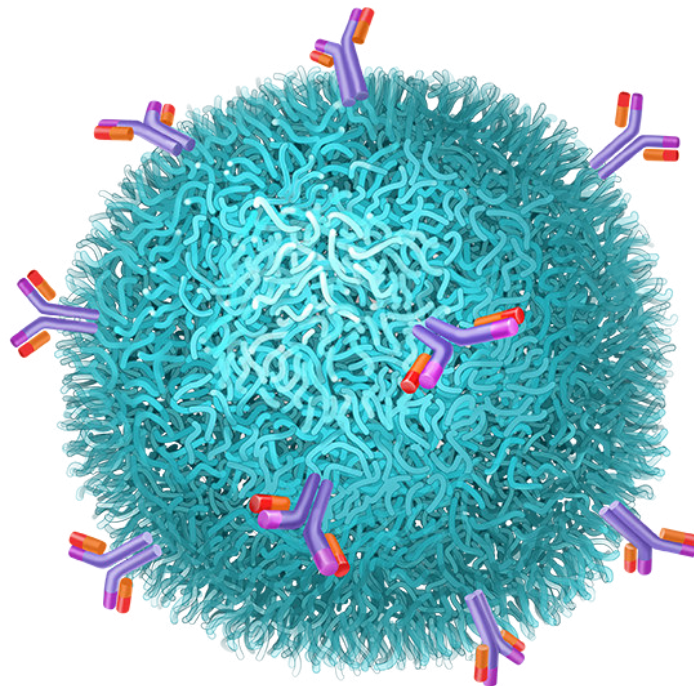




UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA



ESTRATEGIAS DE FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA EN TERAPIA ANTICANCEROSA

Cristina Romero González



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

TRABAJO FIN DE GRADO

**ESTRATEGIAS DE FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA EN
TERAPIA ANTICANCEROSA**

Trabajo Fin de Grado de carácter bibliográfico presentado por Cristina Romero González, siendo la tutora del mismo la profesora Lucía Martín Banderas del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

Fecha de presentación: 5 de Julio de 2017

Lugar de presentación: Aula 2.3 de la Facultad de Farmacia

Tipo de trabajo: Experimental

RESUMEN

El presente trabajo se encuadra en un campo de investigación extraordinariamente emergente, como es el campo de la nanomedicina. En concreto se centra en el direccionamiento de moléculas activas para el tratamiento del cáncer de mama tipo HER2+ como terapia personalizada según la presencia de receptores en el tumor de cada paciente mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal (trastuzumab).

De forma sintetizada, se ha llevado a cabo un método de síntesis eficaz y reproducible de nanopartículas portadoras del fármaco anticanceroso paclitaxel utilizando el polímero PLGA en distintas presentaciones (Resomer® 502, Resomer® 504 y PLGA-PEG) y cantidades. La síntesis se ha llevado a cabo por el proceso de nanoprecipitación, obteniendo partículas de tamaño nanométrico altamente reproducibles, con una encapsulación del fármaco elevada. A su vez, se ha llevado a cabo la funcionalización superficial de las nanopartículas por medio de la bioconjugación con el anticuerpo monoclonal trastuzumab, actuando como agente de direccionamiento y coadyuvante de la acción quimioterapéutica a la vez.

Se ha llevado a cabo el estudio de la eficacia del proceso de bioconjugación, obteniéndose resultados muy satisfactorios con los tres polímeros ensayados, pudiendo destacar las nanopartículas de Resomer® 504 como las de mayor capacidad de conjugación.

Con este ensayo se plantea una terapia localizada y personalizada para este tipo de cáncer de mama, que permite superar los numerosos obstáculos de la quimioterapia convencional, así como de aumentar la supervivencia en uno de los tipos de cáncer más frecuentes en la sociedad.

PALABRAS CLAVE

Nanopartículas, Drug-targeting, trastuzumab, paclitaxel, cáncer de mama

ABSTRACT

The present research work is related to an extremely emerging field of research, such as *nanomedicine*. Specifically, it focuses on the targeting of active molecules for the treatment of HER2 + breast cancer as personalized therapy using a monoclonal antibody (trastuzumab).

We have synthesized PLGA (Resomer® 502, Resomer® 504 and PLGA-PEG) nanoparticles carrying the anticancer drug paclitaxel by nanoprecipitation. The synthesis method was efficient and reproducible. Moreover, we have functionalized the nanoparticle's surface by a bioconjugation process with the monoclonal antibody trastuzumab, used as a directing agent and adjuvant in HER2 + breast cancer.

