG obtenido en la etapa anterior. Los productos obtenidos fueron sometidos a un riguroso proceso de purificación usando el método de diálisis como se describió en el capítulo 2, obteniéndose sólidos de color amarillo para todos los grados de pegilación considerados. La formación de los productos de interés se corroboró mediante espectroscopia IR y ^1H -RMN, como se muestra en las Figuras 23 y 24 respectivamente. En la Figura 23 se puede observar que los sistemas pegilados presentan una banda de absorción a 1108 cm^{-1} correspondiente a la tensión del enlace simple C-O de las cadenas de PEG, cuya intensidad se ve incrementada con el aumento en el grado de pegilación de los sistemas PEG-PAMAM-G4. Adicionalmente, en los sistemas pegilados se observa una banda de absorción a 1731 cm^{-1} , que corresponde al grupo carbonilo presente en la unión de las cadenas de PEG con los grupos amino superficiales del dendrímero PAMAM-G4.

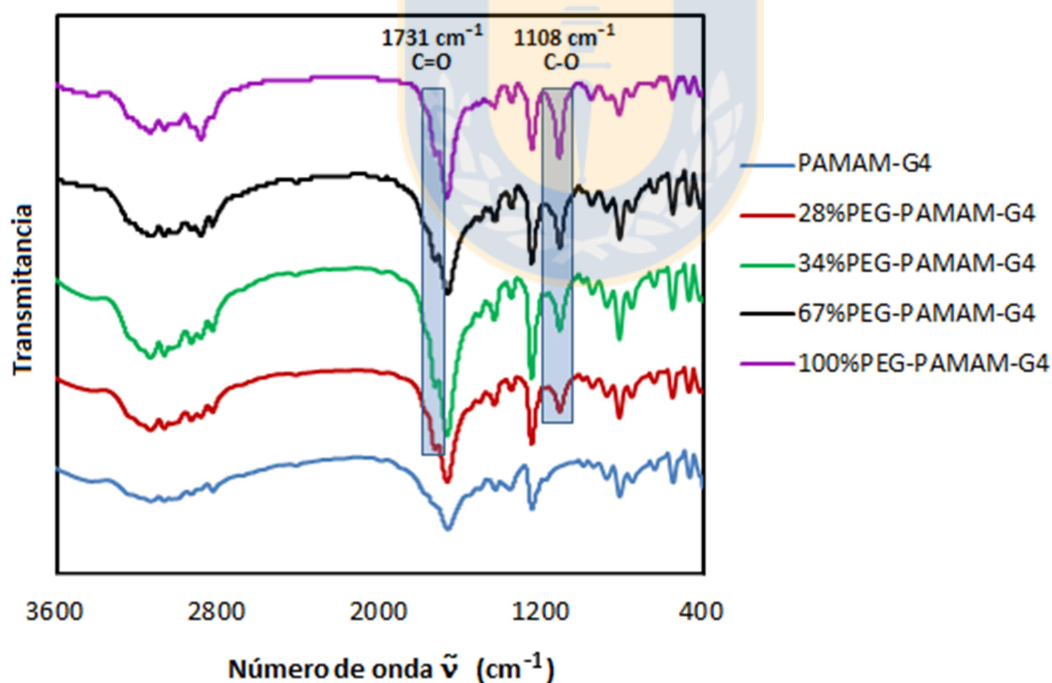


Figura 23: Espectros IR del dendrímero PAMAM-G4 nativo y los sistemas pegilados sintetizados.

Los resultados desprendidos del análisis de GPC revelan que los sistemas pegilados obtenidos de la síntesis poseen estructuras monodispersas, con índices de polidispersidad (IP) que varían en el intervalo de 1.04 a 1.08, mientras que el IP obtenido para dendrímero PAMAM-G4 comercial fue de 1.02, como se muestra en la Tabla 12. Este resultado es altamente auspicioso para el uso de estos sistemas como potenciales transportadores de fármacos anticancerígenos, ya que la monodispersidad es una de las características más particulares de los dendrímeros PAMAM, y es una de las principales diferencias que presentan estos sistemas respecto de los polímeros convencionales utilizados como sistemas transportadores.

Tabla 12: Caracterización de los dendrímeros PEG-PAMAM-G4.

Sistema	Índice de polidispersidad (Mw/Mn)	Cadenas de PEG enlazadas al dendrímero	Masa molecular nominal (g/mol)
PAMAM-G4*	1.02	0	14215
28% PEG-PAMAM-G4	1.04	18	50250
34% PEG-PAMAM-G4	1.06	22	58479
67% PEG-PAMAM-G4	1.08	43	100731
100% PEG-PAMAM-G4	1.06	64	142983

*El dendrímero PAMAM-G4 comercial fue usado como referencia para evaluar el índice de polidispersidad de los sistemas pegilados.

Se determinó el número efectivo de cadenas de PEG unidas a cada uno de los sistemas pegilados mediante integración de las señales características de las cadenas de PEG (Ha y Hb δ 4.2 ppm y δ 3.3 ppm) y de las ramas del fragmento PAMAM (Hc δ 2.3 ppm) en los correspondientes espectros de ^1H -RMN, como se muestra en la Figura 24. De acuerdo con la integración de los espectros de ^1H -RMN, los grados de pegilación experimentales obtenidos para los sistemas transportadores fueron 28%, 34%, 67% y 100%. Esta información, junto con el peso molecular promedio de cadenas de PEG (2000 g/mol) fue empleada para estimar la masa molecular "nominal" de los dendrímeros PEG-PAMAM-G4, información resumida en la Tabla 12.

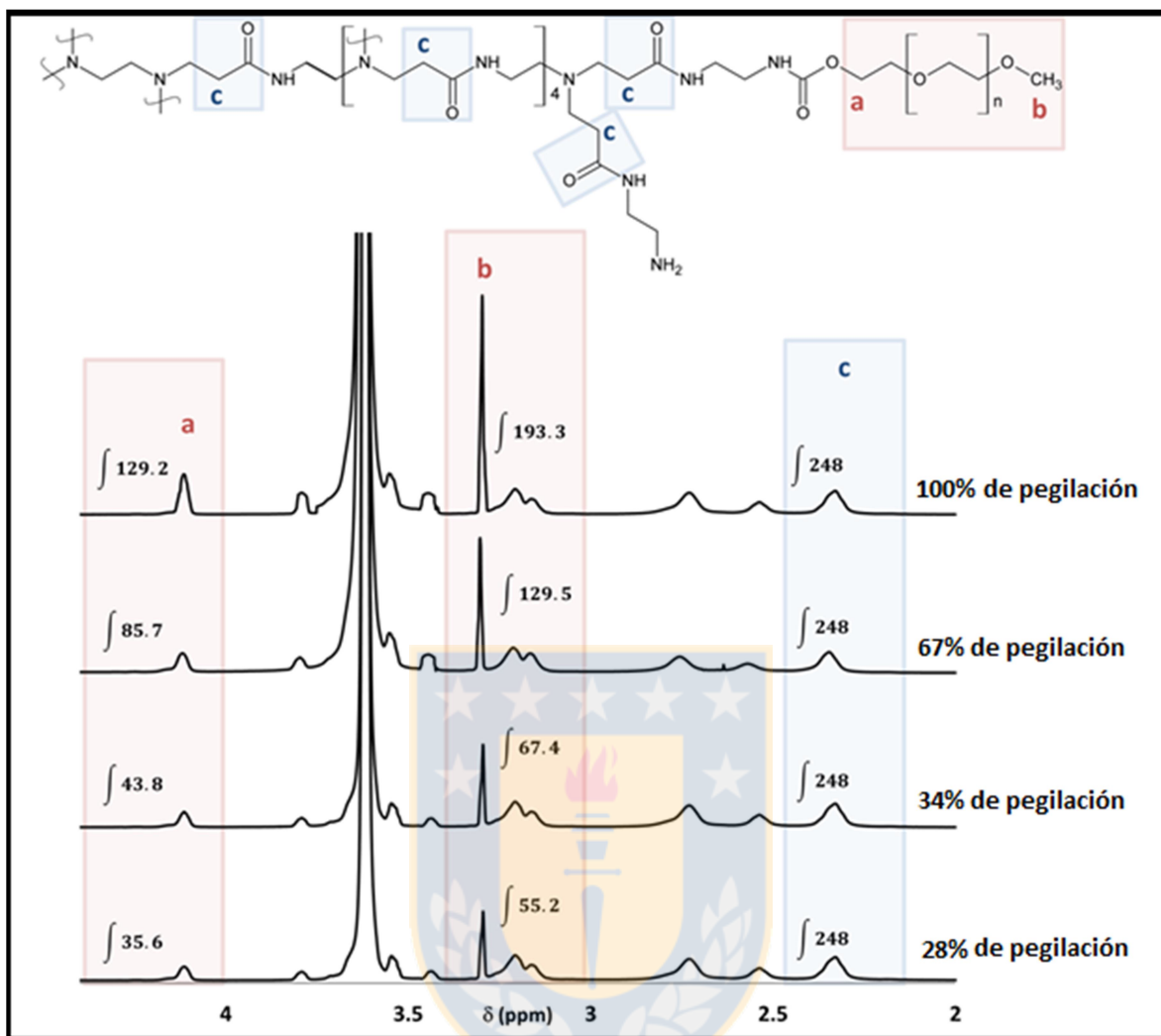


Figura 24: Espectros ^1H -RMN y asignación de las señales características de los sistemas PEG-PAMAM-G4.

Los sistemas pegilados sintetizados en conjunto con el dendrímero PAMAM-G4 nativo, fueron utilizados para evaluar su capacidad de complejación con 5FU y MTX en disolución acuosa, y determinar los sitios preferenciales de interacción, resultados que se discuten a continuación.

3.2.3 Capacidad de los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 para complejar drogas anticancerígenas.

Se realizaron estudios de solubilidad en disolución acuosa para obtener las estequiometrías y constantes de asociación promedio de los complejos droga:dendrúmero formados entre MTX y 5FU con el dendrúmero PAMAM-G4 nativo y los cuatro sistemas pegilados obtenidos sintéticamente, utilizando para ello la formulación de Higuchi y Connors para múltiples sitios de unión⁷⁸. Los perfiles de solubilidad obtenidos para MTX y 5FU en presencia de soluciones de concentraciones crecientes de dendrímeros nativo y pegilados a pH 7.0 se muestran en las Figuras 25 y 26 respectivamente. Los resultados indican que tanto la solubilidad de MTX como la de 5FU aumentan linealmente con la concentración de dendrúmero, tanto para el PAMAM-G4 nativo, como para los sistemas pegilados. De acuerdo con la clasificación para diagramas de solubilidad de Higuchi y Connors, MTX y 5FU presentan perfiles de solubilidad que corresponden a diagramas de tipo A_L , diagramas característicos de la formación de complejos supramoleculares con una estequiometría del tipo $n:1$, donde $n > 1$ ^{24,28,78}.

