

## APLICACIONES BIOMÉDICAS DE NANOGELES DENDRÍTICOS TERMOSENSIBLES

**Maria Molina<sup>1</sup>, Julian Bergueiro<sup>1</sup>, Ana Sousa-Hervés<sup>1</sup>, Marcelo Calderón<sup>1,2,\*</sup>**

1) Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin. Berlin, Alemania. Correo electrónico: marcelo.calderon@fu-berlin.de

2) Helmholtz Virtuelles Institut – Multifunctional Biomaterials for Medicine, Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Teltow, Alemania

*Recibido: Diciembre de 2014; Aceptado: Febrero 2015*

### RESUMEN

Los nanogeles son redes entrecruzadas de tamaño nanométrico compuestas por cadenas poliméricas hidrófilas o anfifílicas capaces de absorber y liberar grandes cantidades de agua. Comúnmente son desarrollados como vehículos para transportar fármacos o biomacromoléculas. Por otro lado, los polímeros termosensibles experimentan una transición de fase en agua a una determinada temperatura conocida como temperatura de transición de fase ( $T_f$ ). Como consecuencia cambian su estado de agregación, exhiben un cambio conformacional y experimentan un colapso, hinchamiento o micelización bajo un estímulo térmico. Por lo tanto, una combinación de las propiedades de los nanogeles con la de los polímeros termosensibles representa un enfoque prometedor para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos que revelan altas capacidades de carga y mejoran la estabilidad *in vivo* de los fármacos encapsulados. En el presente documento, se hace una revisión del desarrollo de nanogeles dendríticos (dNGs) termosensibles para aplicaciones biomédicas, usando diferentes polímeros lineales termosensibles y poliglicerol dendrítico como agente entrecruzante.

**Palabras claves:** Nanogeles, termosensibilidad, poliglicerol dendrítico, aplicaciones biomédicas.

### ABSTRACT

Nanogels are nanosized crosslinked networks composed of hydrophilic or amphiphilic polymer chains that are capable of absorbing and releasing large quantities of water. They are developed as carriers to transport drugs or biomacromolecules. Thermoresponsive polymers undergo a phase transition at a certain temperature in aqueous media known as phase transition ( $T_p$ ). As a consequence, they can change their aggregation state, exhibit conformational change and undergo shrinking, swelling, or micellization upon a thermal trigger. The combination of the nanogel properties and thermo-responsiveness represents a promising approach for the development of stimuli-controlled release systems, which reveals high loading capacity and improves the *in vivo* drug stability. Herein, the engineering of thermoresponsive dendritic nanogels (dNGs) using different thermoresponsive linear polymers and dendritic polyglycerol as macro-crosslinker for biomedical applications is reviewed.

**Key words:** Nanogels, thermoresponsive, Poly(glycerol) dendritic, biomedical applications.

### INTRODUCCIÓN

El término nanogel (NG) se refiere a redes poliméricas entrecruzadas de tamaño nanométrico. Estas redes presentan una serie de propiedades intrínsecas ideales para aplicaciones biomédicas, como un alto contenido acuoso, flexibilidad, compatibilidad celular y excelente dispersabilidad/solubilidad en agua [1-3]. Por estas características, los NGs son principalmente estudiados como vehículos transportadores de fármacos, los cuales pueden colapsar o hincharse significativamente liberando o absorbiendo grandes cantidades de agua. Específicamente, los NGs inteligentes pueden responder a estímulos ambientales como la temperatura, pH o luz, facilitando así la liberación controlada de fármacos en el destino deseado bajo la acción del mencionado estímulo externo (Figura 1) [1]. Entre todos los NGs inteligentes, los sistemas termosensibles han

mostrado gran versatilidad debido al preciso control sobre la respuesta del sistema a los cambios térmicos. Generalmente esta termosensibilidad se logra a través de la utilización de materiales poliméricos que responden a la temperatura. Estos polímeros presentan una temperatura de transición de fase ( $T_f$ ) a partir de la cual su solubilidad en agua cambia drásticamente [4-6]. Asimismo, el agente entrecruzante utilizado juega un papel muy importante en las propiedades de los NGs, concretamente en el grado de hinchamiento y el tamaño de poro, entre otras [7,8]. Los polímeros hiperramificados o dendríticos ofrecen grandes ventajas frente a los agentes entrecruzantes moleculares, entre ellas se incluye la posibilidad de obtener una alta densidad de entrecruzamiento incluso a bajas concentraciones poliméricas y, aún más importante, la posibilidad de modificar el agente entrecruzante con diversas funcionalidades.

