

# TRABAJO FIN DE GRADO

## Síntesis, estudio y caracterización de dendrímeros globulares como transportadores unimoleculares de fármacos contra la hepatitis C: toxicidad, internalización y actividad terapéutica.

Synthesis, study and characterization of globular dendrimers as unimolecular drug carriers against hepatitis C: toxicity, internalization and therapeutic activity.

**Laura Cambroner Arregui**

Directores:

**José Luis Serrano Ostáriz**

**Olga Abián Franco**

Grado en Biotecnología

Facultad de ciencias

2018



**Universidad  
Zaragoza**



Instituto Universitario de Investigación  
en Nanociencia de Aragón  
**Universidad Zaragoza**



Instituto Universitario de Investigación  
Biocomputación y Física  
de Sistemas Complejos  
**Universidad Zaragoza**

# Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Objetivos y plan de trabajo.....	5
4. Materiales y métodos.....	6
4.1 Síntesis y caracterización.....	6
4.1.1 Síntesis y caracterización del derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)- (NHBoc) <sub>8</sub> .....	8
4.1.2 Síntesis y caracterización del derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)- (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> TFA <sup>-</sup> ) <sub>8</sub> .....	9
4.2 Encapsulación de fármacos.....	9
4.2.1 Encapsulación de tiratricol y ácido iopanoico.....	9
4.2.2 Encapsulación de ribavirina.....	10
4.2.3 Formación de cápsulas vacías.....	10
4.3 Microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	10
4.4 Cultivos celulares.....	10
4.5 Ensayos celulares.....	12
5. Resultados y discusión.....	13
5.1 Síntesis.....	13
5.1.1 Síntesis del dendrón de bisGMPA de tercera generación.....	13
5.1.2 Síntesis del derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> TFA <sup>-</sup> ) <sub>8</sub> .....	14
5.2 Caracterización.....	15
5.3 Encapsulación de fármacos.....	17
5.3.1 Morfología y tamaño de los encapsulados.....	18
5.4 Ensayos celulares.....	19
5.4.1 Ensayos de citotoxicidad.....	20
5.4.2 Ensayos de inhibición viral.....	21
6. Resumen de resultados y conclusiones del trabajo.....	23
7. Bibliografía.....	24
8. Anexos.....	26

## 1. Resumen

En los últimos años se han conseguido mejoras en el desarrollo de nuevos tratamientos frente a la hepatitis C. No obstante, debido a la aparición de resistencias y a que los tratamientos no son eficaces en todas las poblaciones, surge la necesidad de encontrar nuevas terapias. Previamente se identificaron, mediante procesos de "screening", posibles compuestos con actividad antiviral, entre los que se encuentran el ácido iopanoico y el tiratricol. Sin embargo, éstos no presentaban una buena actividad antiviral en ensayos *in vitro*, por lo que se plantea la necesidad de alternativas. Entre ellas se encuentra la llevada a cabo en este trabajo, la encapsulación de fármacos en macromoléculas que sirvan de transportadores; en este caso, se ha empleado un polímero hiperramificado dendronizado. Esta molécula, sintetizada como parte de este trabajo, presenta un núcleo central lipofílico basado en *bis*MPA y está funcionalizada con dendrones basados en *bis*GMMPA en la periferia. Se ha empleado para la encapsulación de tiratricol y ácido iopanoico, y también para encapsular ribavirina, un fármaco utilizado previamente como tratamiento de la hepatitis C, pero con peores resultados que los tratamientos actuales. La morfología y el tamaño de los encapsulados y el derivado dendrítico vacío se han caracterizado mediante microscopía electrónica de transmisión. Tanto los tres fármacos encapsulados, como el derivado dendrítico vacío, se han estudiado en ensayos celulares para comprobar su actividad antiviral y su citotoxicidad. Además, en el caso de los encapsulados, la actividad antiviral se ha comparado con la de los fármacos libres. Los encapsulados de ribavirina y tiratricol no han parecido mejorar el efecto del fármaco libre, mientras que los encapsulados de ácido iopanoico sí. No obstante, es necesario realizar más ensayos que confirmen estos resultados puesto que los realizados en este trabajo no son suficientemente fiables si tenemos en cuenta los valores de los controles obtenidos.

Improvements in the development of new drugs against hepatitis C have been achieved in the last years. Nevertheless, due to the appearance of resistances and the low treatment efficacy in some populations, it is necessary to find new therapies. Previously, new possible antiviral compounds were found by screening process, for example, iopanoic acid and tiratricol. However, they did not show good antiviral activity *in vitro*, so alternatives are needed. Among them it is found the one carried out in this work, drug encapsulation into macromolecules as drug carriers; in this work, a dendronized hyperbranched polymer has been used. This molecule, synthesized as part of this work, presents a lipophilic core based on *bis*MMPA and it is functionalized with dendrons based on *bis*GMMPA on its periphery. It has been used to encapsulate tiratricol and iopanoic acid, as well as ribavirin, a drug previously used as hepatitis C treatment, but with worse efficacy than the actual ones. The morphology and size of the encapsulates and the empty dendritic derivative have been characterized by transmission electronic microscopy. The three drug encapsulates and the empty dendritic derivative have been studied in cellular assays in order to check their antiviral activity and cytotoxicity. Also, the antiviral activity of the drug encapsulates has been compared against the activity of the free drugs. Ribavirin and tiratricol encapsulates have not seemed to have better effect than the free drugs, while iopanoic acid has seemed to have better effect. However, it is necessary to carry out more assays to confirm these results, as the obtained in this work are not trustworthy enough due to the control values got.

## 2. Introducción

La hepatitis C es una enfermedad infecciosa provocada por el virus de la hepatitis C (VHC) que puede manifestarse en una forma aguda o crónica<sup>(1)</sup>. La infección aguda es minoritaria, se produce en el 15% de los casos y puede ser eliminada sin necesidad de tratamiento, algo que ocurre entre el 15% y el 45% de los casos<sup>(1,2)</sup>. En cuanto a la forma crónica, se desarrolla en el 80% de los casos<sup>(3)</sup> y se estima, según la Organización Mundial de la Salud, que actualmente afecta a unas 71 millones de personas en todo el mundo<sup>(1)</sup>. Esta forma puede acabar produciendo cirrosis hepática o cáncer de hígado, que son las principales causas de muerte de casi 400000 personas al año afectadas de hepatitis C<sup>(1)</sup>.

El VHC es un virus con envoltura que pertenece al género *hepacivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*. Su genoma consiste en una molécula de RNA monocatenario y polaridad positiva que presenta un marco de lectura abierto que codifica una poliproteína de unos 3000 aminoácidos. En la zona N-terminal están las proteínas estructurales del virus (participan en el ensamblaje de nuevas partículas virales y en el mecanismo de infección), mientras que en el resto del marco de lectura están las no estructurales (implicadas en la replicación del genoma viral)<sup>(4)</sup>. La poliproteína debe procesarse para dar lugar a las proteínas virales nombradas, proceso en el que intervienen, al menos, dos peptidasas de la célula huésped (para el procesamiento de las proteínas estructurales) y dos peptidasas virales, NS2 y NS3/4A (para el procesamiento de las no estructurales)<sup>(5)</sup>. Dada la importancia de la proteasa NS3/4A, así como de la proteína NS5A (implicada en la replicación viral y en la regulación de rutas celulares) y la proteína NS5B (RNA polimerasa RNA dependiente), en el ciclo viral, estas tres proteínas han sido utilizadas como dianas farmacológicas en tratamientos frente a la hepatitis C<sup>(4,5)</sup>.

El tratamiento actual de la enfermedad se basa en el uso de antivíricos de acción directa (AAD), que se dan principalmente de manera combinada. Se trata de fármacos que van a tener diferentes dianas, como la polimerasa NS5B (sofosbuvir), la proteína NS5A (daclatasvir) y la proteasa NS3/4A (simeprevir)<sup>(1,6)</sup>. Antes de estos fármacos se empleaban interferón  $\alpha$  y ribavirina, siendo este último un análogo de nucleósido que impide la síntesis del RNA viral, entre otros efectos<sup>(6,7)</sup>. Sin embargo, el tratamiento con los AAD ha resultado ser más efectivo, además de tener menos efectos adversos y tolerarse mejor. No obstante, todavía hay poblaciones que no se pueden tratar eficazmente con estos fármacos y, además, están apareciendo resistencias. Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevas opciones de tratamiento que puedan solucionar estos problemas<sup>(6)</sup>.

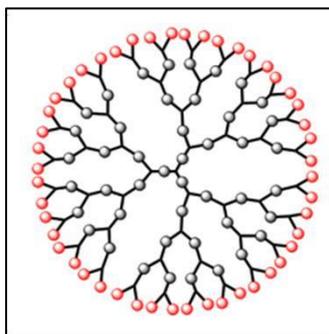
Para intentar resolver esto, en nuestro grupo de investigación se han realizado ensayos de *screening* en busca de posibles fármacos contra dianas específicas que, a poder ser, no sean susceptibles a la resistencia debida a mutaciones, pudiendo tener así una eficacia a largo plazo<sup>(8)</sup>. Una de estas dianas es la proteasa NS3, necesaria para la maduración viral. Es una proteína zinc dependiente, necesita de la unión del ion  $Zn^{2+}$  a su estructura parcialmente plegada para estabilizarse y poder llevar a cabo su acción<sup>(9)</sup>. La estrategia seguida ha sido buscar inhibidores alostéricos que se unan a la forma parcialmente plegada, estabilizándola y no dejando que se una el  $Zn^{2+}$ , impidiendo que la proteasa se active<sup>(8)</sup>. En el desarrollo de estos ensayos se descubrieron una serie de inhibidores de la proteasa, entre ellos el ácido iopanoico y el tiratricol<sup>(10)</sup>, objeto de estudio también en el presente trabajo.

Cuando se realizan estos ensayos de *screening* es necesario realizar un *screening* secundario en ensayos celulares *in vitro* para verificar la actividad de las moléculas en células infectadas, pues puede

no ser así. En el caso de los dos compuestos nombrados, éstos no tuvieron buena actividad en las células, por lo que se pensó que podrían estar teniendo problemas de internalización<sup>(10)</sup>.

No obstante, en los últimos años las nanopartículas han ganado importancia en el ámbito de la medicina, especialmente para transporte de fármacos, así como para intentar reducir su toxicidad manteniendo, o incluso aumentando, su actividad terapéutica<sup>(11)</sup>. Estas estructuras suponen una ventaja porque tienen un tamaño adecuado para la internalización celular y están formadas por materiales biodegradables<sup>(12)</sup>. Por tanto, pueden servir también para solucionar el problema de la internalización celular comentado. De hecho, en ensayos anteriores en el grupo se utilizó  $\gamma$ -ciclodextrina para encapsular tiratricol y ácido iopanoico, lo que aumentó sus actividades en estudios celulares, que habían resultado bajas en los ensayos de los fármacos libres<sup>(10)</sup>. Asimismo, es posible que la encapsulación pueda mejorar la actividad de otros fármacos, como la de la ribavirina ya nombrada, siendo este uno de los objetivos de este trabajo.