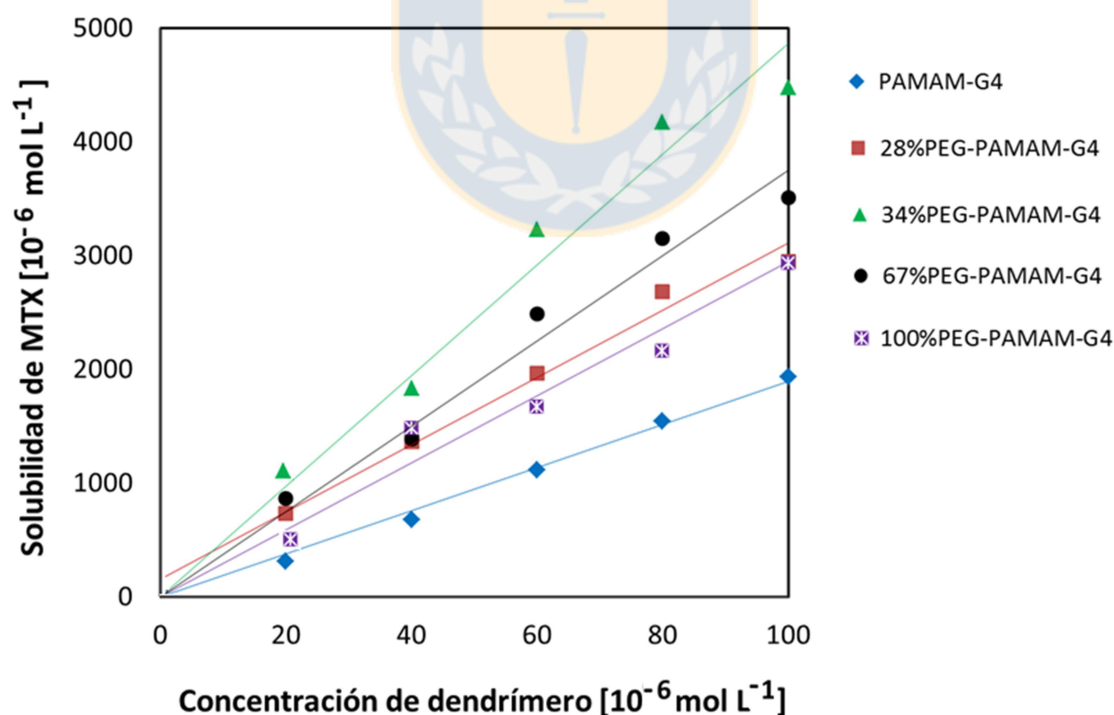


Figura 25: Perfil de solubilidad para MTX en presencia de concentraciones crecientes de dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 a pH 7.0.

En cuanto a la solubilidad intrínseca de MTX, los resultados revelaron un aumento de la solubilidad desde 42.4 (mg/L) en agua pura hasta 878 (mg/L) en PAMAM-G4, 1335 (mg/L) con el sistema pegilado en un 28%, 2032 (mg/L) con el sistema pegilado en un 34%, 1593 (mg/L) con en el sistema pegilado en un 67%, y 1328 (mg/L) con el sistema 100% pegilado, considerando una concentración de 100.0 ($\mu\text{mol L}^{-1}$) para todos los sistemas transportadores. Estos resultados sugieren que la pegilación parcial de dendrímeros PAMAM es la estrategia más adecuada para maximizar la complejación de MTX.

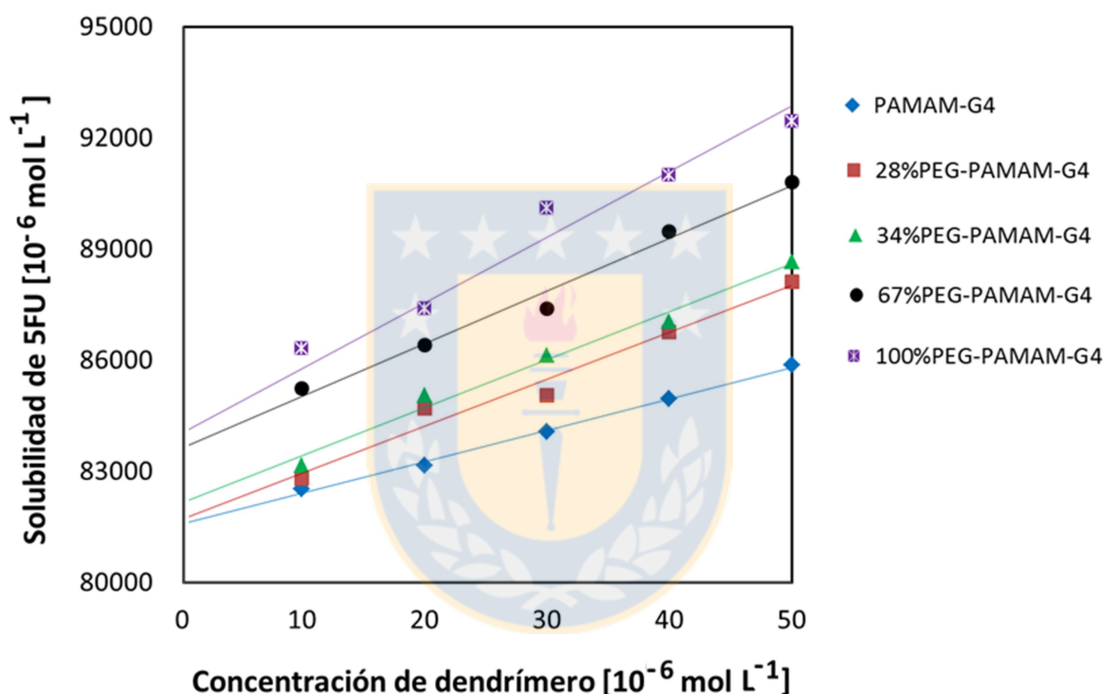


Figura 26: Perfil de solubilidad para 5FU en presencia de concentraciones crecientes de dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4 a pH 7.0.

Por su parte, la solubilidad de 5FU aumenta desde 10,68 (g/L) en disolución acuosa hasta 10.78 (g/L) con PAMAM-G4, 11.46 (g/L) con el sistema pegilado en un 28%, 11.53 (g/L) con el sistema pegilado en un 34%, 11.82 (mg/L) con en el sistema pegilado en un 67%, y finalmente 12.02 (g/L) con el sistema 100% pegilado, considerando una concentración de 50.0 ($\mu\text{mol L}^{-1}$) para todos los sistemas transportadores. Estos resultados sugieren que la complejación de 5FU se ve incrementada conforme aumenta el grado de pegilación, tal y como se predijo a través de las simulaciones de DM, las que además sugirieron que la

estrategia más adecuada para maximizar la complejación interna y externa de 5FU es la pegilación parcial de los dendrímeros PAMAM-G4, ya que a pesar del aumento en la cantidad total de 5FU complejo en sistemas con altos grados de pegilación, estos perdían sistemáticamente su capacidad de complejación interna, que resulta ser la interacción más importante ya que favorece la retención de la droga por periodos de tiempo más largos.

A partir de los perfiles de solubilidad, y utilizando la formulación de Higuchi y Connors para múltiples sitios de unión (ecuación 4) se obtuvieron las constantes de afinidad $K_{n:1}$ y las estequiometrías de los complejos droga:dendrímero, información que se presenta en la Tabla 10.

$$S_t = S_0 + \frac{nK_{n:1}(S_0)^n}{1+K_{n:1}(S_0)^n} L_t \quad (4)$$

Donde S_t es la solubilidad molar observada de la droga, $K_{n:1}$ es la constante de afinidad promedio por sitio de unión para un complejo del tipo n:1, donde n es el número promedio de moléculas de droga complejada por molécula de dendrímero, S_0 es la solubilidad molar intrínseca de la droga y L_t es la concentración molar del dendrímero.

Los resultados presentados en la Tabla 13, revelan que para MTX se alcanza un valor máximo en la estequiometría con el sistema 34%PEG-PAMAM-G4 (47:1), además se observa una disminución progresiva en el número de moléculas de MTX complejadas a medida que el grado de pegilación se hace mayor al 34%, alcanzando un valor mínimo en el complejo MTX:100%PEG-PAMAM-G4, donde la estequiometría promedio obtenida fue 25:1. Los valores obtenidos para la estequiometría del complejo formado entre MTX con PAMAM-G4 y el sistema completamente pegilado (100%PEG-PAMAM-G4) son consistentes con las estequiometrías reportadas previamente por Jiang para PAMAM-G4 (22:1)⁴⁷, y por Kojima para 100%PEG-PAMAM-G4 (26:1)⁴⁰, lo que apoya la validez de la metodología experimental utilizada para determinar las estequiometrías de los complejos droga:dendrímero, y por ende sustenta los valores obtenidos para las estequiometrías de los complejos formados entre MTX y los sistemas parcialmente pegilados, para los cuales hasta la fecha no existe información experimental.

Tabla 13: Estequiometrías promedio y constantes de estabilidad por sitio de interacción $K_{n:1}$ ($\text{mol}^{-1} \text{L}$) para los complejos supramoleculares formados entre MTX y 5FU con el dendrímero PAMAM-G4 y los sistemas pegilados en disolución acuosa, a temperatura ambiente y $\text{pH} = 7.0$.

Sistema	Estequiometrías promedio para los complejo droga:dendrímero	$K_{n:1}$ ($\text{mol}^{-1} \text{L}$)
MTX:PAMAM-G4	19:1	12500
MTX:28%PEG-PAMAM-G4	30:1	12360
MTX:34%PEG-PAMAM-G4	47:1	11840
MTX:67%PEG-PAMAM-G4	36:1	12400
MTX:100%PEG-PAMAM-G4	25:1	13140
5FU:PAMAM-G4	85:1	13.1
5FU:28%PEG-PAMAM-G4	128:1	12.7
5FU:34%PEG-PAMAM-G4	130:1	12.8
5FU:67%PEG-PAMAM-G4	143:1	12.4
5FU:100%PEG-PAMAM-G4	159:1	12.3

En el caso de los complejos formados con 5FU, los valores muestran un aumento sostenido en la estequiometría droga:dendrímero conforme aumenta el grado de pegilación. En este sentido, los altos valores obtenidos para las estequiometrías de estos complejos puede explicarse por el menor tamaño de 5FU (130.8 g/mol) en comparación con MTX (452.4 g/mol), lo que permite que 5FU se albergue con mayor facilidad en las cavidades internas y externas de los sistemas pegilados. Además, debido el carácter hidrofílico de 5FU, este debe presentar una gran afinidad por las cadenas de PEG, las que están orientadas hacia la periferia en los sistemas altamente pegilados, otorgándoles mayor superficie de contacto en donde interactuar con esta droga, tal y cómo fue descrito mediante las simulaciones de DM de los complejos supramoleculares formados entre 5FU y los sistemas transportadores con altos grados de pegilación.

En cuanto a las constantes de afinidad $K_{n:1}$, los valores calculados revelan afinidades similares entre MTX con el dendrímero PAMAM-G4 nativo y los sistemas pegilados, lo que sugiere la existencia de interacciones supramoleculares similares entre MTX y la serie de nanotransportadores en estudio. Respecto a la magnitud de las constantes de afinidad, de acuerdo con la categorización planteada por Jones y Atkins⁸⁵, los valores obtenidos son indicativos de una interacción fuerte y estable entre MTX y los sitios de unión presentes en los sistemas transportadores ($K > 10^3$), lo que representa un resultado promisorio para el uso de sistemas PEG-PAMAM como transportadores de liberación controlada de MTX.

Mientras tanto, las constantes de afinidad obtenidas en los complejos formados con 5FU también presentan valores similares entre los distintos sistemas transportadores. Sin embargo, en estos complejos las constantes de afinidad presentan valores del orden de $13 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, tres órdenes de magnitud por debajo de las calculadas para los complejos formados con MTX. Por lo tanto, los valores obtenidos en la constante de afinidad entre 5FU y los nanotransportadores ($K < 10^3$) son indicativos de una interacción débil entre esta droga y los sitios de unión presentes en los sistemas transportadores según la categorización planteada por Jones y Atkins, lo que puede deberse a la elevada solubilidad que presenta 5FU en disolución acuosa. Estos resultados sugieren que, a pesar de las elevadas estequiometrías presentadas por los complejos 5FU:dendrímero, la estabilidad de los complejos es limitada, lo que podría conllevar a una liberación acelerada de la carga farmacológica desde los sistemas transportadores.