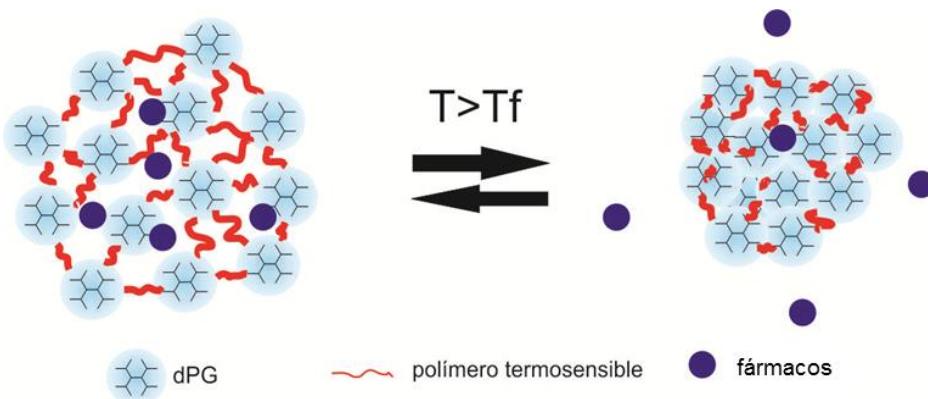


Figura 1. Liberación de fármacos a partir de NGs termosensibles entrecruzados con dPG.

En este trabajo revisaremos los estudios basados en NGs termosensibles entrecruzados con poliglicerol dendrítico (dPG) así como los componentes básicos empleados en su construcción, los métodos sintéticos y las aplicaciones biomédicas.

## COMPONENTES BÁSICOS

Los componentes básicos empleados en la síntesis de estos nanosistemas son de gran importancia teniendo en cuenta que su fin último es el empleo en aplicaciones biomédicas. Parámetros como la citotoxicidad y biocompatibilidad del sistema dependerán directamente de la naturaleza de dichos componentes. Los poliéteres como poliglicerol lineal termosensible (tPG), poli(oligo(etilenglicol) metil eter metacrilato) (POEGMA) y dPG son buenos candidatos debido a su perfil altamente biocompatible (Figura 2) [9-13].

Los polímeros hiperramificados son macromoléculas con una estructura bien definida, la cual tiene gran impacto tanto en sus propiedades físicas como químicas. Por otro lado, la alta densidad de grupos terminales funcionalizables, inherente en estos sistemas, ofrece la posibilidad de generar

interacciones multivalentes con sustratos biológicos [14,15]. En particular, el dPG combina un alto grado de grupos funcionalizables con la estructura estable y biocompatible de los poliéteres. Estas propiedades pueden ser utilizadas en sistemas de liberación controlada de fármacos, para marcar fluorescentemente a estos vehículos y también para conseguir altas concentraciones locales de drogas cuando éstas se unen covalentemente al dPG. Asimismo, es posible utilizar dPG como molécula entrecruzante en geles debido a la capacidad de funcionalizar su superficie con grupos reactivos. Por ejemplo, es posible introducir grupos vinilo (dPG-Ac) y así poder utilizarlo en polymerizaciones radicales o grupos alquino (dPG-ciclooctino, dPG-Oct) para utilizarlo en reacciones de cicloadición alquino-azida [16].