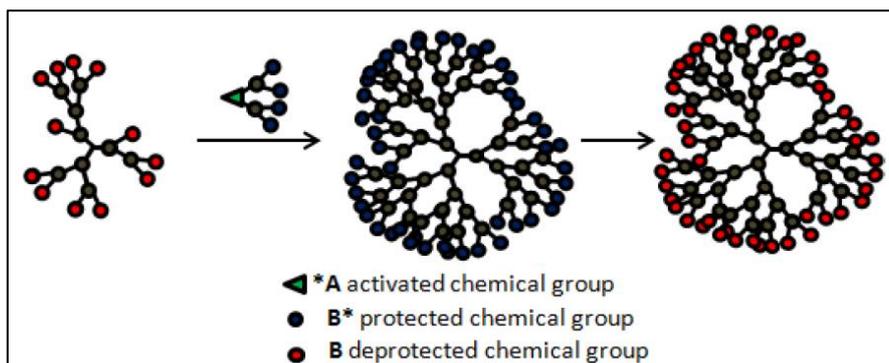
Una de las opciones es el uso de dendrímeros como transportadores de fármacos. Son macromoléculas monodispersas, con unas estructuras definidas, simétricas y altamente ramificadas<sup>(13,14)</sup>. Forman estructuras más o menos grandes en función del número de veces que se repiten los procesos iterativos de síntesis, dando lugar a diferentes generaciones de macromoléculas. El tamaño, la forma y la flexibilidad, entre otras características, irán cambiando conforme la molécula aumente de tamaño, tendiendo a una forma más globular cuanto más crecen (cuanto mayor es la generación). Además, otra característica es que son moléculas que presentan grupos terminales en sus extremos que pueden funcionalizarse, lo que permite la unión del dendrímero a diferentes moléculas<sup>(14)</sup>.



**Figura 1.** Ejemplo de la estructura de un dendrímero<sup>(15)</sup>.

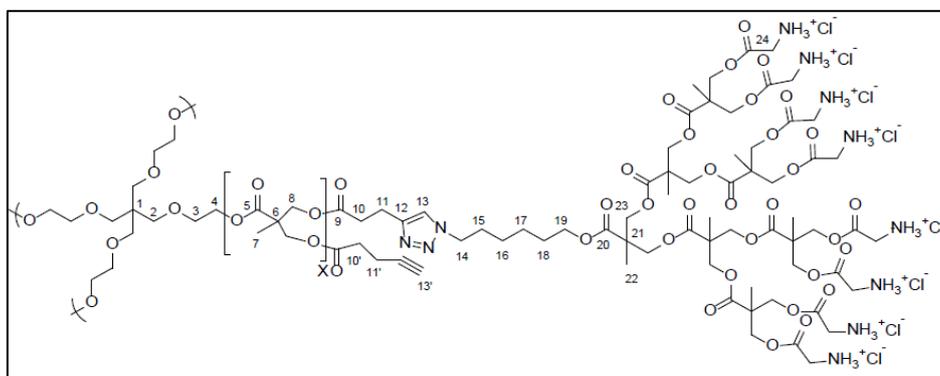
Uno de los problemas de los dendrímeros es que su síntesis requiere varios pasos. Otro problema de la preparación de estos compuestos es la dificultad que a veces conlleva su purificación para obtener compuestos monodispersos. Una alternativa más sencilla de síntesis son los polímeros hiperramificados, que se sintetizan en un único paso<sup>(16)</sup>. Éstos, igual que los dendrímeros, tienen un número de generación característico del que dependen su tamaño y el número de grupos periféricos. El problema es que son moléculas con una polidispersidad alta y una estructura más irregular que la de los dendrímeros.

Por ello, una alternativa es la síntesis de polímeros hiperramificados dendronizados, moléculas que presentan un polímero hiperramificado como núcleo central y que se funcionalizan, en un único paso, con dendrones en la periferia. Así se consigue tener, de manera sencilla, moléculas donde la polidispersidad se aproxima a 1 y con las características propias de los dendrímeros; por ejemplo, forman estructuras globulares y presentan grupos terminales que pueden funcionalizarse<sup>(17)</sup>.



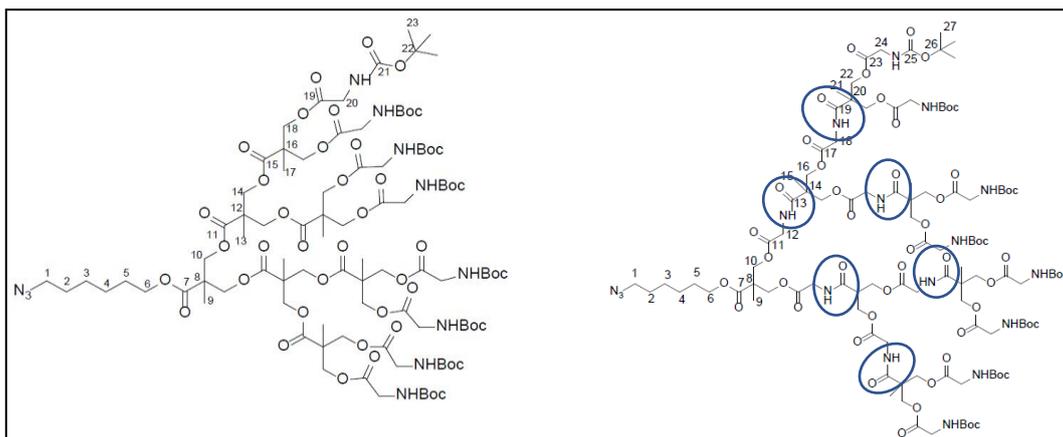
**Figura 2.** Esquema de síntesis de un polímero hiperramificado dendronizado<sup>(17)</sup>.

Los dendrímeros también tienen la característica de poder encapsular fármacos, por lo que se espera que los polímeros hiperramificados dendronizados también lo hagan. En trabajos previos del Grupo de Cristales Líquidos y Polímeros, con el que también se ha llevado a cabo este trabajo, se realizaron estudios de encapsulación de fármacos antimaláricos empleando estas estructuras, consiguiéndose el objetivo buscado. Se sintetizaron diferentes derivados dendríticos, todos ellos con un polímero hiperramificado basado en el ácido 2,2'-bis(hidroxiometil) propiónico (*bis*MPA) en el núcleo de la macromolécula, pero de diferentes generaciones. En todos ellos se introdujo el mismo dendrón, también basado en el *bis*MPA y de tercera generación. La encapsulación en este caso se produce gracias a que el derivado dendrítico presenta un núcleo lipofílico donde se introducen los fármacos, mientras que el exterior de la molécula es hidrofílico, se encuentra cargado positivamente debido a los grupos amino terminales que presenta<sup>(17)</sup>.



**Figura 3.** Estructura del polímero hiperramificado dendronizado basado en *bis*MPA; X = 2, 3 o 4<sup>(17)</sup>.

Por otro lado, se sintetizó también en el grupo de investigación un polímero hiperramificado dendronizado con el mismo núcleo que el ya comentado, pero con dendrones de tercera generación basados en el ácido 2,2'-bis(gliciloximetil) propiónico o *bis*GMPA, que en este caso se empleó para transfección génica y no para encapsulación de fármacos. El *bis*GMPA (poli(éster amida)) se diferencia del *bis*MPA (poliéster) por la incorporación de grupos glicina en su estructura, formándose grupos amida donde antes había grupos éster (figura 4). Este cambio supone un beneficio en el campo de la biomedicina, pues favorece la interacción entre las células y las macromoléculas y mejora la biodegradabilidad de éstas<sup>(18)</sup>.



**Figura 4.** Esquema de los dendrones de *bisMPA* (izquierda) y *bisGMPA* (derecha) de tercera generación<sup>(17)</sup>. Marcados los grupos amida en la molécula de *bisGMPA*.

### 3. Objetivos y plan de trabajo

Los **objetivos** de este trabajo han sido los siguientes:

- La síntesis y caracterización de un polímero hiperramificado dendronizado con un núcleo lipofílico basado en *bisMPA* y funcionalizado en la periferia con dendrones hidrofílicos de *bisGMPA* de tercera generación.
- El empleo de dicho derivado dendrítico para la encapsulación de tres fármacos frente a la hepatitis C (ácido iopanoico, tiratricol y ribavirina).
- El estudio y la comparación de la eficacia de los fármacos encapsulados frente a la de los fármacos libres en ensayos celulares. Se espera conseguir una mayor eficacia (mayor inhibición viral) por parte de los fármacos encapsulados, así como una citotoxicidad reducida, tanto del derivado dendrítico por sí mismo como de los encapsulados.

Para llevar esto a cabo se ha seguido el siguiente **plan de trabajo**:

- Síntesis y caracterización del dendrón de tercera generación de *bisGMPA*.
- Síntesis y caracterización del polímero hiperramificado dendronizado nombrado.
- Encapsulación de ácido iopanoico, tiratricol y ribavirina en el interior del polímero hiperramificado dendronizado y determinación de la cantidad encapsulada.
- Estudio de la morfología y el tamaño de los encapsulados formados mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM).
- Ensayos celulares para la determinación de la citotoxicidad y la inhibición viral del polímero hiperramificado dendronizado y de los fármacos encapsulados.

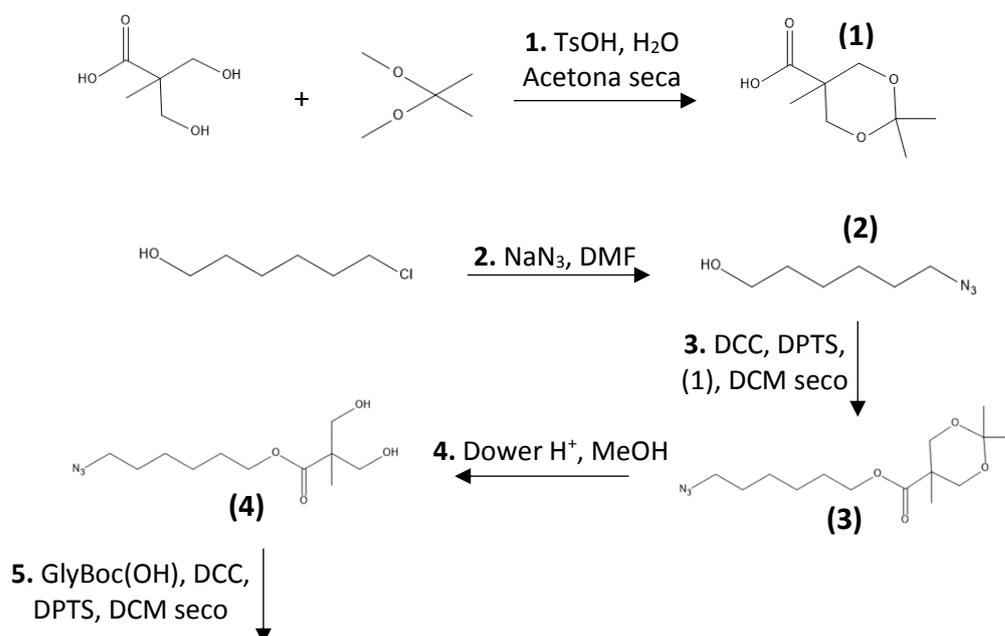
## 4. Materiales y métodos

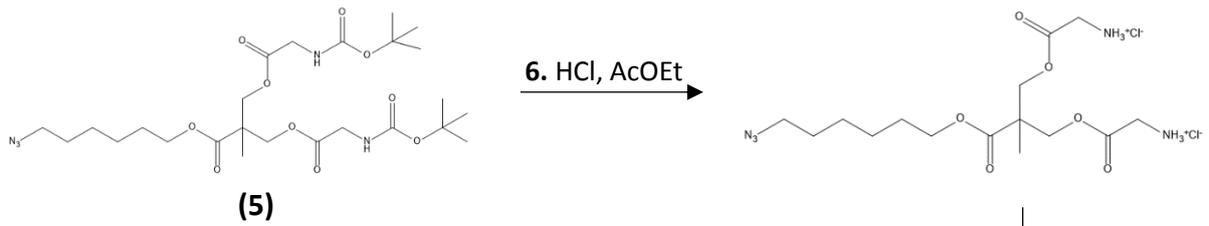
### 4.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

Salvo otra indicación, los disolventes utilizados se compraron a Scharlab, S.L. Los reactivos empleados para la síntesis se compraron a Sigma-Aldrich o a Acros Organics y se han utilizado sin purificación posterior. El polímero hiperramificado de *bis*MPA de cuarta generación (HP-[G4]) y con una media de 64 grupos terminales se compró a Sigma-Aldrich y se modificó en el laboratorio para introducir grupos alquino en los extremos. El TBTA (tris(benciltriazolmetil)amina), el DPTS (4-toluensulfonato de 4-(dimetilamino)piridinio) y el monómero de *bis*GMMPA fueron sintetizados en nuestro laboratorio.