The study of the efficiency of the bioconjugation process has been carried out. We have obtained promising results with the three types of polymers assayed. We can emphasize the results obtained with Resomer®504 because of its high conjugation capacity.

This work proposes a localized and personalized therapy for this type of breast cancer, which allows to overcome the obstacles of conventional chemotherapy, as well as increase survival in one of the most frequent types of cancer in society.

KEYWORDS

Nanoparticles, Drug-targeting, trastuzumab, paclitaxel, breast cancer

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Cáncer y Nanomedicina	8
1.2. Nanopartículas poliméricas como sistemas de administración de fármacos.....	11
1.3. Direccionamiento de activos o <i>drug targeting</i>.....	12
1.4. Materiales empleados.....	13
1.4.1. <u>Copolímero de ácido láctico y glicólico PLGA.....</u>	13
1.4.2. <u>Cáncer de mama y Paclitaxel (PTX)</u>	15
1.4.3. <u>Trastuzumab (Herceptin ®)</u>	17
1.5. Preparación de las nanopartículas.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
3. METODOLOGÍA.....	22
3.1. Materiales.....	22
3.2. Métodos.....	22
3.2.1. <u>Preparación de las nanopartículas.....</u>	22
3.2.2. <u>Bioconjugación de las nanopartículas con trastuzumab.....</u>	23
3.2.3. <u>Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas.....</u>	24
3.2.3.1. Tamaño y distribución de tamaño.....	24
3.2.3.2. Carga eléctrica superficial: potencial zeta (PZ).....	24
3.2.3.3. Cuantificación del anticuerpo mediante HPLC-SEC.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas.....	26
4.1.1. <u>Caracterización de nanopartículas elaboradas sin funcionalizar.....</u>	26
4.1.1.1. Tamaño y distribución de tamaños.....	26
4.1.1.2. Carga eléctrica superficial: potencial zeta (PZ).....	27

4.1.2. <u>Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas con trastuzumab</u>	29
4.1.2.1. Tamaño y distribución de tamaños.....	29
4.1.2.2. Carga eléctrica superficial: potencial zeta (PZ).....	32
4.2. Eficacia de bioconjugación con trastuzumab	34
5. CONCLUSIONES	38
AGRADECIMIENTOS	39
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXO: abreviaturas y acrónimos	43

1. INTRODUCCIÓN

En el año 1959, Richard Feynman, expuso por primera vez los conceptos de nanociencia y nanotecnología en una conferencia celebrada en el Instituto de Tecnología de California (CalTech, EE.UU.). En ella, propuso la idea y ventajas de fabricar productos a partir de un reordenamiento de átomos y moléculas, haciendo posibles nuevos materiales más duros, resistentes y rápidos (Feynman, 1960; Riehemann et al., 2009).

Un material a escala nanométrico presenta propiedades muy diferentes a aquellas que posee el mismo material a escala macroscópica. En estas diferencias es donde reside el interés de este tipo de materiales.

La Nanotecnología consiste en un campo multidisciplinar que tiene gran importancia en campos como la biotecnología, microelectrónica o la medicina.

En la actualidad es un área en crecimiento muy rápido y con una gran perspectiva de futuro, ya que es de prever que el número de productos, y, por lo tanto, su impacto económico y social sea muchísimo mayor en los próximos años.

Los últimos avances en la investigación a escala atómica han permitido el nacimiento de una nueva disciplina conocida como Nanomedicina. Esta disciplina consiste en la aplicación de técnicas provenientes del campo de la nanotecnología a la salud humana, tanto en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico e imagen, como en tratamientos terapéuticos más efectivos, dirigidos específicamente a tejidos y órganos dañados. Disponiendo así de una medicina más predictiva, preventiva y específica (Samitier, J., 2005).

Los nanofármacos pueden ser clasificados en 3 generaciones (Miele et al., 2009):

1. **Primera generación o no específicamente dirigida.** Pertenecen las formulaciones liposomales, las cuales no tienen órganos diana, como la doxorubicina liposomal.
2. **Segunda generación.** Nanosistemas que sí presentan dianas moleculares. Su objetivo es liberar la mayor dosis de fármaco en los tejidos patológicos, con la finalidad de aumentar su efecto y reducir la toxicidad sistémica.
3. **Tercera generación.** Aquellos nanofármacos que se encuentran actualmente en desarrollo, los cuales se caracterizan por estar formados por múltiples partículas y por producir respuestas celulares específicas a escala molecular.