3.2.4 Sitios de asociación supramolecular droga:dendrímero.

Se emplearon experimentos 2D-NOESY para examinar los sitios de unión preferenciales para la asociación de MTX con el dendrímero PAMAM-G4 nativo y los sistemas pegilados al 34% y 100%, ya que estos fueron los sistemas pegilados que presentaron los valores más altos y más bajos para las estequiometrías de los complejos droga:dendrímero, respectivamente [Tabla 13]. En la Figura 27 se presentan los espectros 2D-NOESY para estos complejos, en los que el eje vertical representa las señales del fragmento PAMAM-G4 ($\delta = 2.20$ a 3.30 ppm) y las señales de las cadenas de PEG ($\delta = 3.45\text{-}3.70 \text{ ppm}$ y 4.20 ppm), mientras que en el eje horizontal se muestran las señales aromáticas de MTX, las que están en la región comprendida entre 6.60 y 8.80 ppm .

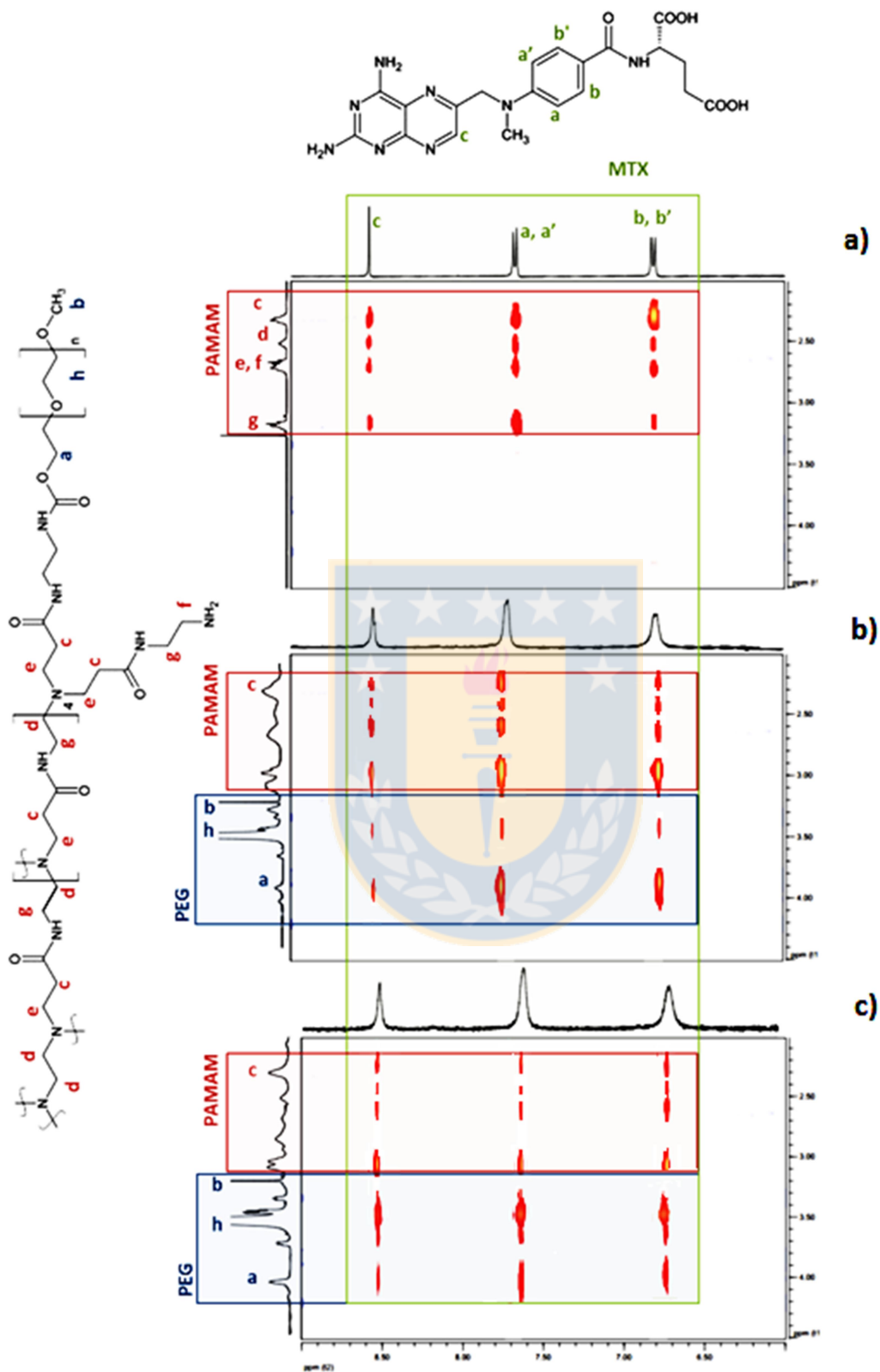


Figura 27: Espectro 2D-NOESY de los complejos supramoleculares formados entre MTX con PAMAM-G4 (a), 34%PEG-PAMAM-G4 (b) y 100%PEG-PAMAM-G4 (c) en D₂O.

De acuerdo con los espectros 2D-NOESY, el complejo MTX:PAMAM-G4 muestra fuertes picos cruzados entre los protones aromáticos de MTX y las señales correspondientes a las ramas internas de la PAMAM-G4, indicando la encapsulación interna de moléculas de MTX dentro de las cavidades del dendrímero PAMAM-G4. En el caso de los sistemas pegilados, para el complejo MTX:34%PEG-PAMAM-G4 se observan picos cruzados que dan cuenta de la interacción del fármaco tanto con las ramas internas del fragmento PAMAM-G4, como con las cadenas de PEG superficiales. Mientras que para el complejo MTX:100%PEG-PAMAM-G4 se observa una interacción más intensa entre MTX y las cadenas de PEG (h), junto con una disminución en la intensidad de los picos cruzados correspondientes a la interacción entre MTX y ramas del fragmento PAMAM-G4, lo que sugiere una disminución en la capacidad de complejación interna del sistema con un 100% de pegilación, en comparación con el dendrímero PAMAM-G4 nativo y el sistema pegilado en un 34%. Este resultado puede ser una consecuencia de una saturación superficial producto del gran número de cadenas de PEG, que cómo se observó en las simulaciones de DM, representa un factor perjudicial para la difusión del fármaco hacia las cavidades internas del fragmento PAMAM-G4 en el sistema totalmente pegilado.

En los experimentos 2D-NOESY para los complejos supramolecular formados entre 5FU y los sistemas transportadores en estudio no se observaron picos cruzados que den cuenta de la asociación de esta droga con los nanotransportadores. La ausencia de efecto NOE en este complejo puede ser atribuida a la baja proporción entre el único núcleo de hidrógeno de 5FU, frente a las señales de alta intensidad del dendrímero 100%PEG-PAMAM-G4. Otro factor que puede afectar la detección del efecto NOE es la relación entre moléculas de 5FU en disolución y las complejadas, la que debe presentar un alto porcentaje de droga en disolución producto de la elevada solubilidad que presenta 5FU en disolución acuosa. Por lo tanto, 5FU no representa un modelo de droga adecuado para el estudio de interacciones supramoleculares por experimentos de 2D-NOESY, a diferencia de los resultados obtenidos con MTX, el que presentó una excelente respuesta en estos experimentos.

3.2.5 Estudios de liberación de la carga farmacológica desde los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4.

Para obtener información acerca del efecto de la pegilación y de la fuerza iónica del medio sobre la cinética de liberación de las drogas en estudio desde los sistemas nanotransportadores, se realizaron ensayos de liberación mediante el método de equilibrio de diálisis, como se describió en el capítulo 2. Para este propósito, los complejos droga:dendrímtero previamente liofilizados fueron disueltos al interior de una bolsa de diálisis con una solución tampón fosfato (10 mmol L^{-1} ; $\text{pH}=7.4$), con ausencia y presencia de $150 \text{ (mmol L}^{-1})$ de NaCl para simular la fuerza iónica presente en la sangre. Los complejos contenidos en las bolsas de diálisis fueron puestos en contacto con una disolución externa de la misma disolución tampón en un baño termostatzado a 37°C . La liberación de MTX y 5FU desde los distintos sistemas transportadores en ambas disoluciones tampón (con y sin fuerza iónica de 150 mmol L^{-1} de NaCl) se muestra en las Figuras 28 y 29 respectivamente.

Los resultados indican que en condiciones de alta fuerza iónica la velocidad de liberación de MTX desde el dendrímtero nativo es claramente mayor que en condiciones de baja fuerza iónica, lo que se traduce en una reducción del poder de retención de este sistema en aproximadamente cuatro horas. Este aumento en la velocidad de liberación de MTX desde los sistemas transportadores en condiciones de fuerza iónica fisiológica se debe a la presencia de altas concentraciones de iones Na^{+} y Cl^{-} , los que compiten fuertemente por los sitios de unión del dendrímtero, debilitando las interacciones droga:dendrímtero y desplazando la droga complejada hacia la disolución externa. En estas condiciones de fuerza iónica, la velocidad de liberación de MTX es ligeramente inferior con el aumento de grado de pegilación, lo que se puede atribuir al efecto estérico producido por las cadenas de PEG, las que en los sistemas con altos grados de pegilación bloquean más eficientemente el ingreso de los iones a la estructura interna del nanotransportador, y por tanto causan un retardo en la fuga de la droga, resultados que están en buen acuerdo con los reportes de Kojima y colaboradores⁴⁶. En cuanto a la fracción de droga que experimenta una disminución en la velocidad de liberación desde los sistemas con altos grados de pegilación (20-30% del total de droga complejada), podría representar las moléculas de MTX asociadas con las cavidades hidrofóbicas más internas del fragmento PAMAM-G4.

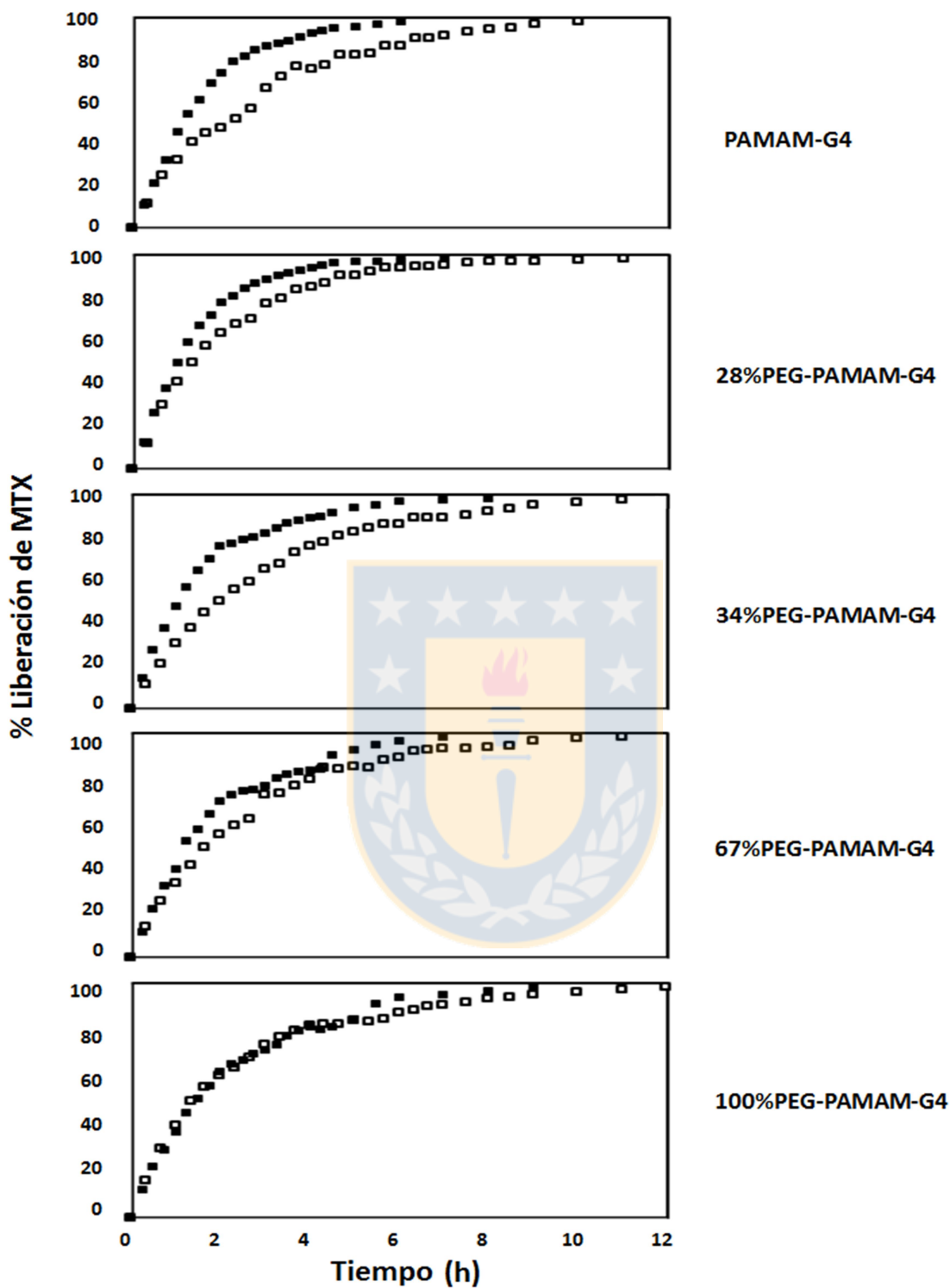


Figura 28: Perfiles de liberación de MTX desde PAMAM-G4 y los sistemas pegilados a 37°C, en una disolución de baja fuerza iónica [símbolos sin relleno □] y en una disolución de fuerza iónica fisiológica [símbolos con relleno ■].