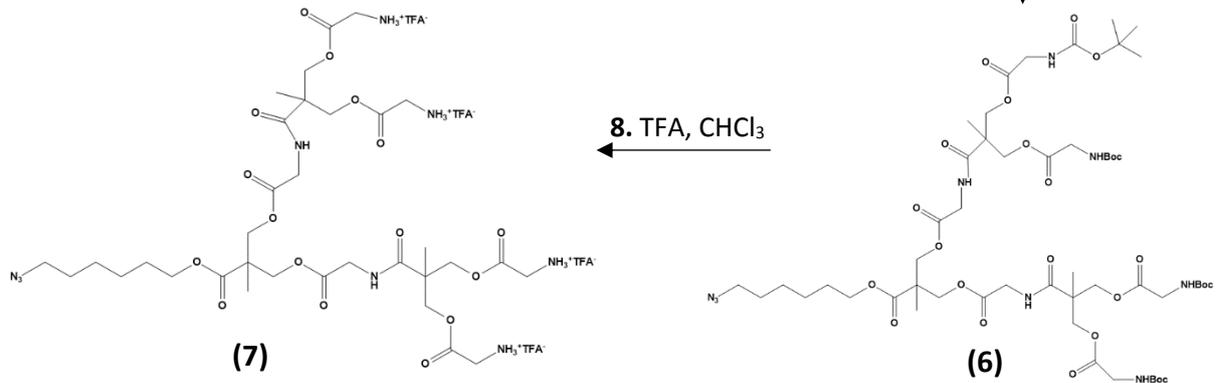
Para la caracterización se realizaron experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ , espectrometría de masas y espectroscopía infrarroja; también se realizó cromatografía de permeación en gel (GPC) para el derivado dendrítico final protegido. Los experimentos de RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker AV-400 ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz), usándose cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) o metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) como disolventes; las señales de los disolventes se emplearon como estándar interno. Los desplazamientos químicos se muestran como ppm referentes al tetrametilsilano (TMS) y las constantes de acoplamiento en Hz. Los experimentos de espectrometría de masas se llevaron a cabo en un sistema Bruker Microflex, empleando las técnicas ESI o MALDI-TOF con láser de nitrógeno (337 nm) y ditranol como matriz. Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Bruker Vertex 70 y las medidas fueron realizadas en el modo de reflectancia total atenuada (ATR). El experimento de GPC se realizó en un sistema Waters e2695 Alliance con dos columnas Styragel HR4 y HR1 (500 y  $10^4$  Å de tamaño de poro) en serie y un detector Waters 2424 *evaporation light scattering* con una concentración de muestra de 1 mg/mL. El disolvente utilizado fue tetrahidrofurano (THF) de grado de HPLC con un flujo de 1 mL/min a 35°C; se empleó polimetilmetacrilato (PMMA) como estándar de calibración.

#### Esquema de la síntesis de la síntesis del derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMMPA, G3)-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>TFA<sup>-</sup>)

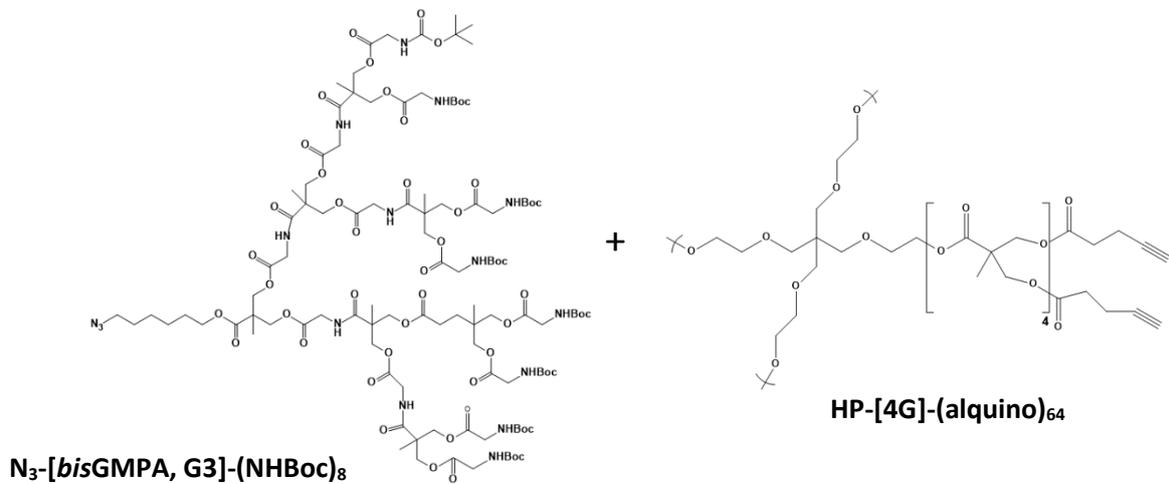




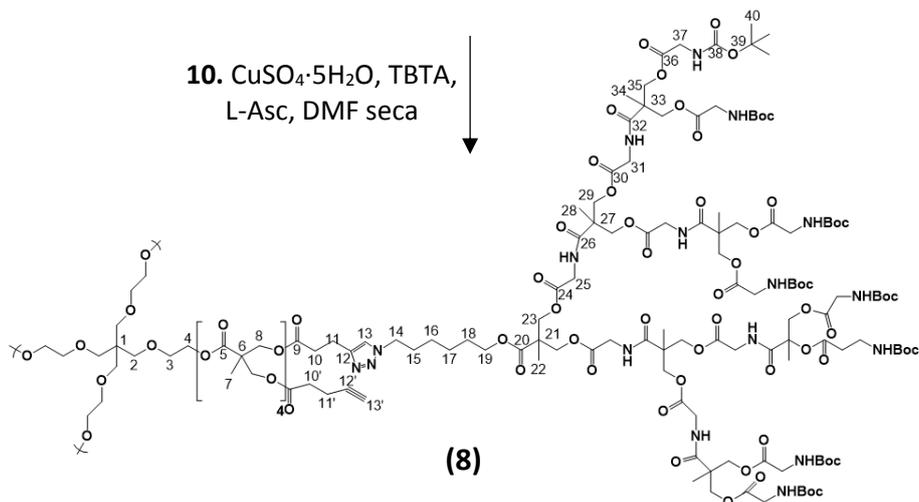
**7. Monómero de *bis*GMPA, HOBt, DMAP, DCC, DMF seca, DCM seco**

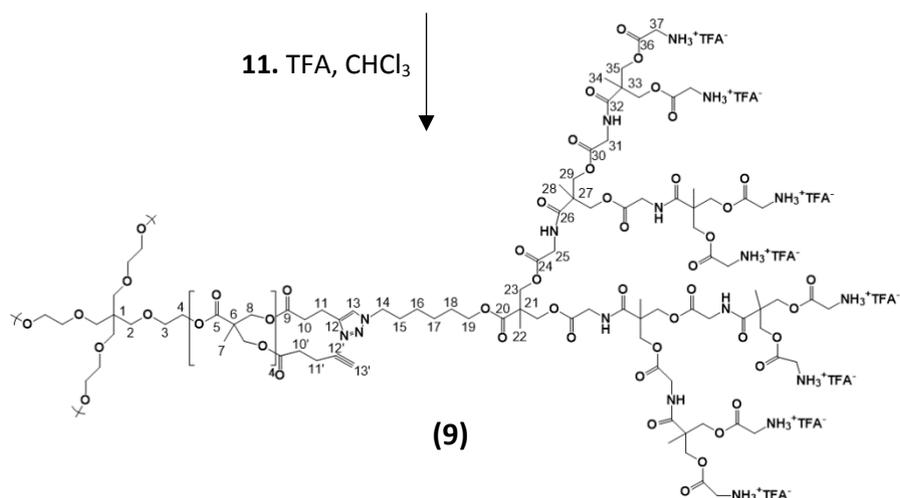


**9. Monómero de *bis*GMPA, HOBt, DMAP, DCC, DMF seca, DCM seco**



**10. CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, TBTA, L-Asc, DMF seca**





Los pasos de síntesis realizados en este trabajo son los que presentan un número bajo la fórmula molecular. A continuación, se explica la síntesis y caracterización de los compuestos (8) y (9), encontrándose la misma información para el resto de los compuestos en los anexos.

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

##### Síntesis

Se disolvieron TBTA (19.36 mg, 0.036 mmol), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (9.12 mg, 0.036 mmol) y L-ascorbato de sodio (14.46 mg, 0.073 mmol) en 3 mL de dimetilformamida (DMF) seca en un matraz Schlenk, se realizaron 3 ciclos de vacío-argón y se dejó la disolución en agitación, atmósfera de argón y a 45°C. Paralelamente, en otro matraz Schlenk, se disolvieron el dendrón N<sub>3</sub>-[bisGMPA, G3]-(NHBoc)<sub>8</sub> (500 mg, 0.198 mmol, 76.8 eq.) y HP-[4G]-(alquino)<sub>64</sub> (31.43 mg, 2.578·10<sup>-3</sup> mmol, 1 eq.) en 3 mL de DMF seca, realizándose también 3 ciclos de vacío – argón y dejándose la disolución en agitación, atmósfera de argón y a 45°C. La primera disolución se añadió a la segunda mediante canulación. Se dejó transcurrir la reacción durante 6 días en agitación, a 45°C y bajo atmósfera de argón. Se disolvió la mezcla en 250 mL de disolución saturada de cloruro de sodio (Brine) y se hicieron 3 extracciones con 150 mL de acetato de etilo (AcOEt). Se recogieron las fases orgánicas, se juntaron y se lavaron 3 veces con 200 mL de Brine. Se secó con sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) anhidro y se evaporó el disolvente en atmósfera reducida. Se obtuvo un aceite amarillo que se filtró en una columna de sílice usando primero sólo diclorometano (DCM) como eluyente y, después, DCM y metanol (MeOH) en proporción 95:5. Se evaporó el eluyente en atmósfera reducida y se obtuvo un aceite amarillo que se disolvió en 250 mL de AcOEt y se lavó 2 veces con 150 mL de una disolución de cianuro de potasio (KCN) en agua destilada (0.1 mg/mL) y 2 veces con 150 mL de Brine. Se secó la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el disolvente en atmósfera reducida. El producto se disolvió en la mínima cantidad de AcOEt y se añadió gota a gota a 90 mL de hexano frío para precipitarlo. Se decantó el sobrenadante y a éste se le añadieron 40 mL de hexano frío más para precipitar más producto, se decantó el hexano y se repitió este paso. Los sólidos obtenidos se disolvieron en la mínima cantidad de AcOEt, se juntaron y se evaporó el disolvente en atmósfera reducida. Se obtuvo una masa de 170 mg de un sólido blanco correspondiente al derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA, G3)-(NHBoc)<sub>8</sub>, **(8)**, un polímero hiperramificado dendronizado. El rendimiento de la reacción fue del 46%.

## Caracterización

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 1.30 (m, ~1230 H, H<sub>7</sub>, H<sub>22</sub>, H<sub>28</sub> y H<sub>34</sub>), 1.45 (s, ~3600 H, H<sub>40</sub>), 1.67 (m, ~118 H, H<sub>18</sub>), 1.92 (m, ~118 H, H<sub>15</sub>), 2.47 y 2.56 (m, ~56 H, H<sub>10'</sub> y H<sub>11'</sub>), 2.92 y 3.01 (m, ~200 H, H<sub>10</sub> y H<sub>11</sub>), 3.70 (m, ~16 H, H<sub>2</sub> y H<sub>4</sub>), 3.82 (m, ~1400 H, H<sub>25</sub>, H<sub>31</sub> y H<sub>37</sub>), 4.30 (m, ~1740 H, H<sub>8</sub>, H<sub>19</sub>, H<sub>23</sub>, H<sub>29</sub> y H<sub>35</sub>), 7.78 (s, ~50 H, H<sub>13</sub>).