Frente a los problemas comunes que presentan los fármacos tradicionales, los nanofármacos presentan una serie de soluciones, tal y como se describe en la fig. 1:

<i>Problema</i>	<i>Efecto del nanosistema de liberación</i>
Baja solubilidad	- Sistemas de liberación de fármacos como micelas o liposomas proporcionan al medicamento un ambiente tanto hidrofóbico como hidrofílico, aumentando de esta forma la solubilidad del fármaco.
Daño del tejido al producirse la extravasación	- La dispensación regulada de los sistemas de liberación puede disminuir o eliminar el daño a los tejidos producido por la extravasación accidental.
Farmacocinética desfavorable	- Los sistemas de liberación protegen al fármaco frente a la degradación prematura o pérdida de función, por lo que también se requieren dosis menores de medicamento.
Baja biodistribución	- La especificidad asociada a los sistemas de liberación minimiza el volumen de distribución y ayuda a reducir los efectos secundarios que se puedan producir en órganos sensibles.
Falta de selectividad para tejidos	- Los sistemas de liberación pueden incrementar la concentración del medicamento en el tejido diana.

Figura 1. Problemas de los fármacos tradicionales vs soluciones gracias a los nanofármacos

1.1 Cáncer y Nanomedicina

El cáncer, hoy en día, es uno de los mayores retos de la investigación, debido al gran porcentaje de la población que lo sufre, y que va cada vez más en aumento. Los casos de cáncer en España ya superan las estimaciones previstas para el 2020, diagnosticándose 247.771 nuevos tumores en el 2015. El tipo de tumor más frecuente en España es el colorrectal, con 32.240 casos en 2012, seguido del de próstata (27.853), pulmón (26.715), mama (25.215) y vejiga (13.789) (Sociedad Española de Oncología Médica, 2016).

El aumento de incidencia de algunos tumores ha aumentado en los últimos años y se prevé que aumente aún más en los siguientes. Este crecimiento está causado por el aumento y envejecimiento de la población, así como del aumento de los factores de riesgo y de las técnicas de detección precoz.

Las terapias anticancerosas actuales, por lo general, implican procesos intrusivos, como la aplicación de catéteres para permitir la administración en bolo de la quimioterapia, el uso de cirugía para la extirpación de tumores o la radiación. El propósito de la quimioterapia y la radioterapia es matar las células tumorales, ya que son más susceptibles a la acción de estos fármacos y métodos gracias a que su crecimiento es mucho más rápido que el de las células sanas (Brannon Peppas & Blanchette et al., 2012).

Los agentes quimioterapéuticos convencionales se distribuyen de manera no específica en el organismo, afectando tanto a células cancerosas como a células normales. Esto limita la dosis de fármaco que llega al tumor y producen niveles de toxicidad excesivos. Las terapias moleculares dirigidas nacieron con el fin de superar estos límites.

La eficacia del tratamiento está directamente relacionada con la capacidad para atacar y matar las células cancerosas afectando lo menos posible a las sanas. Los avances en el tratamiento del cáncer están progresando rápidamente, tanto en términos de nuevos agentes anticancerígenos como en nuevas formas de presentación.

En esta enfermedad se infraexpresan o/y sobreexpresan ciertas moléculas, por lo tanto, es necesario evaluar cientos de miles de proteínas en el cuerpo humano para determinar con fiabilidad, la presencia o no de un tumor. De este modo, la detección del cáncer a nivel molecular, es uno de los objetivos de la nanotecnología en medicina (Ferrari, 2010). La nanomedicina permitirá detectar el cáncer en estadios más tempranos de la enfermedad gracias al desarrollo de nanodispositivos de detección más precisos.

Además de la detección se están desarrollando sistemas de liberación a escala nanométrica. La eficacia de éstos está determinada por su pequeño tamaño, la capacidad de liberación controlada del fármaco, y por lo tanto la modificación de la farmacocinética y biodistribución de éste, así como la reducción de la toxicidad (Suri et al., 2007).

Existen numerosos vehículos de escala nanométrica, diferenciándose en su composición y estructura. La figura 2 recoge algunos de los más empleados (fig. 2).