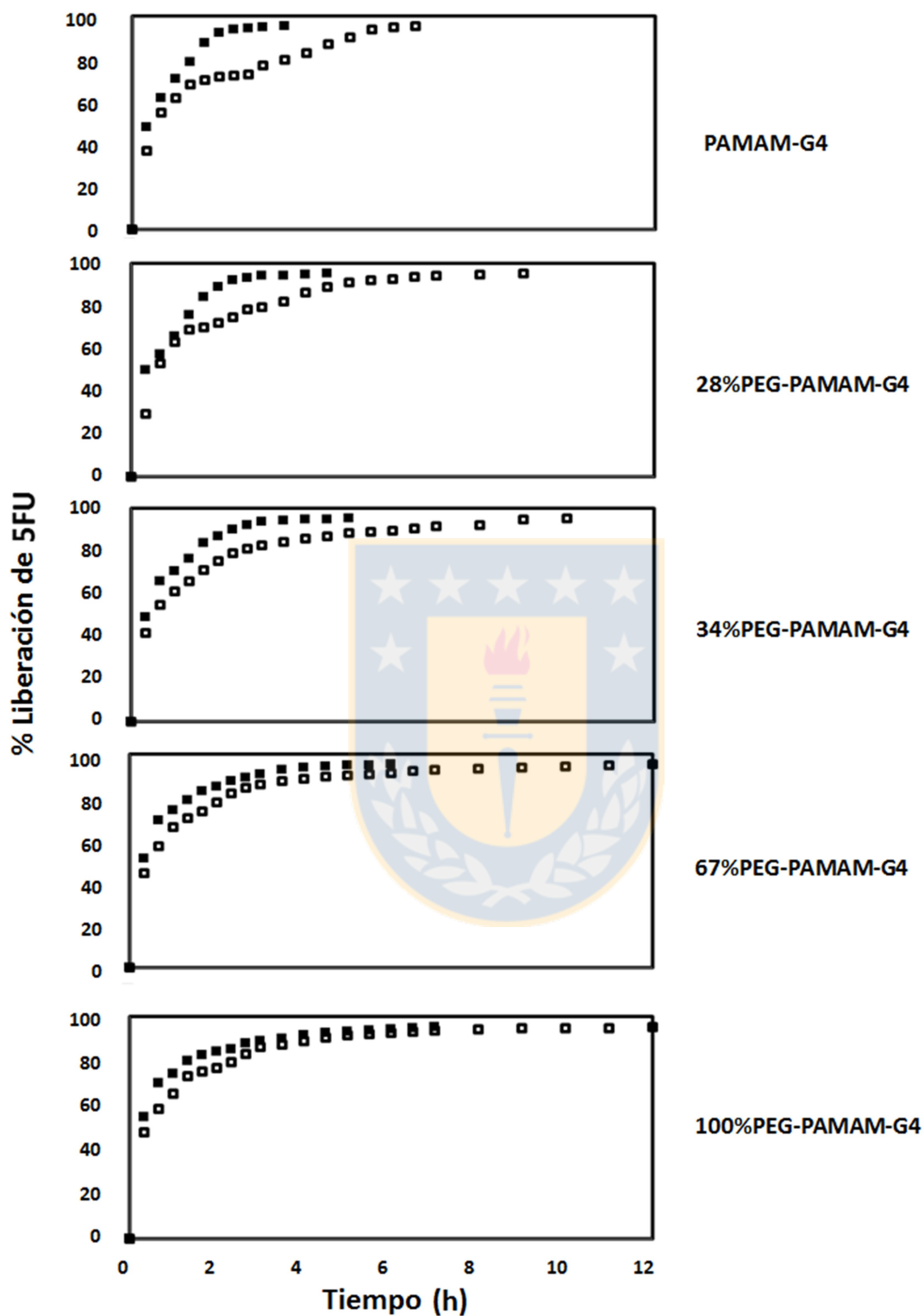


Figura 29: Perfiles de liberación de desde 5FU PAMAM-G4 y los sistemas pegilados a 37°C, en una disolución de baja fuerza iónica [símbolos sin relleno □] y en una disolución de fuerza iónica fisiológica [símbolos con relleno ■].

Por otro lado, el perfil de liberación presentado por 5FU desde los sistemas nanotransportadores es similar al perfil de carácter asintótico mostrado por MTX. Sin embargo, en ambas condiciones de fuerza iónica la velocidad de liberación de 5FU durante las primeras dos horas de diálisis es mayor a la mostrada por MTX, lo que es coherente con las diferencias observadas en las constantes de estabilidad de los complejos formados con ambos fármacos, donde se encontró que la estabilidad de MTX en los complejos droga:dendrúmero es 10^3 veces mayor que la mostrada por 5FU [Tabla 13]. Se observó que la fuerza iónica influye fuertemente la tasa de liberación de 5FU desde el dendrúmero PAMAM-G4 nativo, mientras que en los sistemas pegilados este efecto se volvió cada vez más tenue en la medida que el grado de pegilación aumentó. A pesar de que los sistemas con altos grados de pegilación presentaron un perfil de liberación similar en ambas condiciones de fuerza iónica, estos lograron retener una pequeña porción de la carga farmacológica hasta las 12 horas de diálisis. Esta fracción de droga que se libera más lentamente representa alrededor de un 12-18% del total de la carga farmacológica en los sistemas con 100% y 67% de pegilación, respectivamente y puede corresponder a las moléculas de droga complejadas más internamente en la estructura de estos sistemas.

Con el fin de dilucidar el mecanismo que dé cuenta del perfil de liberación mostrado por MTX y 5FU desde los sistemas transportadores, y obtener parámetros cinéticos para cuantificar las diferencias presentadas por los distintos sistemas transportadores en el proceso de liberación de estas drogas, se ajustó la data de liberación experimental obtenida en condiciones de pH y salinidad fisiológica (es decir, $\text{pH} = 7.4 + 150 \text{ mmol L}^{-1}$ de NaCl), a dos modelos matemáticos que describen la liberación de una droga desde matrices poliméricas. Los modelos considerados fueron los modelos de liberación de primer orden⁸⁰ y el modelo de Higuchi⁸¹, descritos por las ecuaciones 5 y 6, respectivamente.

$$A_t/A_0 = 1 - e^{-kt} \quad (5)$$

Donde A_t es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo t , A_0 es la cantidad inicial de fármaco en el complejo, y k es la constante de liberación de primer orden.

$$A_t/A_0 = k_H t^{1/2} \quad (6)$$

Donde A_t es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo t , A_0 es la cantidad inicial de fármaco en el complejo, y k_H es la constante de liberación de Higuchi.

El ajuste de los modelos cinéticos a la data experimental de la liberación de MTX y 5FU desde los sistemas transportadores, se muestra en las Figuras 30 y 31 respectivamente, mientras que las constantes cinéticas y los coeficientes de correlación (R^2) obtenidos por el modelo de primer orden y el modelo de Higuchi se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14: Constantes cinéticas y coeficientes de correlación (R^2) para la liberación de MTX y 5FU desde PAMAM-G4 y los sistemas pegilados, obtenidos a partir del modelo de liberación de primer orden y el modelo de Higuchi.

Sistema	Modelo de Primer Orden		Modelo de Higuchi	
	k	R^2	k_H	R^2
MTX:PAMAM-G4	0.78 ± 0.01	0.997	46.7 ± 0.2	0.969
MTX:28%PEG-PAMAM-G4	0.77 ± 0.01	0.998	46.5 ± 0.3	0.955
MTX:34%PEG-PAMAM-G4	0.66 ± 0.01	0.998	43.6 ± 0.3	0.957
MTX:67%PEG-PAMAM-G4	0.55 ± 0.03	0.995	42.8 ± 0.2	0.973
MTX:100%PEG-PAMAM-G4	0.46 ± 0.03	0.995	40.1 ± 0.1	0.984
5FU:PAMAM-G4	1.57 ± 0.04	0.993	63.7 ± 0.3	0.960
5FU:28%PEG-PAMAM-G4	1.41 ± 0.07	0.987	62.3 ± 0.2	0.967
5FU:34%PEG-PAMAM-G4	1.54 ± 0.06	0.989	55.9 ± 0.5	0.916
5FU:67%PEG-PAMAM-G4	1.66 ± 0.08	0.986	51.8 ± 0.8	0.879
5FU:100%PEG-PAMAM-G4	1.76 ± 0.11	0.982	48.2 ± 1.0	0.846

En base a los valores de los R^2 obtenidos a partir del ajuste de los modelos cinéticos, es posible inferir que la liberación de ambas drogas desde los sistemas transportadores es descrito de mejor forma por el modelo de primer orden. Este resultado indica que la velocidad de liberación depende de la diferencia entre la cantidad de fármaco complejada y la concentración de fármaco en el medio de liberación, y sugiere que la liberación de ambas drogas es controlada por difusión de moléculas de agua.