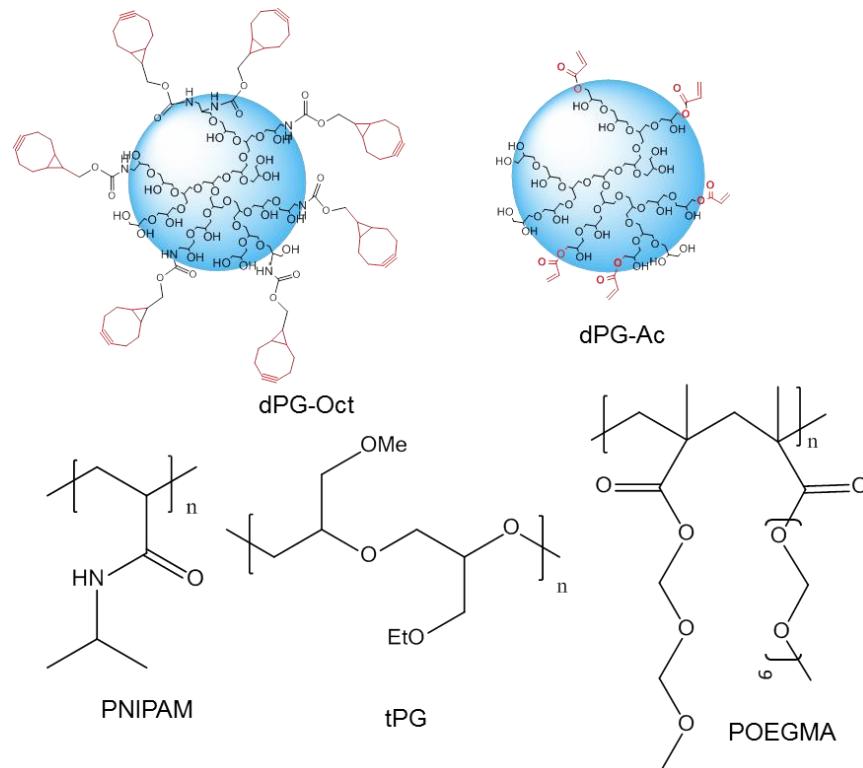


Figura 2. Componentes básicos de NGs termosensibles basados en dPG.

Los polímeros termosensibles con una  $T_f$  cercana a la temperatura corporal son ampliamente utilizados en sistemas de liberación de fármacos, entre ellos poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAM), que presenta una  $T_f$  en agua de 32°C, es uno de los más estudiados [17-19]. La preparación y caracterización de microgeles basados en PNIPAM fue publicada por primera vez en 1986 por Pelton [20] y desde entonces se han realizado numerosos estudios en este campo [4,21,22]. Por ejemplo, nuestro grupo de investigación ha desarrollado la síntesis de NGs de PNIPAM y de NIPAM copolimerizado con 2-(dimetilamino) etil metacrilato (DMAEMA) entrecruzados con dPG-Ac a través de

polimerización radical [23,24]. En comparación con los NGs de PNIPAM entrecruzados con otros agentes entrecruzantes, se observó que la presencia del dPG en los NGs impide la precipitación de los mismos en estado colapsado. Esto es especialmente importante en aplicaciones biomédicas donde la precipitación del vehículo dentro del torrente sanguíneo es perjudicial.

Por otro lado, POEGMA también fue entrecruzado con dPG-Ac empleando polimerización radical [25]. La ventaja de este polímero no es solo su biocompatibilidad, sino que su  $T_f$  puede ser fácilmente modificable entre 26 y 90°C controlando el peso molecular del polímero además de empleando 2-(2-metoxietoxi)etil metacrilato como comonómero [26].

El tPG, basado en metil glicidil eter (GME) y etil glicidil eter (EGE), exhibe una  $T_f$  que depende de la proporción GME/EGE y puede ser modificada entre 15 y 57°C [27-29]. Este polímero se ha utilizado para la formación de NGs termosensibles a través de una reacción de cicloadición utilizando dPG-Oct como agente entrecruzante [30].

## MÉTODOS SINTÉTICOS

La síntesis de NGs se basa típicamente en la generación de redes entrecruzadas en un espacio confinado de manera tal que se formen nanopartículas en su interior. Generalmente, la formación de redes se logra a partir de la polimerización de los monómeros en presencia de un agente entrecruzante o, alternativamente, a través del entrecruzamiento de polímeros sintetizados previamente [2].

Con anterioridad, se han utilizado diferentes metodologías sintéticas para la formación de NGs entre las que se encuentran la miniemulsión, dispersión o precipitación, entre otras. Una de las más utilizadas debido a su simpleza, fácil escalabilidad y reproducibilidad es la precipitación por polimerización. Esta comienza en una fase homogénea donde los monómeros e iniciador son solubles, pero se convierte en heterogénea durante la reacción ya que los polímeros formados son insolubles. Nuestro grupo de investigación ha utilizado esta técnica para la formación de dNGs termosensibles a través de una polimerización radicalaria utilizando dPG modificado con grupos vinilos y diferentes monómeros vinílicos. Por ejemplo, siguiendo esta estrategia se ha reportado la síntesis de dNGs monodispersos de PNIPAM-dPG (Figura 3) [23]. En este trabajo se estudió la influencia del porcentaje de entrecruzamiento en el tamaño y en la  $T_f$  de los NGs. Los resultados obtenidos demuestran que a medida que aumenta el porcentaje de agente entrecruzante de 22 a 60% (P/P) el tamaño disminuye de 160 a 75 nm a 25°C. Por otro lado, al aumentar la cantidad de dPG en los NGs la respuesta a la temperatura disminuye.