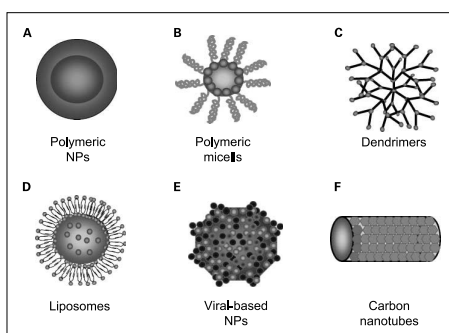


Figura 2. Ilustración de nanopartículas poliméricas representativas

Comercialización de nanofármacos

Al tratarse de una disciplina emergente, la comercialización de productos procedentes de *nanomedicina* se encuentra en un estadio inicial. Existen distintas limitaciones a la explotación comercial de resultados de la investigación biomédica, entre ellos los altos costes de producción a gran escala, la inexistencia de una regulación específica para la nanomedicina, el largo proceso de aprobación de nuevos materiales para su uso en salud humana, y el miedo de la sociedad a utilizar tecnologías innovadoras. A pesar de estos inconvenientes, existen dos factores clave que beneficiarán a la comercialización de estos productos: (i) la inversión de

fondos públicos y (ii) la expiración de patentes de medicamentos pertenecientes a industrias farmacéuticas (Bawarski et al., 2008).

En la actualidad, ya se encuentra disponible en el mercado una serie de fármacos desarrollados basándose en los principios de la Nanotecnología. En cuanto a la nanomedicina, existen unos 20-25 productos comercializados y aproximadamente el doble se encuentran en desarrollo clínico. Abraxane® y Doxil® se consideran los primeros sistemas nanométricos comercializados. Abraxane® vehiculiza paclitaxel y Doxil® hidrocloreuro de doxorubicina, las dos formulaciones están consideradas como nanomedicinas de primera generación, sin especificidad.

Abraxane® fue aprobado en el 2005 por la FDA para el pretratamiento metastásico del cáncer de mama (respuesta del 48%), para el cáncer pulmonar de células no pequeñas (respuesta del 16%), además del tratamiento paliativo del cáncer pancreático. Dicho medicamento consiste en NPs de albúmina con paclitaxel (PTX) de un diámetro de 130nm libre de cualquier tipo de disolvente (Sparreboom et al., 2005; Micha et al., 2006). Este diseño hace posible una mayor liberación del PTX en el tejido neoplásico, disminuyendo la dosis requerida y los efectos adversos.

Esta formulación permite, a los pacientes tratados con PTX que experimentan reacciones de hipersensibilidad grave o anafilácticas, la oportunidad de continuar el tratamiento con taxanos.

En cuanto a **Doxil®**, fue el primer nanofármaco aprobado por la FDA (1995), utilizándose para tratar el sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA, el cáncer de mama, ovárico y otros tumores sólidos. La formulación de este medicamento se basa en el fármaco doxorubicina encapsulado en un liposoma STEALTH®. Este liposoma posee en su superficie moléculas de polietilenglicol (PEG) que “enmascaran” al liposoma frente al sistema inmunitario, y por lo tanto, aumenta su tiempo de circulación en la sangre, proporcionando un efecto farmacológico más prolongado frente a las células tumorales (Abraham et al., 2005).

Los liposomas pertenecientes a la formulación, se encuentran en un intervalo de tamaños de 100-200 nm que extravasan fácilmente dentro del sitio de crecimiento del tumor.

En cuanto a los efectos adversos, casi siempre son reversibles y vienen relacionados con la infusión. Existen toxicidades limitantes de la dosis, como el síndrome de pies y manos, riesgo leve de desarrollar leucemia después del tratamiento, además de que está contraindicado en las personas con problemas cardíacos.

A pesar de sus innumerables ventajas también existen inconvenientes en las terapias dirigidas, como puede ser la resistencia que crean las células cancerosas, por lo que es mejor usar coadyuvantes como la quimioterapia y la radiación. Existen blancos para los cuales es difícil crear un medicamento, debido a su estructura o función, por ello es fundamental la inversión en la biomedicina, ya que aún es una disciplina emergente en la cual se están llevando a cabo numerosos de ensayos clínicos.