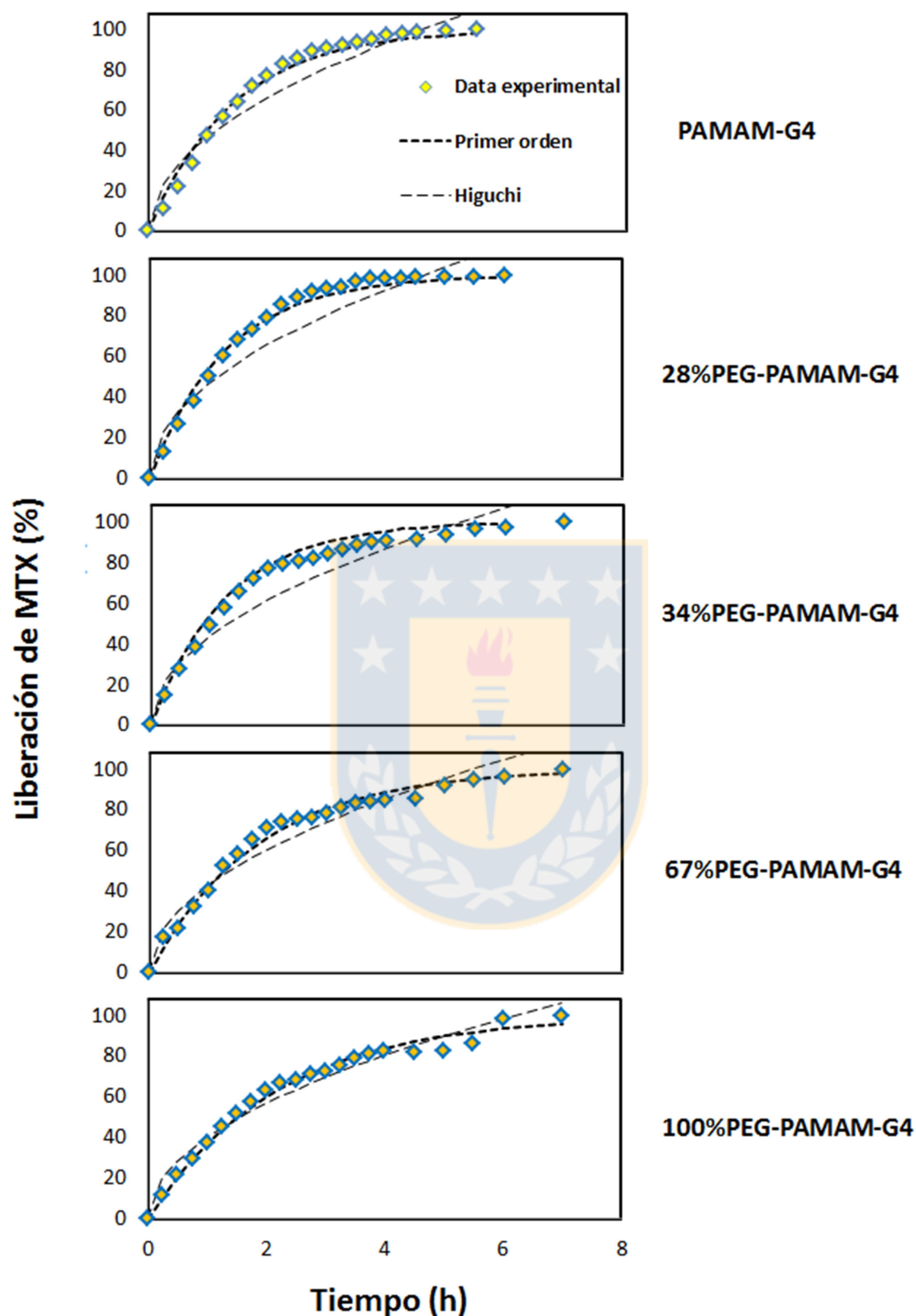


Figura 30: Ajuste de los modelos cinéticos de primer orden y de Higuchi a los datos experimentales obtenidos para la liberación de MTX en condiciones de pH y fuerza iónica fisiológicas.

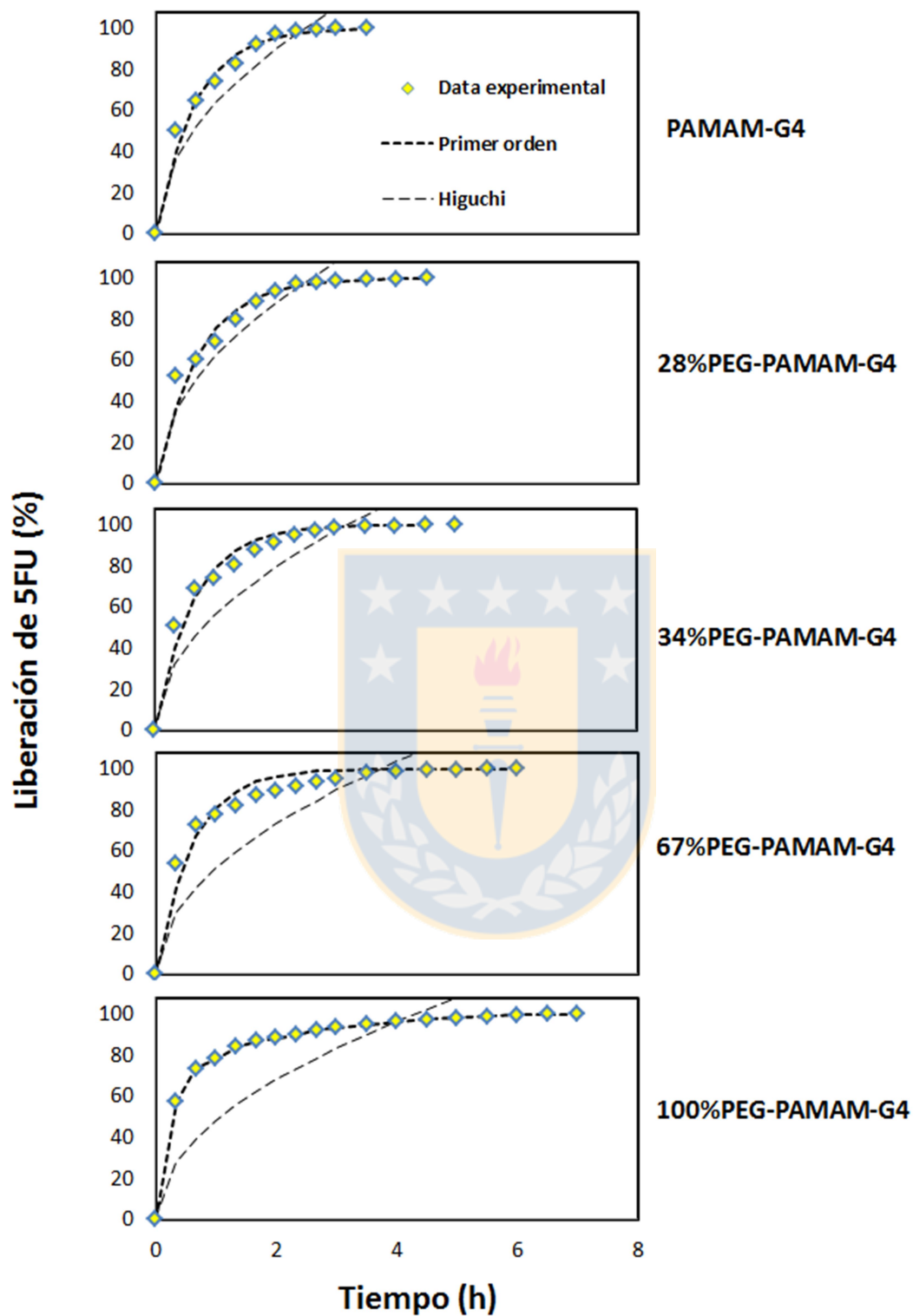


Figura 31: Ajuste de los modelos cinéticos de primer orden y de Higuchi a los datos experimentales obtenidos para la liberación de 5FU en condiciones de pH y fuerza iónica fisiológicas.

Los valores obtenidos en las constantes cinéticas de primer orden para la liberación de MTX, tienden a disminuir a medida que el grado de pegilación de los sistemas transportadores aumenta. Este resultado se puede atribuir al impedimento a difundir hacia la disolución externa que experimentan las moléculas de MTX internamente complejadas, lo cual es generado por el aumento de la densidad de cadenas de PEG en los sistemas con elevados grados de pegilación. Por su parte, en la liberación de 5FU desde los sistemas transportadores, se observó que el valor de constantes de cinética de primer orden experimenta una disminución con grados de pegilación intermedios (28-34%), mientras que en los sistemas con altos grados de pegilación la constante cinética presenta un incremento, indicando una liberación más rápida de las moléculas de 5FU desde estos sistemas. Este resultado podría ser una consecuencia de que en los sistemas con altos grados de pegilación la mayor porción de moléculas de 5FU complejada se encuentra albergada entre las cadenas de PEG, y que según los estudios de DM podrían representar cerca del 90% del total de droga complejada. Por lo tanto, debido a que existe una gran cantidad de moléculas de 5FU complejadas externamente en estrecha interacción con la disolución externa, y sumado a la elevada solubilidad en disolución acuosa que presenta esta droga, su velocidad de liberación se eleva en los sistemas con altos grados de pegilación, aun cuando estos logren retener una pequeña porción de la droga complejada por más tiempo que los sistemas con grados de pegilación intermedios.

Los resultados obtenidos a través del estudio de la liberación de MTX y 5FU desde los dendrímeros PAMAM-G4 y PEG-PAMAM-G4, reflejan que la pegilación mejora la capacidad de complejación y retarda la liberación de ambas drogas desde los nanotransportadores. Sin embargo sigue siendo una estrategia deficiente para hacer de los dendrímeros PAMAM un sistema transportador de drogas eficiente, ya que más del 65% de la carga farmacológica se libera antes de las dos horas de diálisis cuando se impusieron condiciones fisiológicas. Para intentar hacer frente a esta problemática, se postuló que la conjugación de dendrímeros PEG-PAMAM-G4 con MHA podría retardar la liberación de las drogas en condiciones de pH y salinidad fisiológico, producto de la formación de bolsillos hidrofóbicos entre el grupo carboxilo de MHA y los grupos amino superficiales libres del fragmento PAMAM-G4. Los resultados de la síntesis de este nuevo sistema

transportador MHA-PEG-PAMAM-G4 y su desempeño en la asociación y liberación de MTX y 5FU se presentan en las siguientes secciones.

3.2.6 Síntesis y caracterización del nuevo sistema transportador MHA-PEG-PAMAM-G4.

Se modificó la estructura de un dendrímero PEG-PAMAM-G4 conjugándolo con el éster del ácido N-succinimidil-6-maleimidohexanóico (MHA), para formar bolsillos hidrofóbicos en la estructura de los dendrímero PEG-PAMAM-G4, mediante la interacción electrostática entre el grupo carboxilato de MHA y los grupos amino superficiales libres del fragmento PAMAM-G4 con el fin de retener la carga farmacológica a pH fisiológico (7.4) y liberarlo selectivamente a pH ácido (pH~ 4.5). En la síntesis del nuevo sistema transportador MHA-PEG-PAMAM-G4, un equivalente de dendrímero pegilado al 65% (según la relación de integrales de la Figura 32) se hizo reaccionar con 16 equivalentes de MHA. Según la relación observada entre las integrales del dendrímero pegilado de partida y el producto de la reacción (MHA-PEG-PAMAM-G4 cíclico) en los espectros de ^1H -RMN (Figura 32), PEG-PAMAM-G4 fue conjugado exitosamente con 15 grupos MHA. El producto de esta reacción, fue hidrolizado en medio básico [$\text{NaOH}/\text{NaCOOH}$ 0.1 mol L^{-1} (pH=10.0)] para producir la ruptura del anillo de maleimida. Como se observa en la Figura 32, el espectro de MHA-PEG-PAMAM-G4 cíclico presenta un singlete a $\delta = 6.97\text{ppm}$, que corresponden a los núcleos de hidrógeno homotópicos (b) del anillo de maleimida. Esta señal desaparece en el espectro de MHA-PEG-PAMAM-G4 abierto (producto hidrolizado), y se observa la aparición de dos pares de dobletes a $\delta = 5.55\text{ppm}$ (b'') y a $\delta = 6.08\text{ppm}$ (b'), que corresponden a los núcleos de hidrógeno de la olefina formada producto de la ruptura del anillo de MHA. Adicionalmente este espectro presentó una señal ancha a $\delta = 12.16\text{ ppm}$, la que corresponde al protón del ácido carboxílico (a), lo que corrobora la apertura del anillo de maleimida producto de la hidrólisis en medio básico.