**FTIR (V<sub>máx</sub>/cm<sup>-1</sup>, nujol):** 3474-3202 (N-H), 3028-2872 (C-H), 1749 (C=O, éster), 1699 (C=O, carbamato), 1653 (C=O, amida), 1522 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1250 (O-C).

### **4.1.2 Síntesis y caracterización del derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>TFA<sup>-</sup>)<sub>8</sub> (**9**)**

#### Síntesis

Se disolvió el derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NHBoc)<sub>8</sub> (150 mg, 1.05·10<sup>-3</sup> mmol) en 650 μL de una mezcla 1:1 de ácido trifluoroacético y cloroformo (TFA y CHCl<sub>3</sub>). La reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora y 45 minutos. Se evaporó la mezcla de TFA:CHCl<sub>3</sub> y se disolvió el producto en 1.2 mL de metanol. Se añadió gota a gota a 120 mL de éter frío y se dejó precipitando toda la noche. El éter se eliminó mediante centrifugación (5 minutos a 3500 rpm), siendo el precipitado obtenido un sólido blanco correspondiente al derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>TFA)<sub>8</sub>, (**9**). Se obtuvo una masa de 89.69 mg, siendo el rendimiento de la desprotección del 82.3%.

#### Caracterización

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 1.36 (m, ~1230 H, H<sub>7</sub>, H<sub>22</sub>, H<sub>28</sub> y H<sub>34</sub>), 1.90 (m, ~118 H, H<sub>15</sub>), 2.45 y 2.55 (m, ~56 H, H<sub>10'</sub> y H<sub>11'</sub>), 2.74 y 2.99 (m, ~200 H, H<sub>10</sub> y H<sub>11</sub>), 3.70 (m, ~16 H, H<sub>2</sub> y H<sub>4</sub>), 3.98 (m, ~1400 H, H<sub>25</sub>, H<sub>31</sub> y H<sub>37</sub>), 4.30 (m, ~1740 H, H<sub>8</sub>, H<sub>19</sub>, H<sub>23</sub>, H<sub>29</sub> y H<sub>35</sub>), 7.78 (s, ~50H, H<sub>13</sub>).

**FTIR (V<sub>máx</sub>/cm<sup>-1</sup>, nujol):** 3690-2362 (N-H<sup>+</sup> y C-H), 1745 (C=O, éster), 1653 (C=O, amida), 1539 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1410 (O-C).

## **4.2 ENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS**

Los fármacos encapsulados se compraron a Sigma Aldrich (ácido iopanoico y tiratricol) y a Carbosynth (ribavirina). En ambos casos se usó el método de encapsulación de aceite en agua, pero el proceso no fue el mismo para el caso de tiratricol y ácido iopanoico (fármacos lipofílicos), y para el de la ribavirina (fármaco hidrofílico).

### **4.2.1 Encapsulación de tiratricol y ácido iopanoico**

Los fármacos se disolvieron en diclorometano, siendo la concentración final de 5 mg/mL para cada uno de los fármacos. Por otra parte, se disolvió el dendrón en agua destilada, en una concentración de 5 mg/mL. Se mezclaron ambas disoluciones para cada fármaco, por lo que la relación masa dendrón/masa fármaco fue 1:1. Las mezclas se agitaron vigorosamente en un agitador orbital IKA KS 130 basic hasta la completa evaporación del diclorometano. El fármaco no encapsulado precipitó y se eliminó mediante filtración a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.2 μm (CHM© CA Syringe filter, CHMLAB Group). En el filtrado se quedó el fármaco encapsulado.

La cantidad de fármaco encapsulada se obtuvo mediante la determinación de la absorbancia en el ultravioleta-visible (tiratricol  $\lambda_{\text{máx}} = 300$  nm y ácido iopanoico  $\lambda_{\text{máx}} = 317$  nm). Las medidas se realizaron con un espectrofotómetro UV-visible Varian Cary 50 probe. Se hizo una dilución 1:3 con DMSO para romper los agregados, liberándose así el fármaco encapsulado y pudiendo ser medido. Para poder determinar la concentración de cada una de las muestras se preparó una recta de calibrado para cada fármaco, yendo las concentraciones de 0  $\mu\text{g/mL}$  a 170  $\mu\text{g/mL}$ . Las rectas de calibrado correspondientes se muestran en los anexos (figuras A17 y A18).

#### **4.2.2 Encapsulación de ribavirina**

Se disolvieron la ribavirina y el dendrón en agua destilada, siendo la concentración final para ambos compuestos de 5 mg/mL. Se mezclaron ambas disoluciones y se añadió un volumen de diclorometano igual al volumen final de agua destilada. Se agitó vigorosamente a temperatura ambiente en el agitador orbital hasta que el diclorometano se evaporó por completo. La ribavirina no encapsulada se eliminó mediante diálisis, empleándose una membrana con un poro de 1000 Da (Spectrum Laboratories). La diálisis se llevó a cabo frente a 200 mL de agua destilada, a 4°C y durante 16 horas. En este caso no se pudo hacer de una manera correcta la determinación de la cantidad de fármaco encapsulado.

#### **4.2.3 Formación de cápsulas vacías**

El mismo proceso llevado a cabo con los fármacos debe hacerse con el polímero hiperramificado vacío, que tendrá que añadirse también en los ensayos celulares. Se disolvió el derivado dendrítico en agua a una concentración de 5 mg/mL. Se añadió un volumen de diclorometano equivalente al del agua destilada. La mezcla se mantuvo en agitación vigorosa en el agitador orbital a temperatura ambiente hasta la completa evaporación del diclorometano.

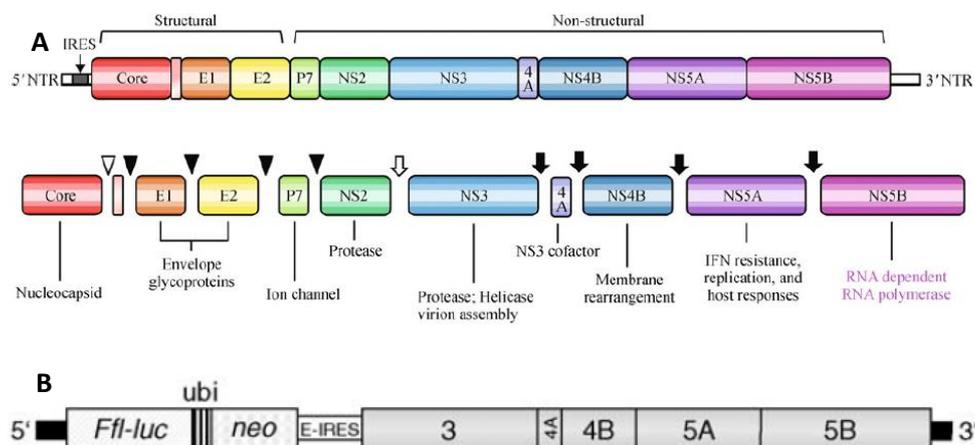
### **4.3 MICROSCOPIO DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM)**

La determinación de la forma y el tamaño de las cápsulas se realizó mediante microscopía de transmisión electrónica. Las muestras se prepararon sobre rejillas de cobre "holey carbon film 300 Mesh", de Agar Scientific, añadiéndose sobre ellas una gota de cada encapsulado dendrón/fármaco, así como de las cápsulas del dendrón vacío (una rejilla diferente por muestra). El exceso de muestra se eliminó y se hizo una tinción añadiendo una gota de una disolución al 3% de ácido fosfotúngstico. Se eliminó el exceso de disolución y se dejaron secando las rejillas durante al menos 24 horas antes de ser analizadas. El experimento se llevó a cabo en un aparato TECNAI G20 (FEI COMPANY), 200 kV, en el Laboratorio de Microscopía Avanzada del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA).

### **4.4 CULTIVOS CELULARES**

Los estudios celulares se llevaron a cabo en células de la línea celular Huh 5-2. Estas células provienen de una línea celular permisiva establecida a partir de un hepatocarcinoma, la línea Huh-7-Lunet<sup>(19)</sup>, a la que se le ha transfectado el replicón subgenómico del virus de la hepatitis C (VHC) *I389luc-ubi-neo/NS3-3'/5.1*.

El genoma del VHC presenta dos regiones en su genoma (figura 5.A), una que codifica las proteínas estructurales, que influyen en el ensamblaje de nuevas partículas virales, y otra que codifica las proteínas no estructurales, que son las responsables de la replicación del genoma viral. El replicón transfectado (figura 5.B) presenta una secuencia que codifica desde la proteína NS3 hasta el extremo 3' no traducido (3'-NTR). Por otro lado, la región correspondiente al genoma de las proteínas estructurales ha sido sustituida por la secuencia del gen de la luciferasa (gen reporter) y por un marcador de selección, el gen *neo*, que codifica a la enzima neomicina fosfotransferasa, una enzima que confiere resistencia a gentamicina (G418)<sup>(20)</sup>. Estas dos proteínas se sintetizan como una proteína de fusión, habiendo entre ambas una secuencia de corte, *ubi*. El replicón presenta también la región 5' no traducida (5'-NTR) del VHC y el sitio interno de entrada al ribosoma del virus de la encefalomiocarditis (E-IRES)<sup>(20,21)</sup>.



**Figura 5.** A: esquema del genoma del virus de la hepatitis C<sup>(22)</sup>. B: esquema del constructo del replicón presente en las células Huh 5-2<sup>(21)</sup>.

Los cultivos crecieron en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), con rojo fenol (para mantenimiento de los cultivos) o sin él (en los ensayos celulares) y suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 250 µg/mL de gentamicina (G418). Se llevaron a cabo bajo condiciones constantes de temperatura (37°C), presión (1 atmósfera) y concentración de CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>, 95% aire).

Las células Huh 5-2 son células adherentes, por lo que tanto para los subcultivos como para poder obtener las células para los ensayos es necesario realizar una tripsinización que las separe de la superficie de cultivo. Para ello, se quita el medio de cultivo, se lavan las células con DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) para eliminar posibles restos de medio, se añade tripsina-EDTA 5% y se incuban las células durante 5 minutos a 37°C.

El medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 4.5 g/L de glucosa), el DPBS y la gentamicina (G418) se compraron a Gibco. La penicilina, estreptomina (5000 U/mL) y la tripsina-Versene (EDTA) se compraron a Lonza. El suero fetal bovino se compró a PAN-Biotech GmbH.

Antes de empezar a trabajar con los cultivos, además, se deben atemperar a 37°C todos los medios y reactivos que se vayan a emplear para no afectar de manera negativa a las células. Todas las

manipulaciones deben realizarse en campanas de flujo laminar y de una manera adecuada para evitar la contaminación de los cultivos.

## 4.5 ENSAYOS CELULARES

Para los ensayos celulares se sembraron las células en 6 placas de 96 pocillos, siendo tres transparentes (para ensayos de citotoxicidad) y tres blancas (para ensayos de inhibición viral) y empleándose una de cada tipo para estudiar cada uno de los fármacos ensayados. Las células se sembraron a una densidad de 7000 células por pocillo y se utilizaron 72 pocillos en cada placa. En cada una se añadieron, a diferentes concentraciones y por triplicado, el fármaco libre correspondiente, el mismo fármaco encapsulado y el derivado dendrítico vacío.