1.2 Nanopartículas poliméricas como sistemas de administración de fármacos

Actualmente, proporcionar la dosis adecuada de fármaco en la célula diana para el tratamiento del cáncer continúa siendo un reto. El empleo de NPs como sistemas de administración de fármacos (fig. 3) supone sin duda una gran ventaja, ya que se proporcionan un control espacio-temporal del fármaco. De este modo, es posible conseguir medicamentos más efectivos: ya que son capaces de transportar el fármaco a las células cancerosas, produciéndose un acúmulo de fármaco a nivel tumoral, evitándose la inactivación prematura durante su transporte y, por lo tanto, la generación de mecanismos de resistencia. Así, se necesitaría una menor dosis de fármaco, disminuyendo los efectos secundarios y aumentando la calidad de vida del paciente (Feng et al., 2004).

Las NPs gracias a su pequeño tamaño, tienen como ventaja la capacidad de atravesar barreras, pudiendo transportar un fármaco poco soluble al lugar de interés, mejorando así su captación por parte de las células enfermas y disminuyendo los efectos adversos. En el caso de un fármaco hidrófobo y antineoplásico como es el PTX, podría ayudar a aumentar su tiempo de permanencia en el organismo, así como se aumentar su eficacia en células cancerígenas, aumentando por lo tanto la eficacia terapéutica, mientras que la biodistribución y la farmacocinética del fármaco no se ven alteradas (Yu et al., 2016).

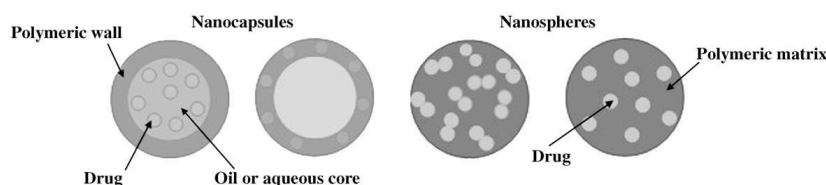


Figura 3. Esquema representativo de estructuras de NPs poliméricas

Las NPs poliméricas (NPs) no presentan los efectos secundarios de los sistemas virales tradicionales (mutagénesis de inserción e inmunogénesis) o liposomas (toxicidad e ineficiencia).

Las NPs no sólo son útiles como sistemas liberadores de fármacos, también pueden utilizarse con fines diagnósticos, actuando como biosensores o biomarcadores, pudiéndose utilizar conjuntamente el direccionamiento de activos o *drug targeting* con este fin (Suri et al., 2007).

1.3 Direccionamiento de activos o *drug targeting*

El direccionamiento de activos o *drug targeting* puede definirse como la capacidad del fármaco de acumularse en el lugar de acción de forma selectiva y cuantitativa, independientemente de la vía y modo de administración (Torchilin, 2000). Por medio de estos sistemas se intentan resolver los principales problemas asociados a la administración sistémica de fármacos, como pueden ser:

- Paso a través de las barreras biológicas para alcanzar el sitio de acción, con posibilidad de inactivación.
- Falta de afinidad por el lugar de acción.
- Necesidad de administración de una alta dosis de fármaco para conseguir una concentración adecuada en la célula diana.
- Aumento de la toxicidad y de los efectos adversos por la alta dosis de fármaco administrada.

La administración de un activo por medio de NPs permite “enmascarar” las propiedades de ésta, ya que serán las propiedades de las NPs las que condicionarán su distribución en el organismo hasta alcanzar el tejido diana. Este mecanismo permite minimizar la dosis de fármaco administrado, disminuyendo a su vez los efectos adversos, aumentando el efecto terapéutico y por lo tanto aumentando la efectividad y el coste del tratamiento.

NPs correctamente diseñadas pueden portar el activo encapsulado de forma específica a un tejido diana y liberarlo en el interior de las células diana después de la degradación de la matriz, sin afectar a los tejidos circundantes. Las NPs que tienen una superficie hidrófila pueden a su vez evitar la absorción por el sistema reticuloendotelial y acumularse pasivamente en los tumores debido al efecto de aumento de la permeabilidad y retención en la vascular tumoral (Brigger, et al., 2002).

Una vez producida la administración de las NPs, el reconocimiento a nivel de célula diana se puede producir de diversas formas, tanto a nivel de órgano completo, a nivel de ciertas células específicas o de componentes característicos de las células. A continuación, se muestran diferentes estrategias existentes:

1. **Administración directa del fármaco en la zona afectada.** Es difícil de llevar a cabo, ya que normalmente, el cáncer se extiende a distintos tejidos, y por lo tanto no presenta una zona exclusiva de daño.
2. **Aumento de la permeabilidad y retención del activo en el lugar de acción.** Esta estrategia también se conoce como *targeting pasivo*.
3. **Targeting físico.** Basado en la temperatura y el pH específico de la zona diana.
4. **Targeting magnético.** Uso de materiales paramagnéticos junto con un campo magnético externo.
5. **Targeting activo.** Consiste en la unión del activo a un ligando que presenta afinidad por la célula diana. Es la estrategia más favorable y aplicable (Torchilin, 2000).