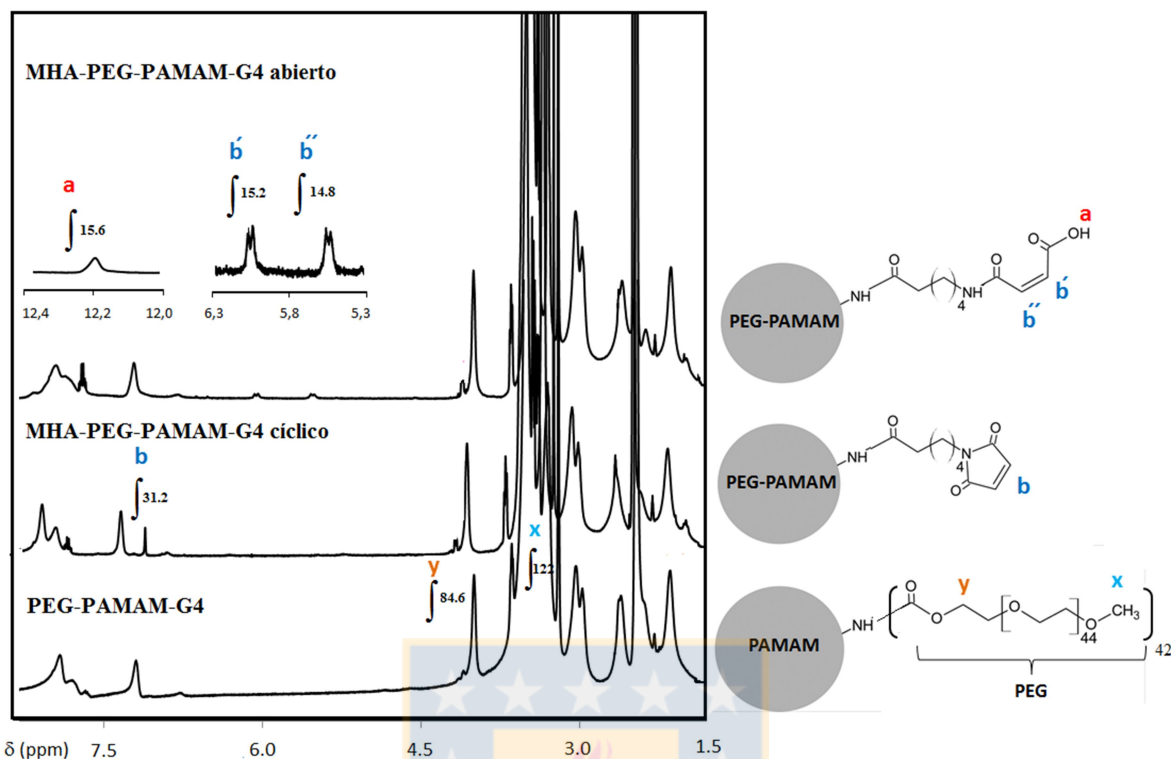


Figura 32: Espectros ^1H -RMN y asignación de las señales características del nuevo sistema transportador MHA-PEG-PAMAM-G4 cíclico y abierto, en $\text{DMSO } d_6$.

3.2.7 Efecto del pH en la liberación de la carga farmacológica de MTX y 5FU desde el dendrímero PEG-PAMAM-G4 precursor y el nuevo sistema transportador MHA-PEG-PAMAM-G4.

El nuevo sistema MHA-PEG-PAMAM-G4 (abierto) obtenido por síntesis fue utilizado para evaluar su desempeño en la liberación de las drogas en estudio considerando dos condiciones de pH (7.4 y 4.5), ambas con una fuerza iónica de 150 mmol L^{-1} de NaCl. Para evaluar el efecto de la conjugación con el grupo MHA, todos los ensayos fueron realizados tanto el dendrímero PEG-PAMAM-G4 precursor, como en el nuevo sistema MHA-PEG-PAMAM-G4. Los perfiles de liberación de MTX y 5FU desde ambos sistemas transportadores no presentaron diferencias apreciables en las mismas condiciones de pH producto de la conjugación del dendrímero PEG-PAMAM-G4 con MHA, como se muestra en la Figura 33.

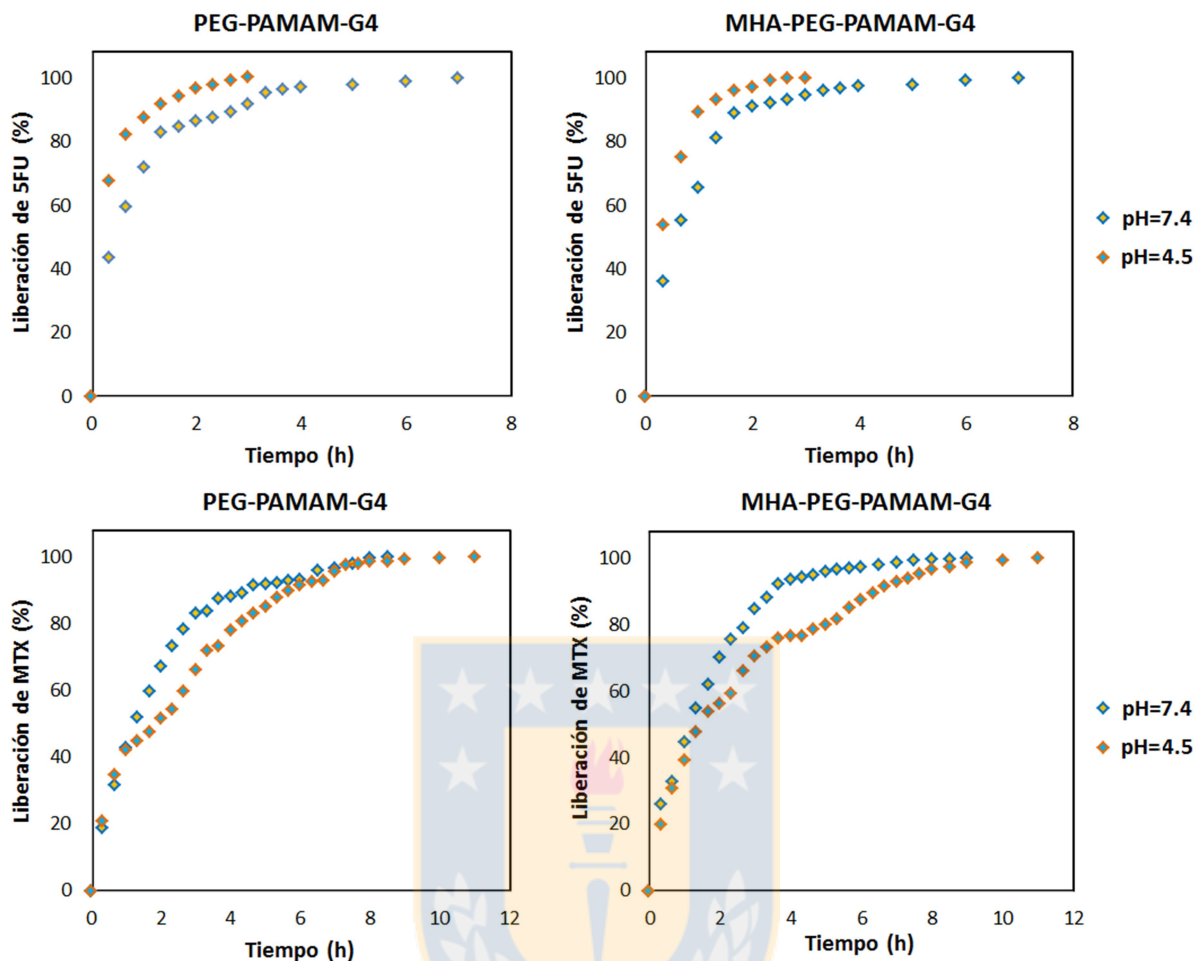


Figura 33: Efecto del pH en el perfiles de liberación de 5FU y MTX desde el dendrímero PEG-PAMAM-G4 (precursor) y el nuevo sistema MHA-PEG-PAMAM-G4 a 37°C. La liberación de ambas drogas fue realizada en una disolución 10 mmol L⁻¹ de tampón fosfato, (pH=7.4+ 150 mmol L⁻¹ de NaCl) y en una disolución 10 mmol L⁻¹ de tampón acetato, (pH=4.5+150 mmol L⁻¹ de NaCl).

Los resultados sugieren que el nuevo sistema MHA-PEG-PAMAM-G4 no presenta mayor retención de la carga farmacológica que el sistema pegilado precursor en condiciones fisiológica. Por otro lado, cuando se realizó la diálisis en condiciones ácidas se observaron diferencias en los perfiles de liberación de ambas drogas, ya que mientras 5FU presentó un aumento en su cinética de liberación, MTX por el contrario experimentó una liberación más lenta. Sin embargo, estas diferencias no parecen ser producto de la modificación estructural

del transportador, sino más bien que producto de las diferencias en la naturaleza química de las drogas en estudio.

Para cuantificar la velocidad de liberación de ambas drogas desde los transportadores, se ajustó la data experimental al modelo de liberación de primer orden y se calcularon las correspondientes constantes de liberación de orden 1, las que se presentan en la Tabla 15. Los valores de las constantes cinéticas (k) obtenidas para la liberación de MTX y 5FU desde los sistemas PEG-PAMAM-G4 y MHA-PEG-PAMAM-G4 no muestran diferencias significativas en condiciones de pH y salinidad fisiológica. Este resultado sugiere que no existe una interacción efectiva entre los grupos carboxilato de MHA y los grupos amino protonados del fragmento PAMAM-G4 en el nuevo sistema transportador, lo que puede ser una consecuencia de que estos grupos no se encuentren ubicados a distancias que permitan dicha interacción ($\sim 3\text{\AA}$). También puede ocurrir que la interacción exista, pero que sea debilitada por efecto de los contraiones presentes en disolución, los que al tener una elevada densidad de carga, podrían presentar una interacción electrostática elevada con los grupos carboxilato y los grupos amino protonados del transportador, en desmedro de la interacción intramolecular entre estos grupos.

Tabla 15: Constantes cinéticas de primer orden (k) y coeficientes de determinación (R^2) para la liberación de MTX y 5FU desde PEG-PAMAM-G4 (precursor) y el nuevo sistema MHA-PEG-PAMAM-G4. Los ensayos fueron realizados a pH 7.4 y 4.5 y a una temperatura constante de 37°C.

Sistema	pH=7.4+150 mmol L ⁻¹ de NaCl		pH=4.5+150 mmol L ⁻¹ de NaCl	
	k	R ²	k	R ²
MTX:PEG-PAMAM-G4	0.59 ± 0.02	0.998	0.40 ± 0.06	0.990
MTX:MHA-PEG-PAMAM-G4	0.62 ± 0.03	0.997	0.40 ± 0.05	0.993
5FU:PEG-PAMAM-G4	1.62 ± 0.05	0.992	2.77 ± 0.07	0.987
5FU:MHA-PEG-PAMAM-G4	1.61 ± 0.04	0.998	2.16 ± 0.05	0.993

Los valores de las constantes cinéticas de primer orden obtenidas para la liberación a $\text{pH} = 4.5$ tampoco presentaron diferencias apreciables producto de la conjugación con el grupo MHA. En estas condiciones, 5FU fue liberado más rápidamente que a pH fisiológico, como se postuló en el capítulo 1, pero esta liberación acelerada en condiciones ácidas parece ser una propiedad intrínseca de los dendrímeros PAMAM. Por lo tanto, las diferencias observadas en las constantes cinéticas de 5FU, en ambas condiciones de pH no son atribuibles a la conjugación del dendrímero PEG-PAMAM-G4 con MHA.

En cuanto al efecto del pH en la liberación de MTX, los resultados muestran una disminución evidente en la constante cinética calculada para ambos sistemas transportadores, resultados que son opuestos a lo postulado en la hipótesis planteada. Esta disminución en la tasa de liberación de MTX puede deberse a que en estas condiciones de pH , MTX se encuentre protonado⁷², lo que posibilita la formación de enlaces de hidrógeno entre la droga y los oxígenos de las cadenas de PEG, lo que no ocurre en condiciones de pH fisiológicas donde MTX solo puede actuar como aceptor de enlaces de hidrógeno.

Los resultados obtenidos sugieren que la adición de MHA a la estructura de los dendrímeros PEG-PAMAM no conlleva a un aumento en la retención de la carga farmacológica en condiciones de pH y fuerza iónica fisiológicas, ni a un aumento en la tasa de liberación en condiciones más ácidas. Por lo tanto, la conjugación de dendrímeros PEG-PAMAM con MHA no representa una estrategia adecuada para obtener un sistema transportador de liberación controlada en función del pH . Sin embargo, a partir del uso combinado de simulaciones de DM y métodos espectroscópicos se obtuvo buena cantidad de parámetros estructurales y termodinámicos del proceso de formación de complejos droga:dendrímero, además de parámetros cinéticos del perfil de liberación de MTX y 5FU, información que puede ser empleada para optimizar las propiedades de nuevos sistemas transportadores de fármacos anticancerígenos basados en dendrímeros PAMAM.