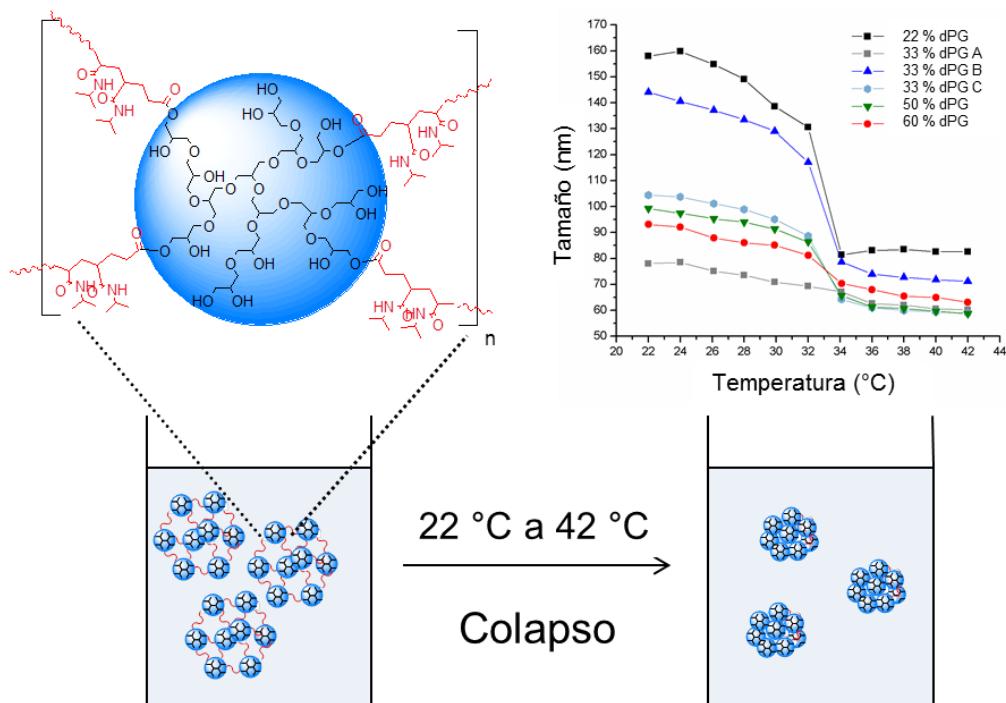


Figura 3. Síntesis de NGs termosensibles mediante precipitación por polimerización. Figura adaptada con permiso de referencia [23]. Publicado por The Royal Society of Chemistry.

En un trabajo posterior se demostró que copolimerizando el NIPAM con un monómero hidrófilo como DMAEMA, se consiguió incrementar la  $T_f$  e introducir, además, sensibilidad al pH [24]. En dicho trabajo, se obtuvieron NGs con diferentes porcentajes del monómero catiónico y se observó que el potencial Z se hacía más positivo a medida que aumentaba del porcentaje del monómero cargado. No solo fue posible modificar la  $T_f$  desde 34°C para PNIPAM-dPG hasta 40°C para PNIPAM-co-12%DMAEMA-dPG sino que además, la  $T_f$  mostró una dependencia con el pH en los dNGs que contienen DMAEMA. La precipitación por polimerización también fue utilizada con otro monómero termosensible, OEGMA. En este estudio se demostró que es posible controlar el tamaño de partícula no solo variando la cantidad de agente entrecruzante sino también variando la cantidad de grupos vinilos en el dPG. En concordancia con los resultados obtenidos para PNIPAM se observó que el tamaño de los dNGs disminuye con el aumento del porcentaje de dPG y también con el aumento en los grupos vinilos. Por otro lado, fue posible modificar la  $T_f$  de los dNGs utilizando OEGMA de distintos pesos moleculares siguiendo el estudio de *Lutz y colaboradores* [31].