Respecto al *targeting* activo, uno de los mayores retos es definir el ligando de dirección óptima o agentes para transportar selectivamente y con éxito los sistemas de NPs al tejido canceroso. Estas estrategias se basan en la capacidad de los ligandos de unirse a la superficie de las células tumorales de manera apropiada para desencadenar la endocitosis del receptor, de modo que los agentes terapéuticos sean entren en la célula cancerosa (Brigger et al., 2002).

1.4 Materiales empleados

1.4.1 Copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA)

El poli (D,L-lactida-co-glicólico) (PLGA) (fig. 4) es un copolímero biodegradable y biocompatible, aprobado por la FDA. Muy empleado en biomedicina ya que es considerado el mejor en cuanto a diseño y rendimiento, por ello es ampliamente utilizado en la preparación de micro- y NPs para la vehiculización de activos hasta el lugar de acción.

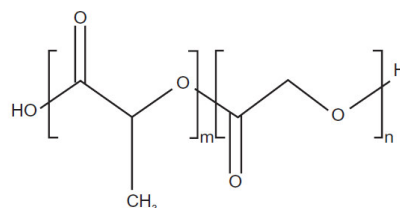


Figura 4. Estructura química del PLGA

El PLGA se puede procesar de casi cualquier forma y tamaño, y puede encapsular moléculas de prácticamente cualquier tamaño, pero al crear un microambiente ácido en su degradación no está indicado para encapsular proteínas o moléculas sensibles a los ácidos. Es soluble en una amplia variedad de disolventes orgánicos, entre los que se incluye la acetona. En el agua, el PLGA se biodegrada por hidrólisis de sus enlaces éster, pero al ser poco hidrófilo esta degradación se produce lentamente (fig. 5).

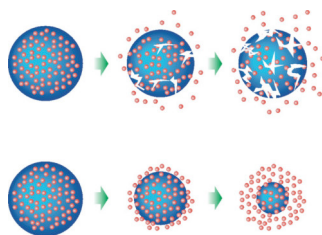


Figura 5. Biodegradación del PLGA: (a) erosión total, (b) erosión superficial

Propiedades como la resistencia mecánica, hinchamiento y la capacidad de ser hidrolizado están directamente influenciadas por la cristalinidad del PLGA, que depende del tipo y relación molar de los componentes monoméricos individuales (ac. láctico y ac. glicólico) (Dinarvand et al., 2011).

Las NPs de PLGA presentan grandes áreas de superficie y grupos funcionales libres para conjugarse a múltiples ligandos. Además, poseen alta estabilidad en fluidos biológicos, por lo que son candidatos ideales para usarse para el *drug targeting* de fármacos anticancerosos, tanto en *targeting* pasivo, basado en la mayor permeabilidad y efecto de retención, tanto como en *targeting* activo, que mejora la eficacia antitumoral y reduce la toxicidad en los tejidos sanos.

En cuanto a la biodistribución y farmacocinética sigue un modelo bifásico dependiente de la dosis y la composición de los sistemas de soporte del PLGA. Las NPs se acumulan rápidamente en el hígado, médula ósea, ganglios linfáticos, bazo y macrófagos peritoneales. La degradación es rápida en la etapa inicial (30%) y retrasa su eliminación por la vía pulmonar. Para hacer frente a estas limitaciones surge la incorporación de agentes modificadores de superficie, aumentando así el tiempo que permanecen en la circulación sanguínea y su vida media.

Cuando se incluyen cadenas de polietilenglicol (PEG) hidrófilas en la superficie del polímero, éstas se orientan hacia la fase acuosa externa, actuando como una barrera que reduce las interacciones con moléculas extrañas por repulsión estérica, y gracias a su

tendencia hidrofílica aumenta la estabilidad del almacenamiento. Sin embargo, la adición de PEG también resulta en una reducción de la encapsulación y eficiencia de algunos activos y proteínas.