Capítulo 4

Conclusiones y proyecciones

4.1 Conclusiones.

Los resultados obtenidos a partir de las simulaciones de DM sugieren que la pegilación tiene un fuerte impacto en las conformaciones que adquieren los dendrímeros en disolución acuosa, y que esto afecta directamente la capacidad de complejación que estos sistemas presentan con las drogas en estudio. En base a estos resultados se puede concluir que:

- Un aumento en el grado de pegilación conduce a una expansión en las cavidades más internas del dendrímero y a una orientación de las cadenas de PEG hacia la periferia, lo que desencadena una disminución en la penetración de moléculas de agua y contraiones en la estructura interna del dendrímero, resultado que puede interpretarse como un aumento en el carácter hidrofóbico del dendrímero producto de la pegilación.
- La cantidad de 5FU complejoado aumenta progresivamente con el aumento del grado de pegilación desde 22 moléculas de esta droga en el dendrímero nativo hasta 69 moléculas promedio en el sistema pegilado al 100%. Por su parte la cantidad de moléculas de MTX complejadas en el dendrímero nativo se vio incrementada producto de la pegilación parcial al 25% desde 23 a 32 moléculas respectivamente, pero presentó una notoria disminución en la cantidad de droga complejada con el sistema completamente pegilado, resultados que dan cuenta de una fuerte dependencia de la capacidad de complejación de los sistemas transportadores con la naturaleza química de las drogas.
- En todos los sistemas pegilados el sitio de interacción principal de 5FU es con las cadenas de PEG, tendencia que se acentúa considerablemente en los sistemas con altos grados de pegilación, donde la droga asociada con estas cadenas de PEG representa alrededor del 85% del total complejoado. En términos energéticos, la interacción 5FU-PEG presenta un valor promedio de alrededor de 20 kcal mol^{-1} (entre la contribución electrostática y las fuerzas de van der Waals), claramente

superior a las 14 kcal mol⁻¹ calculadas para la interacción 5FU-PAMAM, lo que puede ser consecuencia del carácter hidrofílico que caracteriza tanto a las cadenas de PEG, como a las moléculas de 5FU, frente al fuerte carácter hidrofóbico de las cavidades internas del fragmento PAMAM en los sistemas pegilados.

- El sitio de interacción preferencial de MTX varía fuertemente con el grado de pegilación, ya que mientras en el dendrímero PAMAM-G4 nativo la complejación interna representa un 65%, esta cae a un 50% en el sistema con un 25% de pegilación y representa tan solo un 30% del total complejado en el sistema con un 100% de pegilación. En términos energéticos la contribución de las fuerzas de van der Waals se mantiene relativamente constante con el aumento del grado de pegilación, sin embargo la componente electrostática presenta una fuerte caída a medida que aumenta el grado de pegilación, pasando de 42 kcal mol⁻¹ en el dendrímero nativo a solo 6 kcal mol⁻¹ en el sistema pegilado al 100%, lo que puede ser atribuido a la ausencia de grupos amino protonados en este sistema. Estos resultados sugieren que pese a la fuerte interacción que presenta MTX por las cavidades hidrofóbicas de los sistemas pegilados, la complejación interna de esta droga se ve limitada por la alta densidad de cadenas de PEG que actúan como una barrera para la difusión de MTX hacia el interior de la estructura de los transportadores y por la notoria disminución de la energía electrostática a la estabilidad de los complejos.
- La cantidad de ambas drogas complejadas internamente en el sistema pegilado al 100% presenta una disminución cercana al 50% respecto a lo observado en el dendrímero nativo, producto del impedimento estérico generado por las cadenas de PEG. En cambio el sistema 25%PEG-PAMAM-G4 logra conservar la capacidad de complejación interna del dendrímero nativo y presenta un aumento en la cantidad total de droga complejada producto de la interacción droga-PEG. Por lo tanto, los resultados obtenidos a partir de las simulaciones de DM sugieren que la pegilación parcial de PAMAM-G4 (~ 25%) parece ser la estrategia sintética más adecuada para desarrollar nuevos sistemas transportadores de fármacos basados en PAMAM más eficientes.

Por otro lado, los resultados experimentales revelaron que el grado de pegilación influye fuertemente en la capacidad de complejación, sitios de interacción y perfiles de liberación de las drogas desde los sistemas transportadores. También se observaron marcadas diferencias en las constantes de afinidad y constantes cinéticas calculadas para ambas drogas en un mismo sistema transportador, lo que da cuenta de una marcada dependencia de la estabilidad de los complejos droga:dendrúmero con la naturaleza de la droga en estudio. Sin embargo, se encontró que la liberación de ambas drogas presenta el mismo mecanismo de liberación desde todos los sistemas transportadores. A partir de estos resultados se concluye que:

- La complejación de MTX se maximiza al utilizar un dendrúmero parcialmente pegilado al 34%, sistema para el cual se obtuvo una estequiometría droga:dendrúmero de 47:1, lo que representa aproximadamente el doble de las moléculas complejadas por el dendrúmero PAMAM-G4 nativo y por el sistema pegilado en un 100%. La encapsulación de MTX en este sistema se produce tanto en las cavidades internas del fragmento PAMAM-G4, como con las cadenas de PEG, siendo el primero de ellos el sitio de interacción preferencial como se observó en los experimentos 2D-NOESY. En cuanto a las constantes de asociación calculadas, estas dan cuenta de una fuerte interacción supramolecular ($K > 10^3$), responsable de la estabilización de los complejos formados entre MTX y todos los transportadores en disolución acuosa, lo que representa un resultado promisorio para el uso de sistemas PEG-PAMAM como transportadores de liberación controlada de MTX, y un parámetro a considerar para evaluar la afinidad de la droga con nuevos sistemas transportadores.
- La complejación de 5FU aumenta gradualmente con el aumento del grado de pegilación, obteniéndose un máximo de 159 moléculas de 5FU complejadas con el sistema pegilado al 100%, lo que representa aproximadamente el doble de las moléculas complejadas por el dendrúmero PAMAM-G4 nativo (85). No fue posible determinar los sitios preferenciales de interacción entre 5FU y los sistemas transportadores, debido a que no se observaron picos cruzados que den cuenta de efecto NOE en los experimentos 2D-NOESY, posiblemente debido a la baja

intensidad del único núcleo de hidrógeno presente en la molécula de 5FU, respecto a la gran intensidad de las señales de las cadenas de PEG y metilenos del fragmento PAMAM presentes en los sistemas pegilados. Por lo tanto, 5FU no representa un modelo de droga adecuado para realizar estudios de interacciones supramoleculares a partir de experimentos basados en efecto NOE. En cuanto a las constantes de asociación calculadas, según la categorización planteada por Jones y Atkins, estas dan cuenta de una interacción supramolecular débil ($K < 10^3$) entre la 5FU y los sitios de interacción de los transportadores ($K \approx 12$), lo que puede deberse a la elevada solubilidad que presenta esta droga en disolución acuosa.

- Los perfiles de liberación de ambas drogas desde los transportadores revelaron que la fuerza iónica del medio ejerce una desestabilización en los complejos supramoleculares, posiblemente producto de una mayor interacción entre los grupos cargados del dendrímero con los contraiones, los que desplazan las moléculas de fármaco hacia la periferia provocando una liberación acelerada de estas.
- Los perfiles de liberación obtenidos en condiciones fisiológicas (es decir, pH = 7.4 + 150 mmol L⁻¹ de NaCl), revelaron una disminución de la tasa de liberación de las drogas en sistemas con altos grados de pegilación en comparación con PAMAM-G4 nativo, debido a la barrera generada por las cadenas de PEG las que retardan el ingreso de contraiones a la estructura interna del dendrímero. Por otro lado, en todos los sistemas transportadores la liberación de MTX y 5FU sigue una cinética de primer orden, lo que sugiere un mecanismo de liberación controlado por difusión.
- Los valores obtenidos para las constantes cinéticas de primer orden reflejan la mayor estabilidad de los complejos formados por los transportadores y MTX, ya que presentan valores 2 a 3 veces menores que los mostrados por los complejos formados con 5FU. Los valores de las constantes cinéticas para estos últimos, revelan que a pesar de que el sistema pegilado al 100% logra retener por mayor tiempo la carga de 5FU, este sistema presenta la mayor tasa de liberación de la serie con un valor de constante cinética de 1.76 ± 0.11 , contra 1.57 ± 0.04 calculada para el dendrímero nativo. Por lo tanto, la mayor retención de la carga de 5FU mostrada

4.- Conclusiones y proyecciones.

por el sistema 100% pegilado debe ser producto de la pequeña porción de droga complejada internamente, la que según los resultados obtenidos a partir de las simulaciones de DM representa cerca de un 12% del total de droga complejada.

- La conjugación de dendrímeros PEG-PAMAM-G4 con cadenas de MHA no produjo un aumento en la retención de la carga farmacológica en condiciones de pH y salinidad fisiológica, obteniéndose constantes cinéticas prácticamente idénticas para ambos sistemas en las mismas condiciones de liberación. En cuanto al efecto del pH en la tasa de liberación, se observó que en medio ácido (pH=4.5) 5FU es liberado más rápidamente que en condiciones de pH fisiológicas, pero este aumento en la tasa de liberación fue el mismo tanto en el dendrímero pegilado precursor, como en el nuevo sistema MHA-PEG-PAMAM-G4, por lo que la capacidad de liberar la carga de 5FU de forma acelerada debe ser una propiedad intrínseca de los dendrímero PAMAM.

Finalmente, a partir de la correlación observada entre los resultados obtenidos a partir de simulaciones de Dinámica Molecular (DM) y los obtenidos mediante métodos espectroscópicos, es posible concluir que:

- Las simulaciones de DM representan una valiosa herramienta en el estudio de los aspectos estructurales de dendrímeros PAMAM y PEG-PAMAM en disolución. Además, su uso permiten obtener información cualitativa de como los aspectos estructurales de los dendrímeros influyen en la formación de complejos supramoleculares droga:dendrímero, debido a que son capaces de entregar una visión atomística del fenómeno de complejación, hacen posible determinar sitios preferenciales de asociación, estimar energías de interacción y estequiometrías de complejos droga:dendrímero en muy buena concordancia con la información experimental obtenida en este trabajo de tesis doctoral y con otros reportes bibliográficos.
- La buena correlación entre los valores obtenidos mediante simulaciones de DM y métodos espectroscópicos fue posible gracias a la utilización de parámetros adecuados y la consideración de aspectos experimentales (como el exceso de droga

respecto al dendrímero en la formación de los complejos) en la construcción de los sistemas a simular. Por lo tanto, los resultados obtenidos motivan el uso de este enfoque químico-computacional en el estudio de nuevos sistemas para los cuales no existe información experimental y se espera que la información desprendida de ellos sea una guía para el diseño y optimización de nuevos sistemas transportadores de fármacos más eficientes.

4.2 Proyecciones.

- Estudiar la capacidad de complejación de dendrímero PEG-PAMAM con otras drogas de interés farmacológico que presenten una limitada solubilidad en disolución acuosa y/o que ejerzan un efecto citotóxico al entrar en contacto con el entorno biológico.
- A partir de los complejos droga:dendrimeros obtenidos mediante simulaciones de DM es posible estudiar el efecto de la pegilación, fuerza iónica, temperatura, etc. en la liberación de las drogas desde los nanotransportadores. Sin embargo, debido a las limitaciones en el muestreo conformacional de las simulaciones de DM clásicas, para llevar a cabo este estudio se requiere la utilización de simulaciones de no equilibrio, como RAMD, SMD, Umbrella Sampling, entre otras.
- Estudiar el efecto de otras modificaciones superficiales aplicadas a los dendrímeros PAMAM, como la acetilación, en la capacidad de complejación con las mismas drogas estudiadas acá u otras drogas de interés biomédico que presenten problemas de solubilidad en disolución acuosa.