Además de la precipitación por polimerización, la nanoprecipitación es también una técnica conocida para la formación de nanopartículas poliméricas. Esta técnica está basada en la inyección de un polímero disuelto en un disolvente en un mayor volumen de un no-disolvente, produciendo así la precipitación del sistema en nanopartículas debido a la miscibilidad del disolvente y no-

disolvente entre ellos. Si bien la nanoprecipitación es usada para el procesamiento de polímeros desde la década de los ochenta, fue recientemente descripta por *Haag y colaboradores* en la formación de dNGs [32,33]. Utilizando esta técnica nuestro grupo de investigación reportó la síntesis de dNGs de tPG entrecruzado con dPG a través de una reacción tipo “click” promovida por tensión anular, sin necesidad de utilizar catalizadores metálicos (cicloadición alquino-azida) [30]. En este caso, el agente entrecruzante (dPG-Oct) y el polímero termosensible funcionalizado con grupos azida (tPG-N<sub>3</sub>) se disolvieron en DMF y fueron nanoprecipitados en agua por encima de la T<sub>f</sub> del polímero (45°C) (Figura 4). Al entrecruzar polímeros pre-formados es posible controlar el peso molecular del polímero termosensible y por ende el tamaño del poro de la red tridimensional. Las condiciones suaves de esta síntesis, que no requiere altas temperaturas o presencia de radicales, hacen de éste un método de síntesis ideal para la encapsulación *in situ* de moléculas bioactivas.

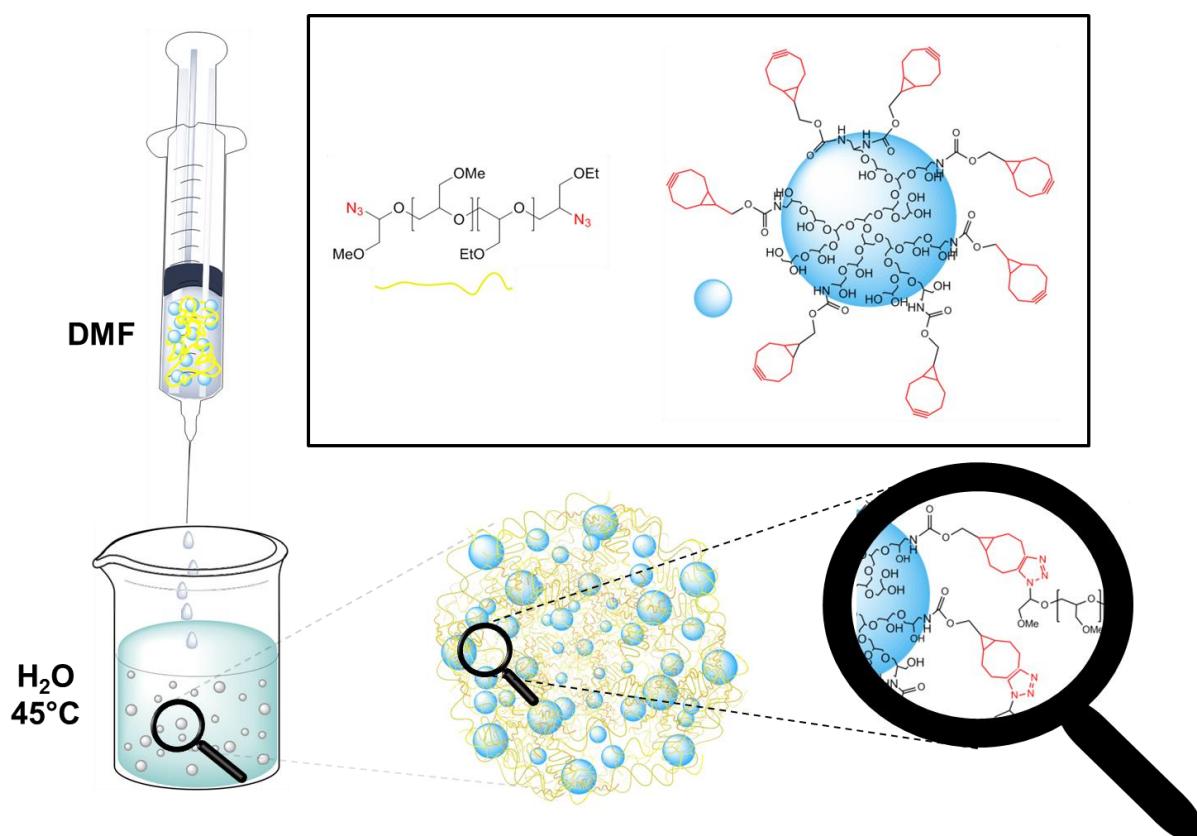


Figura 4. Representación de la formación de dNG vía termo nanoprecipitación. Con permiso de referencia [30]. Publicado por The Royal Society of Chemistry.