Se sembraron las células en las placas a la densidad indicada (determinada con un contador celular automático Scepter™ 2.0 (Millipore)), y se dejaron incubando durante 24 horas. Pasado ese tiempo se eliminó el medio de cultivo y se añadieron las diferentes disoluciones nombradas. Para el caso del ácido iopanoico y el tiratricol se añadieron disoluciones preparadas en medio DMEM sin rojo fenol que contenían diferentes concentraciones del fármaco libre, el fármaco encapsulado o el dendrón vacío y, en todos los casos, un 2% de DMSO y un 8% de agua destilada. En el caso de la ribavirina no se añadió DMSO, ya que el fármaco libre, a diferencia de los otros, era soluble en PBS, por lo que se mantuvo la cantidad de agua destilada y se sustituyó la correspondiente al DMSO por DMEM. A cada pocillo se añadieron 100 µL de la disolución correspondiente, haciéndose triplicados de cada concentración; para cada fármaco se añadió lo mismo en la placa de citotoxicidad y en la inhibición viral, como se muestra en la Tabla A1 (anexos). Las células se incubaron en presencia de las disoluciones durante 72 horas y, después, se realizaron los ensayos para determinar la citotoxicidad y la inhibición viral.

### Citotoxicidad

Para comprobar la citotoxicidad del derivado dendrítico y de los fármacos se empleó el kit Promega's Cell Titer 96® AQueous. Éste presenta el reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution que contiene MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), una sal de tetrazolio que pasa a formazán cuando se reduce, algo que sólo puede ocurrir en las células vivas, ya que poseen la enzima succinato-tetrazolio reductasa. Se trata de un método basado en una reacción colorimétrica.

En el ensayo se eliminó el medio de cultivo de los pocillos de las placas transparentes y se añadió en cada uno 100 µL de una dilución 1:25 del reactivo nombrado. Las placas se dejaron incubando durante 1 hora. Pasado ese tiempo se leyó la absorbancia a 490 nm, la longitud de onda a la que absorben los productos de formazán formados. También se midió la absorbancia a 800 nm, que es la absorbancia no específica, de manera que el valor final se obtiene restando este último al obtenido a 490 nm. La absorbancia se midió en un equipo Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader, mientras que los datos se obtuvieron empleando el software Gen5™ Data Analysis.

### Inhibición viral

Para comprobar la inhibición viral por parte de los diferentes fármacos ensayos se empleó el kit Promega's Bright Glo™ Luciferase Assay System. Con el kit se puede medir la replicación del sistema

replicón en las células empleadas, gracias a que éste presenta la enzima luciferasa como una proteína de fusión junto con la neomicina fosfotransferasa (marcador de resistencia), de manera que ambas se separan por acción de la proteasa viral NS3, que reconoce la secuencia de corte que hay entre ambas. Si se produce la replicación se expresa la proteasa, se libera la luciferasa y se puede medir su actividad<sup>(20)</sup>. Esta enzima oxida un sustrato específico presente en el kit, la luciferina, dando lugar a oxiluciferina, que es luminiscente, siendo esta luminiscencia proporcional a la cantidad de RNA que se ha formado del sistema replicación que se está expresando.

En el ensayo se añadieron a cada uno de los pocillos de las placas blancas, sin eliminar el medio de cultivo ya presente, 30  $\mu$ L del sustrato Bright-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay. Seguidamente se midió la luminiscencia en el mismo equipo que en el caso del ensayo de citotoxicidad, empleándose también el mismo software para la obtención de los datos.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1 SÍNTESIS

Se llevó a cabo la síntesis del derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(bisGMPA,G3)-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>TFA<sup>-</sup>)<sub>8</sub>, un polímero hiperramificado dendronizado. Para ello, en este trabajo se realizó, por un lado, la síntesis del dendrón de *bis*GMPA (ácido 2,2'-*bis*(gliciloximetil) propiónico) de tercera generación y, por otro lado, la unión de dicho dendrón al polímero hiperramificado de cuarta generación basado en *bis*MPA (ácido 2,2'-*bis*(hidroximetil) propiónico), que había sido comprado y modificado en nuestro laboratorio previamente para introducir grupos alquino terminales en sus extremos. Para la síntesis del dendrón de *bis*GMPA también se requiere el monómero de *bis*GMPA, que fue sintetizado en nuestro laboratorio, pero no dentro de este trabajo.

#### 5.1.1 Síntesis del dendrón de *bis*GMPA de tercera generación (N<sub>3</sub>-[*bis*GMPA, G3]-(NH<sub>3</sub>Boc)<sub>8</sub>)

Por un lado, se sintetizó el monómero de *bis*MPA protegido, **(1)**, lo cual se realizó protegiendo los dos grupos hidroxilo terminales con un grupo acetal. Para esto, se hizo reaccionar el monómero de *bis*MPA con 2,2-dimetoxipropano en presencia de ácido p-toluenosulfónico (TsOH), funcionando éste como catalizador de la reacción. Paralelamente, se llevó a cabo la síntesis de 6-azidahexan-1-ol, **(2)**, a partir de 6-clorohexan-1-ol y azida de sodio (NaN<sub>3</sub>), produciéndose una sustitución nucleofílica en la que el grupo azida reemplaza al átomo de cloro. Ese grupo azida terminal será esencial para la síntesis posterior del polímero hiperramificado dendronizado.

A partir de estas dos moléculas se llevó a cabo la síntesis del dendrón de tercera generación. Primero se realizó una esterificación de Steglich en la que reaccionaron **(1)** y **(2)** en presencia de diciclohexilcarbodiimida (DCC), que actúa como agente de acoplamiento y que pasa a diciclohexilurea (DCU), y en presencia de 4-toluensulfonato de 4-(dimetilamino)piridinio (DPTS), que actúa como catalizador de la reacción. La DCU se eliminó mediante filtración y el producto de la reacción, N<sub>3</sub>-[*bis*MPA,G1]-(acetal)<sub>1</sub>, **(3)**, se purificó por cromatografía en columna a presión en gel de sílice. El siguiente paso fue la desprotección de los grupos hidroxilo terminales por la hidrólisis del grupo acetal mediante una resina de intercambio de protones Dowex<sup>®</sup>, generándose N<sub>3</sub>-[*bis*MPA,G1]-(OH)<sub>2</sub>, **(4)**.

A continuación se produjo la reacción entre (4) y N-(tert-butoxicarbonil)glicina (GlyBoc(OH)), obteniéndose el dendrón de *bis*GMPA de primera generación,  $N_3$ -[*bis*GMPA,G1]-(NHBoc)<sub>2</sub>, (**5**), que presenta sus grupos amino terminales protegidos por grupos t-Boc; en esta reacción se emplearon también DCC y DPTS. Después se realizó la desprotección de los grupos t-Boc en condiciones ácidas para dejar los extremos del dendrón con aminas terminales, pero no se llevó a cabo en este trabajo. A partir del dendrón de *bis*GMPA de primera generación desprotegido se sintetizó el dendrón de *bis*GMPA de segunda generación mediante una esterificación de Steglich. En este paso reaccionaron las aminas terminales del dendrón de primera generación con el monómero de *bis*GMPA en presencia de DCC, 4-(dimetilamino)piridinio (DMAP) en lugar de DPTS y HOBt, que es también un agente de acoplamiento. Se acabó obteniendo el dendrón de *bis*GMPA de segunda generación,  $N_3$ -[*bis*GMPA,G2]-(NHBoc)<sub>4</sub>, (**6**), de nuevo con las aminas protegidas. Éstas se desprotegieron empleando ácido trifluoroacético (TFA), dándose lugar al dendrón de *bis*GMPA de segunda generación desprotegido,  $N_3$ -[*bis*GMPA,G2]-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>TFA<sup>-</sup>)<sub>4</sub>, (**7**). El último paso para la síntesis del dendrón de *bis*GMPA de tercera generación,  $N_3$ -[*bis*GMPA, G3]-(NHBoc)<sub>8</sub>, no se realizó como parte de este trabajo, pero se trató de la misma reacción realizada para la síntesis de (6).

### 5.1.2 Síntesis del derivado dendrítico HP-[4G]-triazol-(*bis*GMPA,G3)-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>TFA<sup>-</sup>)<sub>8</sub>

Esta síntesis se realizó a partir del dendrón de *bis*GMPA de tercera generación,  $N_3$ -[*bis*GMPA, G3]-(NHBoc)<sub>8</sub>, y del polímero hiperramificado de tipo poliéster de cuarta generación basado en *bis*MPA, funcionalizado previamente con grupos alquino terminales. Ambos compuestos reaccionaron mediante una reacción de cicloadición considerada de “química click”, donde reacciona el grupo azida del dendrón de *bis*GMPA de tercera generación, introducido en la síntesis de (2), con un grupo alquino terminal del polímero hiperramificado, formándose un grupo triazol. Además de los dos compuestos, a la reacción se añadió CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, L-ascorbato y tris(benciltriazolmetil)amina (TBTA). El CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O aporta Cu (II), que se reduce por la presencia del L-ascorbato y da lugar a Cu (I), que actúa como catalizador de la reacción; el TBTA actúa como estabilizador del Cu (I). En la reacción se añadió un exceso del dendrón de *bis*GMPA para que pudiera reaccionar el máximo número de éstos con los grupos alquino terminales del polímero hiperramificado (cantidades en apartado 4.1.1).

Generalmente, esta reacción se lleva a cabo durante 2 días, pero en este caso se mantuvo 6 debido a que, pasado el tiempo estándar, seguía quedando una alta cantidad de dendrón y polímero hiperramificado sin reaccionar. Por ello, se optó por dejar la reacción más tiempo del normal, añadiendo también más CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, L-ascorbato y TBTA para favorecer el avance de la reacción. Pasados los 6 días se comprobó que había reaccionado más producto y se paró la reacción. Se realizaron una serie de extracciones y lavados con disoluciones acuosas, una filtración en columna de sílice y una precipitación en hexano para la purificación del producto final, como se muestra en el apartado 4.1.1. Se obtuvo así HP-[4G]-triazol-(*bis*GMPA,G3)-(NHBoc)<sub>8</sub>, (**8**).

Una vez obtenido el polímero hiperramificado dendronizado protegido se realizó su desprotección para dejar grupos amino terminales en los extremos. La reacción se llevó a cabo en condiciones ácidas empleando TFA, como se muestra en el apartado 4.1.2. Se acabó obteniendo el producto final, HP-[4G]-triazol-(*bis*GMPA,G3)-(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>TFA<sup>-</sup>)<sub>8</sub>, (**9**), con un rendimiento del 82.3%.

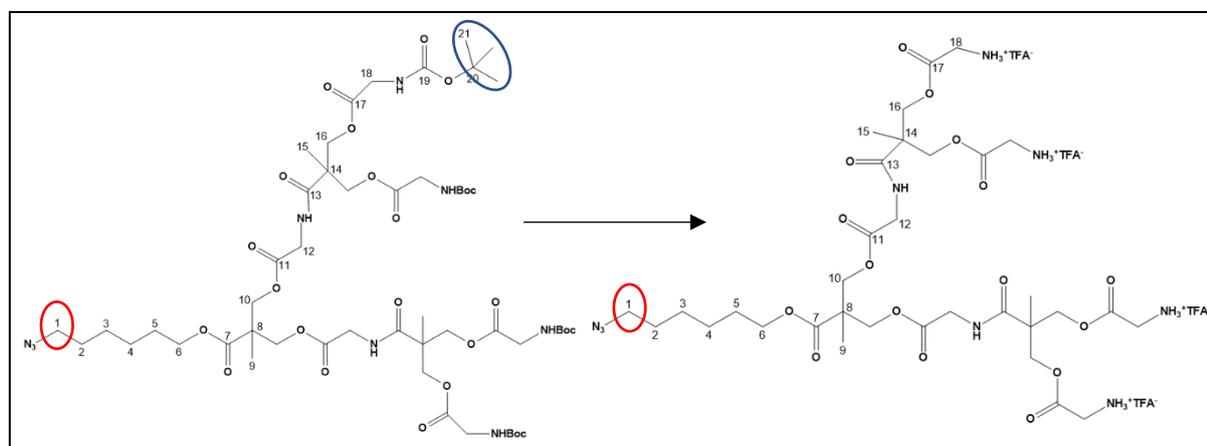
## 5.2 CARACTERIZACIÓN

Las moléculas sintetizadas se caracterizaron por resonancia magnética nuclear de protón (RMN  $^1\text{H}$ ) y de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectrometría de masas. Para el caso del polímero hiperramificado dendronizado, tanto el protegido como el desprotegido, no se pudo realizar la caracterización por espectrometría de masas por ser demasiado grandes. Tampoco se pudo llevar a cabo la caracterización por RMN  $^{13}\text{C}$  ya que se obtuvo poca cantidad de producto, por lo que se empleó la cantidad necesaria para realizar únicamente la caracterización por RMN  $^1\text{H}$ . Así mismo, se llevó a cabo la caracterización de la polidispersidad del derivado dendrítico protegido mediante cromatografía de permeación en gel (GPC).