Bibliografia

- [1] Gilani, K.; Moazeni, E.; Ramezanli, T.; Amini, M.; Fazeli, M. R.; Jamalifar, H. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, *100*, 252.
- [2] Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. *Chemical Reviews* **1998**, *98*, 2045.
- [3] Sieber, S. A.; Marahiel, M. A. *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 715.
- [4] Salmaso, S.; Bersani, S.; Scomparin, A.; Mastrotto, F.; Caliceti, P. *Israel Journal of Chemistry* **2010**, *50*, 160.
- [5] Huang, W.; Wang, W.; Wang, P.; Tian, Q.; Zhang, C. N.; Wang, C. H.; Yuan, Z.; Liu, M.; Wan, H. Y.; Tang, H. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6*, 3927.
- [6] Medina, S. H.; El-Sayed, M. E. H. *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 3141.
- [7] Boas, U.; Heegaard, P. M. H. *Chemical Society Reviews* **2004**, *33*, 43.
- [8] Svenson, S. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *71*, 445.
- [9] Tomalia, D. A.; Reyna, L. A.; Svenson, S. *Biochemical Society Transactions* **2007**, *35*, 61.
- [10] Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym J* **1985**, *17*, 117.
- [11] Dufes, C.; Uchegbu, I. F.; Schatzlein, A. G. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57*, 2177.
- [12] Kaminskas, L. M.; McLeod, V. M.; Porter, C. J. H.; Boyd, B. J. *Molecular Pharmaceutics* **2012**, *9*, 355.
- [13] Tekade, R. K.; Kumar, P. V.; Jain, N. K. *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 49.
- [14] Tekade, R. K.; Kumar, P. V.; Jain, N. K. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 2574.
- [15] Wang, M.; Thanou, M. *Pharmacological Research* **2010**, *62*, 90.
- [16] Tomalia, D. A.; Huang, B.; Swanson, D. R.; Brothers, H. M.; Klimash, J. W. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3799.
- [17] Chen, W.; Tomalia, D. A.; Thomas, J. L. *Macromolecules* **2000**, *33*, 9169.
- [18] Liu, Y.; Bryantsev, V. S.; Diallo, M. S.; Goddard, W. A. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 2798.
- [19] Maiti, P. K.; Bagchi, B. *Journal of Chemical Physics* **2009**, *131*.
- [20] Cakara, D.; Kleimann, J.; Borkovec, M. *Macromolecules* **2003**, *36*, 4201.
- [21] Ana Maria, S.; Maxi, W.; Heike, S.; Gerhard, W.; Ronald, G. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*, 1728.
- [22] Hitesh, K.; Deep, P.; Mayank, K. S.; Abhay, S. C. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2015**, *41*, 232.
- [23] Hong, Z.; Thommey, P. T.; Kyung-Hoon, L.; Ankur, M. D.; Ming-hsin, L.; Alina, K.; Yuehua, Z.; Pascale, R. L.; Jeremy, J. G.; Mark, M. B. H.; James R. Baker, Jr. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 982.
- [24] Barra, P. A.; Barraza, L.; Jiménez, V. A.; Gavín, J. A.; Alderete, J. B. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2014**, *215*, 372.
- [25] Jolly, A. M.; Bonizzoni, M. *Supramolecular Chemistry* **2015**, *27*, 151.
- [26] Hu, J. J.; Cheng, Y. Y.; Ma, Y. R.; Wu, Q. L.; Xu, T. W. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 64.

- [27] Hu, J. J.; Cheng, Y. Y.; Wu, Q. L.; Zhao, L. B.; Xu, T. W. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 10650.
- [28] Barra, P.; Barraza, L.; Jiménez, V.; Gavin, J.; Alderete, J. *Structural Chemistry* **2014**, *25*, 1443.
- [29] Devarakonda, B.; Otto, D. P.; Judefeind, A. A.; Hill, R. A.; de Villiers, M. M. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *345*, 142.
- [30] Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J. W.; Meijer, E. W.; Paulus, W.; Duncan, R. *Journal of Controlled Release* **2000**, *65*, 133.
- [31] Jain, K.; Kesharwani, P.; Gupta, U.; Jain, N. K. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *394*, 122.
- [32] Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; McKeown, N. B.; D'Emanuele, A. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *252*, 263.
- [33] Roberts, J. C.; Bhalgat, M. K.; Zera, R. T. *Journal of Biomedical Materials Research* **1996**, *30*, 53.
- [34] Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Attwood, D.; McKeown, N. B.; D'Emanuele, A. *Pharmaceutical Research* **2003**, *20*, 1543.
- [35] Luo, D.; Haverstick, K.; Belcheva, N.; Han, E.; Saltzman, W. M. *Macromolecules* **2002**, *35*, 3456.
- [36] Kim, Y.; Klutz, A. M.; Jacobson, K. A. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 1660.
- [37] Wang, W.; Xiong, W.; Wan, J.; Sun, X.; Xu, H.; Yang, X. *Nanotechnology* **2009**, *20*.
- [38] Bhadra, D.; Bhadra, S.; Jain, S.; Jain, N. K. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *257*, 111.
- [39] Gajbhiye, V.; Kumar, P. V.; Tekade, R. K.; Jain, N. K. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44*, 1155.
- [40] Kojima, C.; Regino, C.; Umeda, Y.; Kobayashi, H.; Kono, K. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *383*, 293.
- [41] Maeda, H. In *Advances in Enzyme Regulation, Vol 41*; Weber, G., Ed. 2001; Vol. 41, p 189.
- [42] Maeda, H.; Bharate, G. Y.; Daruwalla, J. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *71*, 409.
- [43] Liao, H. H.; Liu, H.; Li, Y. L.; Zhang, M. G.; Tomas, H.; Shen, M. W.; Shi, X. Y. *Journal of Applied Polymer Science* **2014**, *131*.
- [44] Ly, T. U.; Tran, N. Q.; Thi, K. D. H.; Phan, K. N.; Truong, H. N.; Nguyen, C. K. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2013**, *9*, 213.
- [45] Zhu, S. J.; Hong, M. H.; Tang, G. T.; Qian, L. L.; Lin, J. Y.; Jiang, Y. Y.; Pei, Y. Y. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1360.
- [46] Kojima, C.; Kono, K.; Maruyama, K.; Takagishi, T. *Bioconjugate Chemistry* **2000**, *11*, 910.
- [47] Jiang, Y. Y.; Tang, G. T.; Zhang, L. H.; Kong, S. Y.; Zhu, S. J.; Pei, Y. Y. *Journal of Drug Targeting* **2010**, *18*, 389.
- [48] Martinho, N.; Florindo, H.; Silva, L.; Brocchini, S.; Zloh, M.; Barata, T. *Molecules* **2014**, *19*, 20424.
- [49] Jain, V.; Bharatam, P. V. *Nanoscale* **2014**, *6*, 2476.
- [50] Maiti, P. K.; Li, Y.; Cagin, T.; Goddard, W. A., III *Journal of Chemical Physics* **2009**, *130*.
- [51] Barraza, L. F.; Alderete, J. B.; Jimenez, V. A.; Gavin, J. A. *Monatshefte Fur Chemie* **2012**, *143*, 29.

- [52] Gurtovenko, A. A.; Lyulin, S. V.; Karttunen, M.; Vattulainen, I. *Journal of Chemical Physics* **2006**, *124*.
- [53] Han, M.; Chen, P. Q.; Yang, X. Z. *Polymer* **2005**, *46*, 3481.
- [54] Vergara-Jaque, A.; Comer, J.; Monsalve, L.; Gonzalez-Nilo, F. D.; Sandoval, C. *Journal of Physical Chemistry B* **2013**, *117*, 6801.
- [55] Carrasco-Sanchez, V.; Vergara-Jaque, A.; Zuniga, M.; Comer, J.; John, A.; Nachtigall, F. M.; Valdes, O.; Duran-Lara, E. F.; Sandoval, C.; Santos, L. S. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *73*, 250.
- [56] Caballero, J.; Poblete, H.; Navarro, C.; Alzate-Morales, J. H. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **2013**, *39*, 71.
- [57] Chen, S.-l.; Pan, M.-q.; Tian, W.-d. *Acta Polymerica Sinica* **2014**, 1062.
- [58] Tanis, I.; Karatasos, K. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 10984.
- [59] Yang, L.; da Rocha, S. R. P. *Molecular Pharmaceutics* **2014**, *11*, 1459.
- [60] Hedden, R. C.; Bauer, B. J. *Macromolecules* **2003**, *36*, 1829.
- [61] Lee, E. S.; Gao, Z. G.; Bae, Y. H. *Journal of Controlled Release* **2008**, *132*, 164.
- [62] Manchun, S.; Dass, C. R.; Sriamornsak, P. *Life Sciences* **2012**, *90*, 381.
- [63] Jin, Y. G.; Ren, X.; Wang, W.; Ke, L. J.; Ning, E. J.; Du, L. N.; Bradshaw, J. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *420*, 378.
- [64] Matsumura, Y.; Maeda, H. *Cancer Research* **1986**, *46*, 6387.
- [65] Lee, H.; Larson, R. G. *Macromolecules* **2011**, *44*, 2291.
- [66] Stewart, J. J. P. *Journal of Computational Chemistry* **1991**, *12*, 320.
- [67] M. J. Frisch, G. W. T., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople.
- [68] MacKerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 3586.
- [69] Lee, H.; Venable, R. M.; MacKerell, A. D., Jr.; Pastor, R. W. j. *Biophysical Journal* **2008**, *95*, 1590.
- [70] Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, *79*, 926.
- [71] Jang, Y. H.; Sowers, L. C.; Cagin, T.; Goddard, W. A. *Journal of Physical Chemistry A* **2001**, *105*, 274.

- [72] *Textbook of Organic, Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 10th edition.*; Wilson.; Gisvold's, Eds. New York, 1998.
- [73] Zoete, V.; Cuendet, M. A.; Grosdidier, A.; Michielin, O. *Journal of Computational Chemistry* **2011**, 32, 2359.
- [74] Barraza, L. F.; Jiménez, V. A.; Alderete, J. B. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2015**, 216, 1689.
- [75] Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L.; Schulten, K. *Journal of Computational Chemistry* **2005**, 26, 1781.
- [76] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **1996**, 14, 33.
- [77] Buczkowski, A.; Sekowski, S.; Grala, A.; Palecz, D.; Milowska, K.; Urbaniak, P.; Gabryelak, T.; Piekarski, H.; Palecz, B. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, 408, 266.
- [78] *Phase-Solubility Techniques*; Higuchi, T.; Connors, K. A., Eds. New York, 1965.
- [79] Cheng, Y. Y.; Li, Y. W.; Wu, Q. L.; Xu, T. W. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, 112, 12674.
- [80] Gibaldi, M.; Feldman, S. *J Pharm Sci.* **1967**, 56, 1238.
- [81] Higuchi, T. *J Pharm Sci.* **1963**, 52, 1145.
- [82] Barradas, R. G.; Fletcher, S.; Porter, J. D. *Canadian Journal of Chemistry* **1976**, 54, 1400.
- [83] Liu, Y.; Chen, C.-Y.; Chen, H.-L.; Hong, K.; Shew, C.-Y.; Li, X.; Liu, L.; Melnichenko, Y. B.; Smith, G. S.; Herwig, K. W.; Porcar, L.; Chen, W.-R. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2010**, 1, 2020.
- [84] Devarakonda, B.; Judefeind, A.; Chigurupati, S.; Thomas, S.; Shah, G. V.; Otto, D. P.; de Villiers, M. M. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2007**, 3, 384.
- [85] Jones, L.; Atkins, P., *Chemistry: Molecules matter and changes*. W. H. Freeman and Company, New York, 2000.