## APLICACIONES BIOMÉDICAS

Como se discutió en las secciones anteriores, los dNGs termosensibles mostraron propiedades fisicoquímicas óptimas para su aplicación *in vitro* e *in vivo* debido a su alta dispersabilidad en agua, T<sub>f</sub> ajustable y un tamaño adecuado para beneficiarse de la acumulación pasiva en tumores sólidos

por efecto EPR (del inglés *Enhanced Permeability and Retention*). Principalmente los dNGs fueron utilizados como sistemas de liberación controlada de drogas anticancerígenas y como vehículos de proteínas para aplicación dérmica.

Todos los dNGs mostraron alta citocompatibilidad *in vitro*, así como buena internalización en células cancerígenas de pulmón A549, lo cual es un requisito fundamental para utilizar estos sistemas como transportadores de fármacos en terapia anticancerígena (Figura 5).

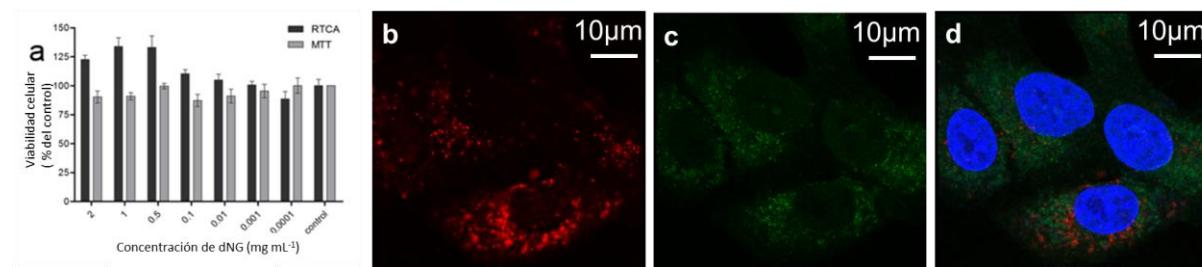


Figura 5. Evaluación biológica de dNGs termosensibles basados en tPG y dPG en células tumorales A549 (a) perfil citotóxico determinado por análisis celular en tiempo real (RTCA) y por reducción metabólica de (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) (MTT). (b) Internalización celular de dNGs marcados fluorescentemente con cianina 5 (Cy5). (c) Las áreas verdes representan los endosomas tempranos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC). (d) Las áreas azules representan los núcleos celulares marcados con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Con permiso de referencia [30]. Publicado por The Royal Society of Chemistry.