El seguimiento de las reacciones se fue haciendo principalmente por RMN  $^1\text{H}$ , buscando que estuvieran presentes en los espectros las señales correspondientes a todos los protones diferentes de cada molécula. Dichos espectros, así como el análisis de las señales, se muestran en los anexos, excepto las señales correspondientes al polímero hiperramificado dendronizado protegido y desprotegido, que se encuentran en el apartado 4.1.

En el proceso de **síntesis del dendrón de tercera generación de bisGMPA** se prestó especial atención, desde la síntesis de (2) y hasta obtener el dendrón, a la señal obtenida a 3.26 ppm, que hace referencia a los protones del carbono 1 en presencia del grupo azida. Esta señal tiene que estar presente en todos los pasos hasta la obtención del dendrón, ya que indica que el grupo azida está presente. Es un grupo fundamental porque reacciona con un grupo alquino terminal del polímero hiperramificado en la reacción de química click. La señal se mantuvo en todo momento hasta el último paso de la generación del dendrón de tercera generación de bisGMPA, indicando la presencia del grupo azida en el dendrón final.

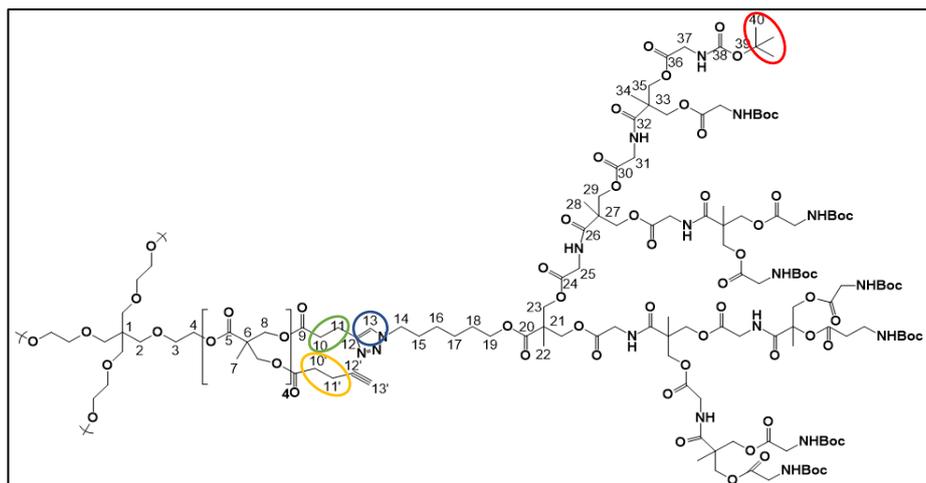
Asimismo, fundamental es la señal correspondiente a los protones del grupo t-Boc, que aparece alrededor de 1.44 ppm. Esta señal tiene que estar presente en los dendrones protegidos (las moléculas (5) y (6) en el caso de este trabajo), mientras que desaparece cuando se produce la desprotección (molécula (7) en este trabajo). La desaparición de la señal en estos experimentos confirmó que la desprotección se había producido correctamente.



**Figura 6.** Esquema de (6) y (7). En azul, rodeados los carbonos con los protones cuya señal aparece a 1.44 ppm, que desaparece en el dendrón desprotegido. En rojo, rodeados los carbonos con los protones cuya señal aparece a 3.26 ppm e indican la presencia de la azida.

En el proceso de síntesis del **derivado dendrítico** se prestó atención a otras señales. Por un lado, la señal del protón que indica la formación del anillo triazol confirma la reacción entre el grupo azida del dendrón y el alquino del polímero hiperramificado. Dicha señal aparece a 7.78 ppm y está presente tanto en el polímero hiperramificado dendronizado protegido como en el desprotegido, lo que indica que ambas moléculas han reaccionado, formando el polímero hiperramificado dendronizado. También es fundamental la señal correspondiente a los grupos t-Boc, que aparece a 1.45 ppm en el caso de la molécula protegida, y que al desaparecer confirma que el proceso de desprotección se ha realizado correctamente.

También son significativas las señales que corresponden a los protones en las posiciones 10 y 11 y 10' y 11'. Las primeras indican que se ha producido la formación del grupo triazol, mientras que las segundas indican la presencia de grupos alquino terminales sin reaccionar. Por tanto, a partir del espectro de resonancia magnética nuclear de protón, y teniendo estas señales en cuenta, se puede estimar cuántas moléculas de dendrón se han introducido en promedio en cada molécula de polímero hiperramificado. Teniendo eso en cuenta estos datos se ha podido determinar que en cada molécula de polímero hiperramificado se ha producido la reacción en el 77.3% de los grupos alquino terminales, lo que supone una media de 50 moléculas de dendrón introducidas por molécula de polímero hiperramificado.



**Figura 7.** Esquema de (8). En azul, el carbono con el protón cuya señal aparece a 7.78 ppm. En rojo, los carbonos con los protones cuya señal aparece a 1.44 ppm y desaparece en el polímero desprotegido. En verde, los carbonos con los protones cuyas señales indican la formación del anillo triazol; en naranja, aquellos cuyas señales indican la presencia del grupo alquino terminal.

El derivado dendrítico protegido también se caracterizó por cromatografía de permeación en gel (GPC), una prueba que ha servido para obtener el valor de polidispersidad de la molécula. Los polímeros hiperramificados tienen una polidispersidad alta, es decir, los pesos moleculares varían entre las diferentes moléculas de polímero. En cambio, al haber introducido el dendrón en la periferia del polímero y formar el polímero hiperramificado dendronizado se ha reducido dicha polidispersidad. Se ha obtenido un valor de 1.02, lo que indica una alta monodispersidad entre las moléculas formadas.

### 5.3 ENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS

La encapsulación de fármacos se llevó a cabo mediante la técnica aceite en agua. En este método se forma una emulsión como consecuencia de poner en contacto una fase acuosa y una fase orgánica (en este caso, diclorometano) y someterlas a agitación vigorosa. Lo que se ha buscado ha sido la puesta en contacto de los diferentes fármacos (que estaban en la fase orgánica o en la fase acuosa en función de su solubilidad, ver apartado 4.2) y las moléculas del polímero hiperramificado dendronizado (disuelto en la fase acuosa). Mediante este método se ha conseguido encapsular las moléculas de fármaco, que quedan internalizadas en la macromolécula formada.

Al inicio del proceso se añadieron el fármaco y el polímero hiperramificado dendronizado, en todos los casos, en proporción 1:1 en peso. En los tres casos se añadió inicialmente el fármaco con una concentración de 5 mg/mL. Una vez llevada a cabo la encapsulación, se midió indirectamente la cantidad de fármaco encapsulado, tal y como se ha indicado en el apartado 4.2. En el caso del tiratricol se obtuvo una concentración de fármaco encapsulado de 1.84 mg/mL, mientras que para el del ácido iopanoico fue de 1.10 mg/mL. En el caso de la ribavirina no se pudo llevar a cabo una determinación fiable, pues no se dispuso de ningún método adecuado para ello, por lo que esto quedaría pendiente de determinar. Posiblemente la mejor opción sea llevar a cabo esta determinación mediante HPLC, pero en el desarrollo de este trabajo no ha sido posible. Por ello, para los posteriores procedimientos se tuvieron en cuenta las cantidades encapsuladas para los otros dos fármacos y se supuso que la cantidad encapsulada de ribavirina se mantenía en el mismo rango, entre 1 mg/mL y 2 mg/mL, por lo que para los siguientes pasos se ha asumido el valor medio de 1.5 mg/mL.

Teniendo estos datos en cuenta se puede calcular la relación entre las masas del polímero hiperramificado dendronizado y de fármaco para cada encapsulación, así como la eficacia de encapsulación, como se muestra en la tabla 1.

Fármaco	Masa fármaco/masa dendrón	Eficacia de encapsulación
Ácido iopanoico	0.221	22%
Tiratricol	0.368	37%
Ribavirina	0.300	30%

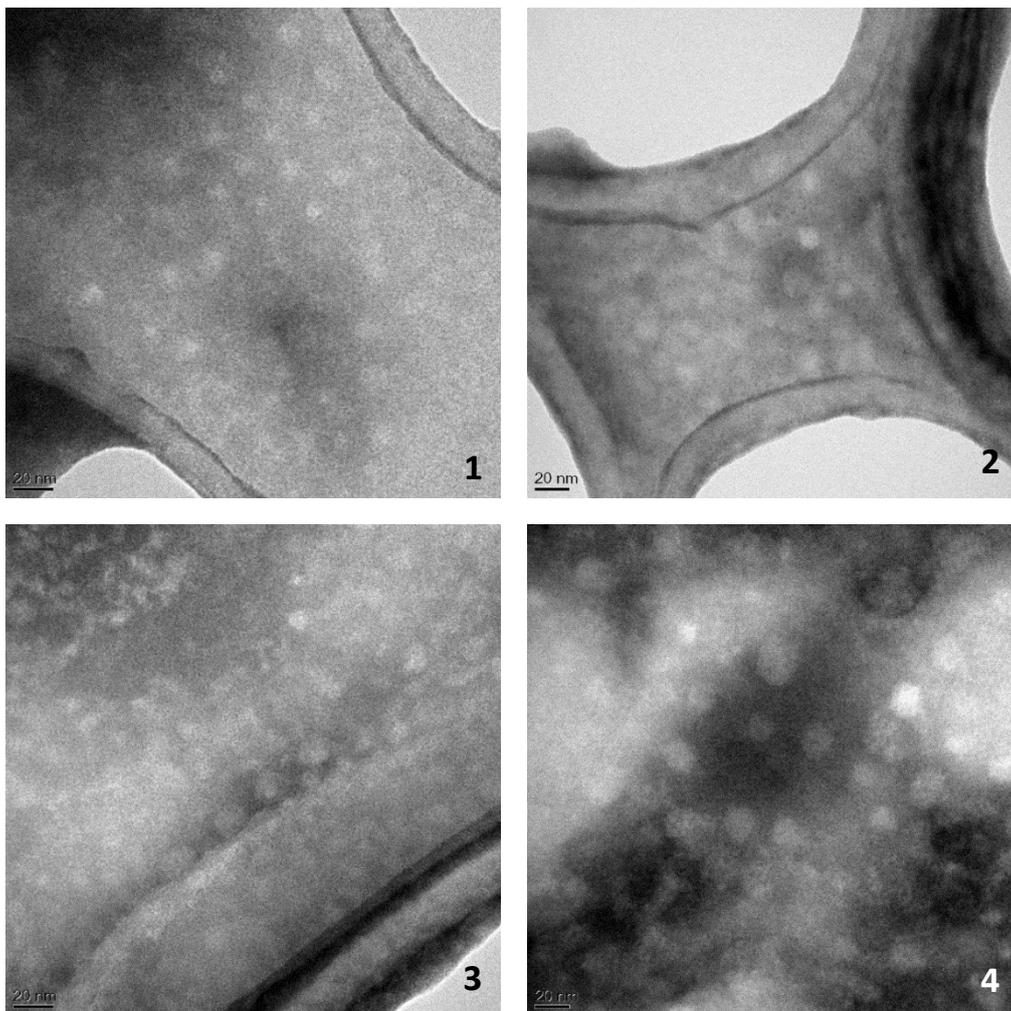
**Tabla 1.** Relación masa fármaco/masa dendrón y eficacia de encapsulación para cada una de las encapsulaciones.