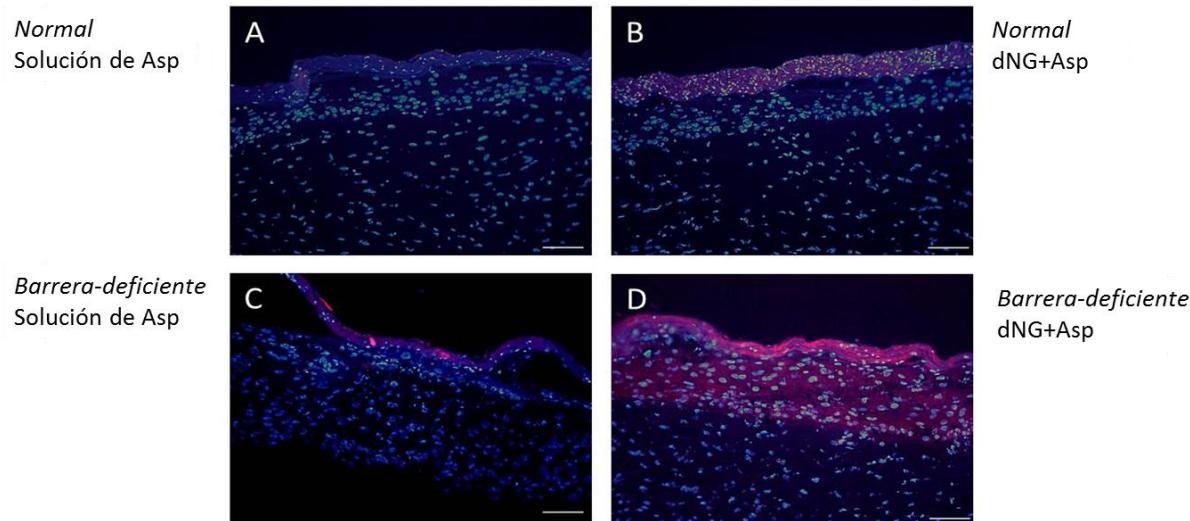


Figura 6. Penetración de asparaginasa (Asp) en modelos de piel normal y barrera deficiente después de la aplicación de una solución de Asp (A y C) o PNIPAM-dPG cargados con Asp (B y D).

Específicamente, los dNGs basados en PNIPAM fueron utilizados como vehículos transportadores de diferentes proteínas (asparaginasa, albúmina y transglutaminasa) para su aplicación dérmica. Se demostró que es posible liberar las proteínas, previamente encapsuladas, a partir de un aumento de la temperatura por encima de la  $T_f$  del dNG. Además de proteger la

actividad de las biomoléculas, la utilización del vehículo polimérico facilita la penetración de las proteínas específicamente en la epidermis (Figura 6) [34].

Al modificar estos dNGs con DMAEMA se demostró que es posible aumentar la capacidad de encapsulación de la droga antitumoral doxorrubicina, así como aumentar la velocidad de liberación de la droga bajo un estímulo térmico. Estos resultados son muy prometedores para su aplicación en terapia anticancerígena.

En el caso de los dNGs sintetizados vía nanoprecipitación se demostró la posibilidad de encapsular doxorrubicina *in situ* con altas eficiencias de encapsulación de hasta 50% (P/P). Actualmente, el estudio de estos sistemas se continúa desarrollando para demostrar la eficacia de estos vehículos *in vivo*.

## CONCLUSIONES

Los dNGs se caracterizan por tener grupos funcionalizables, una arquitectura definida y gran versatilidad sintética. La posibilidad de modificar las propiedades fisicoquímicas de los dNGs para aplicaciones específicas ha abierto nuevas oportunidades en los campos farmacéuticos y biomédicos. La modificación de estas propiedades allana la futura aplicación *in vivo* de estos sistemas mejorando parámetros de crucial importancia como la seguridad y biocompatibilidad. Como se discutió en este trabajo, el perfil citotóxico de los dNGs termosensibles muestra tolerabilidad a altas concentraciones, resultado de la naturaleza biocompatible de los componentes básicos empleados [35-37]. La posibilidad de modificar el tamaño, la capacidad de liberar biomoléculas en respuesta a la temperatura junto con su potencial biodegradación, hace de estos dNGs plataformas muy prometedoras para aplicaciones biomédicas.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen el apoyo de *Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)/German Research Foundation* vía SFB1112, Proyecto A04, el apoyo financiero del *Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)* a través del subsidio NanoMatFutur (13N12561) y al *Helmholtz Virtual Institute, Multifunctional Biomaterials for Medicine*. Dr. *Maria Molina* agradece a la *Fundación Alexander von Humboldt* por una beca postdoctoral. Dr. *Ana Sousa-Hervés* agradece por una beca postdoctoral *Marie Curie IEF* (Proyecto 302717). Dr. *Julian Bergueiro* agradece al *Dahlem Research Center* a través del programa “*Dahlem International Network Postdocs*” por una beca postdoctoral.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Kabanov AV, Vinogradov SV, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 5418 (2009)
- 2 Chacko RT, Ventura J, Zhuang J, Thayumanavan S, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 836 (2012)
- 3 Asadian-Birjand M, Sousa-Herves A, Steinhilber D, Cuggino JC, Calderon M, *Curr. Med. Chem.* **19**, 5029 (2012)
- 4 Kawano T, Niidome Y, Mori T, Katayama Y, Niidome T, *Bioconjugate Chem.* **20**, 209 (2009)
- 5 Blackburn WH, Dickerson EB, Smith MH, McDonald JF, Lyon LA, *Bioconjugate Chem.* **20**, 960 (2009)
- 6 Bergueiro J, Calderón M, *Macromol. Biosci.* (2014). DOI: 10.1002/mabi.201400362.