Con estos datos se puede observar que la cantidad de fármaco encapsulada no ha sido muy alta en ninguno de los casos. Es importante tener presente que, en el caso de la ribavirina, los valores que se muestran son estimados, siendo posible que los valores reales difieran de ellos. Hay que tener en cuenta que el dendrímero presenta un núcleo con un carácter moderadamente lipofílico<sup>(17)</sup> y que los fármacos con este mismo carácter (ácido iopanoico y tiratricol) se encapsulan con más eficacia que la ribavirina, marcadamente hidrofílica. Por tanto, a pesar de que se haya realizado una estimación de la cantidad de ribavirina encapsulada atendiendo a los datos obtenidos para las otras dos encapsulaciones, es necesario buscar una manera de hacer una determinación específica para la ribavirina, pues existe la posibilidad de que el valor real cambie bastante con respecto al supuesto.

### 5.3.1 Morfología y tamaño de los encapsulados

El estudio de la morfología y el tamaño de los encapsulados se llevó a cabo mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM). También se estudió la morfología y el tamaño de las moléculas de polímero hiperramificado dendronizado vacío, sometido al mismo proceso que el realizado para la encapsulación, pero sin la presencia de fármaco (protocolo descrito en el apartado 4.2.3).

Las imágenes de TEM se obtienen mediante un haz de electrones que incide en la muestra. De esta manera, en función de la densidad electrónica que tenga la muestra se verán imágenes más oscuras (si presentan elementos con alta densidad de electrones) o más claras (si presentan pocos electrones). En este caso se llevó a cabo una tinción con ácido fosfotúngstico, que tiene una alta densidad de electrones porque presenta tungsteno, un metal pesado, por lo que las zonas teñidas se ven oscuras en las imágenes. En cambio, a las cápsulas presentes en las muestras analizadas les sucede lo contrario, tienen una baja densidad de electrones (presentan elementos con números atómicos bajos). Las zonas que tienen muestra presente, por tanto, son zonas donde no se coloca el ácido, por lo que la medida que se hace aquí es indirecta. En la figura 8 se muestran las imágenes obtenidas para las diferentes encapsulaciones, mientras que en la tabla 2 aparece el tamaño medio de cada una.



**Figura 8.** Imágenes obtenidas por TEM del dendrón vacío (1), el ácido iopanoico encapsulado (2), el tiratricol encapsulado (3) y la ribavirina encapsulada (4). Escala = 20 nm.

Encapsulado	Tamaño (nm)
Dendrón vacío	16 ± 3
Ácido iopanoico encapsulado	15 ± 3
Tiratricol encapsulado	15 ± 5
Ribavirina encapsulada	19 ± 4

**Tabla 2.** Tamaños (media ± desviación estándar) de las cápsulas vacías y con los diferentes fármacos encapsulados.

En las imágenes se puede ver que en los cuatro casos la morfología es similar, se observan partículas más o menos esféricas. Atendiendo a resultados anteriores del grupo, donde se utilizaron otros polímeros hiperramificados dendronizados similares a los empleados en este trabajo, pero donde el dendrón estaba basado en *bisMPA*<sup>(17)</sup>, se deduce que cada una de las esferas observadas corresponde a una molécula independiente del polímero hiperramificado dendronizado. Por tanto, se tiene unos dendrímeros globulares en cuyo interior están encapsulados los diferentes fármacos. El que se trate de moléculas independientes se apoya también en el hecho de que estos dendrímeros presentan en su exterior una gran cantidad de grupos amina que están cargados positivamente, por lo que las partículas van a repelerse unas de otras debido a que presentan todas la misma carga en su superficie, no permitiendo con ello la formación de agregados.

La presencia de los diferentes fármacos no parece afectar a la morfología de los dendrímeros, pues en las tres imágenes correspondientes a los encapsulados se observan unas partículas con morfología similar a la observada en el caso del derivado dendrítico vacío. En cuanto al tamaño de las partículas, los valores de la tabla 2 indican que son también similares para las diferentes muestras, aunque sí que hay una pequeña variación en el caso de las partículas que han encapsulado ribavirina, donde el tamaño es ligeramente mayor. Una vez más este comportamiento puede relacionarse con el carácter hidrofílico de la ribavirina, por lo que puede ser que al estar en el interior de la partícula se provoque una cierta repulsión y ésta provoque un aumento de tamaño de la cápsula. No obstante, se debe recordar que no se pudo determinar concretamente la cantidad de ribavirina encapsulada por falta de un método adecuado para ello.

## 5.4 ENSAYOS CELULARES

La encapsulación de los fármacos se ha llevado a cabo para intentar aumentar la actividad antiviral de los fármacos frente al virus de la hepatitis C. Para ello, se realizaron ensayos celulares donde se pusieron en contacto las cápsulas con los diferentes fármacos con las células que contenían el sistema replicón. En estos ensayos se comparó esta actividad con la de los fármacos libres (para comprobar si era menor o no que la de los fármacos encapsulados) y con la del derivado dendrítico (que no tendría actividad antiviral). Asimismo, se comprobó también que el derivado dendrítico no afectaba a la viabilidad de las células, es decir, que no era citotóxico, por lo que se realizaron también ensayos de citotoxicidad, donde también se estudió la citotoxicidad de las cápsulas y los fármacos libres.

### 5.4.1 Ensayos de citotoxicidad

Para cada uno de los fármacos se obtuvieron los datos de viabilidad mostrados en la tabla 3 para el fármaco libre, el encapsulado y el derivado dendrítico vacío a las diferentes concentraciones añadidas.

ÁCIDO IOPANOICO					
Fármaco ( $\mu\text{M}$ )	Viabilidad (%)	Encapsulado ( $\mu\text{M}$ fármaco)	Viabilidad (%)	DD vacío (mg/mL)	Viabilidad (%)
120	34	154.7	66	5.0	64
60	94	77.35	119	2.5	115
30	111	38.68	120	1.25	110
15	115	19.34	105	0.63	111
7,5	114	9.67	120	0.32	123
3,75	116	4.84	128	0.16	132
1,88	119	2.42	123	0.08	138
0	100	0	100	0	100
TIRATRICOL					
Fármaco ( $\mu\text{M}$ )	Viabilidad (%)	Encapsulado ( $\mu\text{M}$ fármaco)	Viabilidad (%)	DD vacío (mg/mL)	Viabilidad (%)
120	98	236.68	59	5.0	91
60	116	118.34	90	2.5	99
30	120	59.17	100	1.25	103
15	117	29.59	97	0.63	102
7,5	122	14.80	93	0.32	101
3,75	123	7.40	101	0.16	103
1,88	110	3.70	99	0.08	107
0	100	0	100	0	100
RIBAVIRINA					
Fármaco ( $\mu\text{M}$ )	Viabilidad (%)	Encapsulado ( $\mu\text{M}$ fármaco)	Viabilidad (%)	DD vacío (mg/mL)	Viabilidad (%)
163.80	81	491.39	79	2.5	97
81.90	112	245.70	92	1.25	115
40.95	99	122.85	92	0.63	112
20.48	110	61.43	97	0.32	109
10.24	110	30.72	85	0.16	105
5.12	116	15.36	90	0.08	109
2.56	110	7.68	109	0.04	113
0	100	0	100	0	100

**Tabla 3.** Resultados obtenidos para los ensayos de citotoxicidad. DD = derivado dendrítico. Las concentraciones del derivado dendrítico vacío coinciden con la concentración de éste en las muestras de los fármacos encapsulados.

Los valores se han tomado como referencia al control, es decir, los pocillos en los que no se añadió fármaco, encapsulado ni derivado dendrítico (concentración = 0). En general, se observa que ninguna de las sustancias añadidas es tóxica para las células, lo que explica esos valores de viabilidad que superan el 100%. Éste hace referencia a los controles, pero como se ve que las sustancias no afectan a la viabilidad, puede haber otros pocillos diferentes al control donde haya un metabolismo celular que sea algo mayor, aumentando por ello el porcentaje de viabilidad. Hay que recordar que este ensayo se basa en la actuación de una enzima del metabolismo celular, como se indica en el apartado 4.5.

Principalmente lo que se ha querido hacer con este ensayo ha sido comprobar que el derivado dendrítico utilizado no es tóxico para las células, ya que no tendría sentido emplear un transportador de fármacos para intentar que la eficacia de éstos sea mayor si el propio transportador afecta negativamente a la viabilidad celular. No obstante, se puede observar que esto no pasa, pues la viabilidad en los pocillos donde se ha añadido dendrón vacío es prácticamente en todo momento superior al 100% del control, tomado como referencia, o muy próximo a éste. Sólo habría un caso que difiere del resto, el de 5 mg/mL de la placa del ácido iopanoico, donde el valor desciende al 64%. Esto podría estar indicando que el dendrón es tóxico a concentraciones más altas, no obstante, dicha

concentración es la misma que la máxima ensayada en la placa del tiratricol, y la viabilidad en ese caso es del 91%, valor más similar al resto. Asimismo, previamente a este ensayo se llevó a cabo otro (cuyos resultados no se muestran) donde se ensayaron también estas mismas concentraciones de derivado dendrítico vacío y, en ese caso, tanto para el tiratricol como para el ácido iopanoico, las viabilidades para 5 mg/mL fueron altas. Por tanto, lo más probable ese 64% obtenido aquí sea erróneo, pudiendo haberse cometido algún error al llevar a cabo el ensayo. No obstante, se debería repetir el ensayo a dicha concentración para asegurarse de que no es debido a que altas concentración del derivado dendrítico sean tóxicas para las células.

#### **5.4.2 Ensayos de inhibición viral**

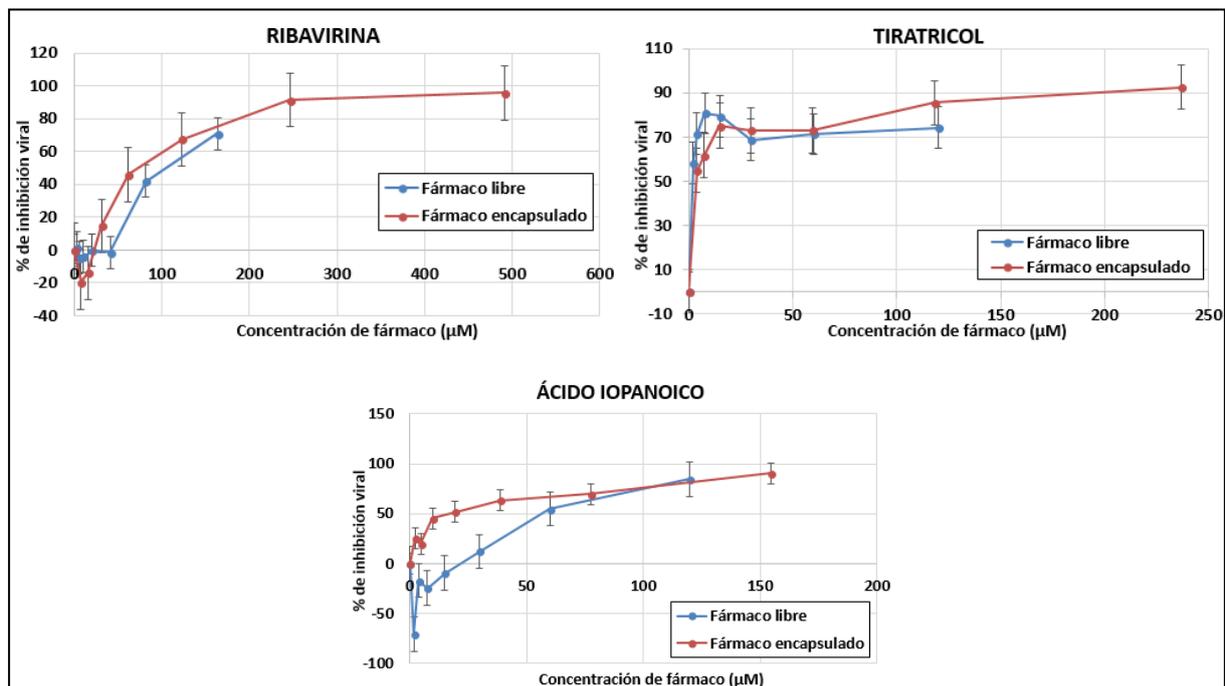
Estos ensayos se han realizado basándose en la luminiscencia producida por la oxiluciferina. Como se comenta en el apartado 4.5, cuanta más luminiscencia hay en un pocillo se indica que ha habido más actividad viral, o lo que es lo mismo, que los fármacos que se están ensayando, y con los que se trata de inhibir al virus, están teniendo menos actividad. Para los tres fármacos, tanto encapsulados como libres, así como para el caso del derivado dendrítico vacío, se han tomado como pocillos control aquellos que no tenían ninguna muestra añadida, suponiéndose que en ellos ha habido una actividad viral máxima, es decir, un 0% de inhibición viral.

Considerando esto, se ha determinado que el derivado dendrítico vacío no tiene actividad antiviral a ninguna de las concentraciones ensayadas (mostradas en la tabla A1 de los anexos), pues los valores de luminiscencia para los pocillos en los que se añadió son próximos a los obtenidos en el control.

En general, en estos estudios se espera obtener un valor alto de luminiscencia en los pocillos control, alrededor de 15000. En cambio, en estos ensayos no se han obtenido valores demasiado altos, siendo alrededor de 5700 para el caso de la ribavirina, de 3000 para el tiratricol y de 1100 para el ácido iopanoico. Son, por tanto, más bajos de los esperados. Aun así, teniendo esto en cuenta, podemos estudiar cómo han afectado a la actividad viral los fármacos en forma libre y encapsulada, y comprobar si hay diferencias. Los resultados obtenidos se representan en la figura 9 (página siguiente).

En los casos de la **ribavirina** y del **tiratricol** se observa que tanto el fármaco libre como el encapsulado tienen actividad como antivirales. La ribavirina inhibe a partir de valores de concentración de 60  $\mu$ M, mientras que en el tiratricol todas las concentraciones de fármaco añadidas tienen efecto. No obstante, se esperaba que la forma encapsulada fuera más efectiva y, por tanto, inhibiera más la replicación viral que la forma libre a concentraciones similares de fármaco, pero este efecto no se observa. Por tanto, puede ser que el uso del derivado dendrítico aquí empleado para la encapsulación no sea suficientemente efectivo y no solucione los problemas que presentan las formas libres de los fármacos (como la insuficiente internalización), que es lo que buscaba este trabajo. Sin embargo, dado que los valores de luminiscencia obtenidos para el control no son tan altos como deberían, también puede suceder que haya habido algún fallo en el ensayo, por lo que no se puede descartar el uso del derivado dendrítico sólo con estos resultados, siendo necesario realizar más réplicas de los estudios.

En cuanto al caso del **ácido iopanoico**, se observa una mejor inhibición viral por parte del fármaco encapsulado frente al fármaco libre entre las concentraciones de 15  $\mu\text{M}$  y 80  $\mu\text{M}$ , mientras que a concentraciones más altas ambas formas tienen un efecto similar. Este resultado coincide con otros previos del grupo de investigación donde se utilizó la  $\gamma$ -ciclodextrina para el transporte de ácido iopanoico, aumentando considerablemente su actividad antiviral<sup>(10)</sup>. Atendiendo a esto se puede pensar que el derivado dendrítico empleado es un buen transportador del ácido iopanoico. No obstante, de nuevo, hay que considerar los valores de luminiscencia obtenidos para el control. En este caso, dichos valores han sido los más bajos de todos, difiriendo considerablemente de los habituales. Por tanto, tampoco se puede demostrar aquí el efecto del derivado dendrítico en la actividad del fármaco, pues en estos ensayos también puede haber habido algún fallo. Sería necesario, por tanto, realizar más réplicas para comprobar que estos resultados son realmente válidos.



**Figura 9.** Porcentaje de inhibición viral en función de la concentración de fármaco ( $\mu\text{M}$ ) para cada fármaco, tanto libre como encapsulado.

Una de las razones por las que se pueden estar dando estos valores de luminiscencia bajos puede estar en el sistema replicón, que puede no estar produciendo un número de copias suficientemente alto. Si esto fuera así, los resultados obtenidos para los diferentes fármacos sí que estarían mostrando la realidad, que la encapsulación no mejora la actividad antiviral que presenta el fármaco libre para la ribavirina y el tiratricol, mientras que sí que lo hace para el ácido iopanoico. No obstante, esto es sólo una hipótesis y, en cualquier caso, sería necesario realizar más réplicas, pues un único resultado no es suficiente. Si el fallo estuviera realmente en el sistema replicón una posible manera de intentar remediarlo sería volver a transfectar las células con él y comprobar si se obtienen mejores resultados y si éstos coinciden o no con los obtenidos en estos ensayos.

## 6. Resumen de resultados y conclusiones del trabajo

- Se ha sintetizado un polímero hiperramificado dendronizado basado en *bis*GMPA (dendron de tercera generación) y en *bis*MPA (polímero hiperramificado de cuarta generación). El número de dendrones introducidos en la periferia del polímero hiperramificado ha sido alto (50/64).
- El análisis del polímero hiperramificado dendronizado protegido mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) muestra que la polidispersidad del polímero hiperramificado se ha reducido al introducirle los dendrones en la periferia, siendo la polidispersidad del producto próxima a 1.
- El derivado dendrítico se ha empleado para la encapsulación de tres fármacos, ácido iopanoico, tiratricol y ribavirina. Para la ribavirina no se pudo determinar la cantidad encapsulada, quedando pendiente la realización de una determinación fiable.
- La encapsulación de fármacos no afecta significativamente al tamaño y morfología del derivado dendrítico vacío.
- La viabilidad celular *in vitro* no se ve afectada por el derivado dendrítico vacío ni por los encapsulados de fármaco. El derivado dendrítico vacío tampoco tiene actividad antiviral.

Como conclusión del trabajo, estos resultados previos confirman que el ácido iopanoico encapsulado tiene mayor actividad que las formas libres, sin embargo, la ribavirina y el tiratricol encapsulados presentan una actividad antiviral similar a las formas libres. Todos los resultados son positivos ya que las formas encapsuladas no presentan toxicidad en las células. No obstante, en los tres casos es necesario realizar más réplicas que confirmen los resultados debido a los bajos valores de luminiscencia obtenidos en los controles.

- A dendronized hyperbranched polymer, based on *bis*GMPA (third generation dendron) and *bis*MPA (fourth generation hyperbranched polymer) has been synthesized. The number of dendrons that have been introduced in the periphery of the hyperbranched polymer has been high (50/64).
- The analysis of the protected dendronized hyperbranched polymer by gel permeation chromatography (GPC) shows that the hyperbranched polymer's polydispersity has been reduced after the introduction of the dendrons in its periphery, being the product's polydispersity close to 1.
- The dendritic derivative has been used for the encapsulation of three drugs, iopanoic acid, tiratricol and ribavirin. In the case of ribavirin, it could not be determined the amount of encapsulated drug, so it remains to be done the performance of a trustworthy determination.
- Drug encapsulation does not significantly affect the morphology and the size of the empty dendritic derivative.
- *In vitro* cell viability is not affected by the empty dendritic derivative nor the drug encapsulates. The empty dendritic derivative neither has antiviral activity.

As a conclusion, these previous results confirm that iopanoic acid encapsulates have more activity than the free drug. However, ribavirin and tiratricol encapsulates show similar antiviral activity than the free drugs. All these results are positive as the encapsulate form does not show cell toxicity. Nevertheless, in all three cases it is necessary to carry out more replicas to confirm the results due to the low luminescence values obtained for the controls.

## 7. Bibliografía

1. Hepatitis C [Internet]. [cited 2018 Jun 22]. Available from: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>.
2. Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. *Lancet* (London, England). 2008 Jul 26;372(9635):321–32.
3. Nelson PK, Mathers BM, Cowie B, Hagan H, Des Jarlais D, Horyniak D, et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet* (London, England). 2011 Aug 13;378(9791):571–83.
4. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. HCV Genome and Life Cycle. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Horizon Bioscience; 2006.
5. Manns MP, Buti M, Gane E, Pawlotsky J-M, Razavi H, Terrault N, et al. Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Diseases Primers*. 2017 Mar 2;3:17006.
6. Bastos JCS, Padilla MA, Caserta LC, Miotto N, Vigani AG, Arns CW. Hepatitis C virus: Promising discoveries and new treatments. *World Journal of Gastroenterology*. 2016 Jul 28;22(28):6393–401.
7. Graci JD, Cameron CE. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Reviews in Medical Virology*. 2006 Jan;16(1):37–48.
8. Abian O, Vega S, Sancho J, Velazquez-Campoy A. Allosteric Inhibitors of the NS3 Protease from the Hepatitis C Virus. *PLoS One*. 2013 Jul 30;8(7):e69773.
9. Abian O, Neira JL, Velazquez-Campoy A. Thermodynamics of zinc binding to hepatitis C virus NS3 protease: A folding by binding event. *Proteins*. 2009 Nov 15;77(3):624–36.
10. Abian O, Claveria-Gimeno R, Vega S, Grazu V, M. de la Fuente J, Lanás A, et al. Rescuing compound bioactivity in a secondary cell-based screening by using  $\gamma$ -cyclodextrin as a molecular carrier. *International Journal of Nanomedicine*. 2015 Mar;10:2249.
11. De Jong WH, Borm PJA. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*. 2008;3(2):133–49.
12. Singh R, Lillard JW, Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*. 2009 Jun;86(3):215–23.

13. Madaan K, Kumar S, Poonia N, Lather V, Pandita D. Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2014 Jul;6(3):139–50.
14. Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, Milani M, Nasrabadi HT, Joo SW, et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Research Letters*. 2014;9(1):247.
15. Anees M, Masood MI, Ilyas M, Ammad M. Nanoparticle as a novel drug delivery system a review. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Research*. 2016 Jul 15;2(2):160.
16. Zheng Y, Li S, Weng Z, Gao C. Hyperbranched polymers: advances from synthesis to applications. *Chemical Society Review*. 2015 Jun 8;44(12):4091–130.
17. Lancelot A. New dendritic derivatives for applications in nanomedicine: drug delivery and gene transfection. 2017. Universidad de Zaragoza.
18. Fonseca AC, Gil MH, Simões PN. Biodegradable poly(ester amide)s – A remarkable opportunity for the biomedical area: Review on the synthesis, characterization and applications. *Progress in Polymer Science*. 2014 Jul 1;39(7):1291–311.
19. Blight KJ, Norgard EA. HCV Replicon Systems. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Horizon Bioscience; 2006.
20. Bartenschlager R. Innovation: Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2002 Nov 1;1(11):911–6.
21. Bartenschlager R. The hepatitis C virus replicon system: From basic research to clinical application. *J Hepatol*. 2005 Aug;43(2):210–6.
22. Kao CC, Fan B, Chinnaswamy S, Cai H, Ranjith-Kumar CT, Deval J. Assays for RNA synthesis and replication by the hepatitis C virus. *Front Biol (Beijing)*. 2012 Jun;7(3):233–45.