- 7 Peppas NA, Hilt J Z, Khademhosseini A, Langer R, *Adv. Mat.* **18**, 1345 (2006)  
8 Pujana MA, Pérez-Álvarez L, Cesteros Iturbe LC, Katime I, *Polymer* **53**, 3107 (2012)  
9 Weinhart M, Becherer T, Schnurbusch N, Schwibbert K, Kunte H-J, Haag R, *Adv. Eng. Mater.* **13**, B501 (2011)  
10 Kainthan RK, Janzen J, Levin E, Devine DV, Brooks DE, *Biomacromolecules*, **7**, 703 (2006)  
11 Calderon M, Quadir MA, Sharma SK, Haag R, *Adv. Mat.* **22**, 190 (2010)  
12 Wilms D, Stiriba S-E, Frey H, *Acc. Chem. Res.* **43**, 129 (2009)  
13 Zhang, H. & Grinstaff, M. W. *Macromol. Rapid Commun.* **35**, 1906 (2014).  
14 Klajnert, B. & Bryszewska, M. *Acta Biochim. Pol.* **48**, 199 (2001).  
15 Calderon M, Strumia M, *Rev. LatinAm. Metal. Mat.* **33**, 2 (2013).  
16 Sunder, A., Mülhaupt, R., Haag, R. & Frey, H. *Adv. Mat.* **12**, 235 (2000).  
17 Chalal M, Ehrburger-Dolle F, Morfin I, Bley F, Aguilar de Armas M-R, López Donaire ML, San Roman J, Bolgen N, Piskin E, Ziane O, Casalegno R, *Macromolecules*, **43**, 2009 (2010)  
18 Boutris C, Chatzi EG, Kiparissides C, *Polymer*, **38**, 2567 (1997)  
19 Tokuhiro T, Amiya T, Mamada A, Tanaka T, *Macromolecules*, **24**, 2936 (1991)  
20 Pelton RH, Chibante P, *Colloids Surf.*, **20**, 247 (1986)  
21 Molina MA, Rivarola CR, Barbero CA, *Eur. Polym. J.*, **47**, 1977 (2011)  
22 Zhang B, Sun S, Wu P, *Soft Matter* **9**, 1678 (2013)  
23 Cuggino JC, Alvarez I CI, Strumia MC, Welker P, Licha K, Steinhilber D, Mutihac R-C, Calderon M, *Soft Matter.*, **7**, 11259 (2011)  
24 Molina M, Giulbudagian M, Calderón M, *Macromol. Chem. Phys.* (2014)  
25 Asadian-Birjand M, Rancan F, Cuggino JC, Achazi K, Mutihac RC, Dernedde J, Vogt A, Calderón. M in 2014 CRS Annual Meeting  
26 Lutz J-F, Akdemir, Ö, Hoth A, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 13046 (2006).  
27 Aoki S, Koide A, Imabayashi S-I, Watanabe M, *Chemistry Letters*, **31**, 1128 (2002)  
28 Reinicke S, Schmelz J, Lapp A, Karg M, Hellweg T, Schmalz H, *Soft Matter* **5**, 2648 (2009)  
29 Weinhart M, Becherer T, Haag R, *Chem. Commun. (Camb)* **47**, 1553 (2011)  
30 Giulbudagian M, Asadian-Birjand M, Steinhilber D, Achazi K, Molina M, Calderon M, *Polym. Chem.* **5**, 6909 (2014)  
31 Lutz J-F, Akdemir Ö, Hoth A, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 13046 (2006)  
32 Steinhilber D, Witting M, Zhang X, Staegemann M, Paulus F, Friess W, Küchler S, Haag R, *J. Controlled Release*, **169**, 289 (2013)  
33 Zhang X, Achazi K, Steinhilber D, Kratz F, Dernedde J, Haag R., *Controlled Release* **174**, 209 (2014)  
34 Molina M, Giulbudagian M, Asadian-Birjand M, Wedepohl S, Calderon, M. en XIV SLAP (*Simpósio Latinoamericano de Polímeros*)  
35 Duncan R, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2**, 347 (2003)  
36 Kainthan RK, Brooks DE, *Biomaterials*, **28**, 4779 (2007)  
37 Kainthan RK, Hester SR, Levin E, Devine DV, Brooks DE, *Biomaterials* **28**, 4581 (2007)