El PLGA está siendo ampliamente utilizado en los sistemas de administración de fármacos, debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad, especialmente en la preparación de sistemas transportadores de fármacos antitumorales (Dong & Feng, 2007; Feng et al., 2004). Los estudios toxicológicos sugieren que pueden ocurrir reacciones locales en el tejido de aplicación. Aunque normalmente son leves, ya que se ha demostrado que el PLGA es extremadamente seguro como material para las NPs.

Un futuro uso potencial es la combinación de agentes terapéuticos y de diagnóstico (nanoteragnosis) (fig.6). Así, las NPs que contienen un agente de diagnóstico pueden ser detectadas en las células cancerosas, permitiendo el control de la eficiencia de liberación del fármaco en las células diana (Dinarvand et al., 2011).

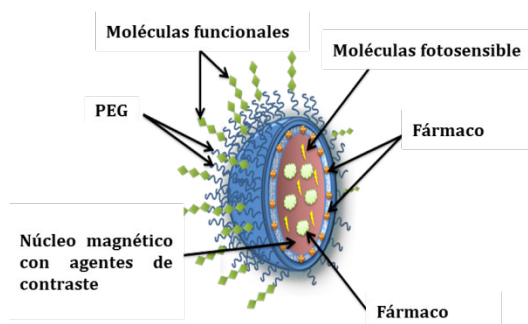


Figura 6. Esquema de un sistema nanoteragnóstico PEGilado

Existen múltiples métodos y técnicas para la síntesis de NPs poliméricas. Las técnicas más utilizadas en investigación para la obtención de partículas de PLGA son las técnicas de emulsión-evaporación del disolvente y nanoprecipitación (Dong & Feng, 2007). En el presente trabajo se empleará la técnica de NPP, ya que es el método de elección para fármacos lipófilos, por su alta capacidad de encapsulación, adecuada estabilidad y elevada reproducibilidad.

1.4.2 Cáncer de mama y paclitaxel (PTX)

A continuación, nos centraremos en el cáncer de mama, ya que en el presente estudio se utiliza el PTX como fármaco modelo encapsulado en las NPs funcionalizadas para interactuar de forma selectiva con células cancerosas de mama tipo HER2+.

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en las mujeres occidentales,

diagnosticándose en España alrededor de 25.000 nuevos casos al año (2014). 1 de cada 8 mujeres tendrá cáncer de mama a lo largo de su vida (Organización Mundial de la Salud, 2017).

El cáncer de mama muestra una gran influencia hormonal. Muchos factores de riesgo como la menarquía temprana, edad tardía del primer parto, menopausia tardía u obesidad en mujeres postmenopáusicas, suponen una mayor exposición de la glándula mamaria a los estrógenos. También se consideran factores de riesgo el sedentarismo, la exposición a radiaciones ionizantes el consumo de alcohol, los anticonceptivos orales y el tabaco.

Los antecedentes familiares suponen un considerable aumento del riesgo, estas personas poseen probabilidad entre 60 % y 80 % de desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida.

En el tratamiento del cáncer de mama se sigue distintos protocolos según una serie de factores, como pueden ser la edad del paciente, su estado general y hormonal, la localización del tumor, la fase en la que se encuentra la enfermedad, los receptores hormonales del tumor, el grado de las células o la positividad para algunos factores biológicos (por ejemplo, Her2, del cual hablaremos más adelante).

Uno de los tratamientos de elección es el PTX, fármaco perteneciente a la familia de los taxanos, famosos por ser los antineoplásicos naturales más potentes. El PTX es un agente estabilizador de microtúbulos con actividad neoplásica, especialmente contra el carcinoma primario epitelial de ovario, mama, colon y pulmón. Actúa deteniendo el ciclo celular en las fases G₂ y M, inhibiendo la división.

Este fármaco es altamente lipófilo e insoluble en agua, pero soluble en muchos disolventes orgánicos tales como los alcoholes.

El factor limitante que existe para la síntesis del PTX es la formación del anillo 1,3-epoxiporpano y la cadena éster homoquiral que se encuentra en el C13. Numerosos estudios han demostrado que para mantener la actividad citotóxica es necesario la presencia de la cadena éster y que el anillo de los taxanos quede intacto. Por otro lado, el grupo hidroxilo libre en la posición 2' de la cadena éster es importante para aumentar tal actividad (Kingston, 2001) (Fu et al., 2009). Sin embargo, la posición 7-OH no es tan importante para la actividad, sin pérdida significativa en la actividad (fig. 7).

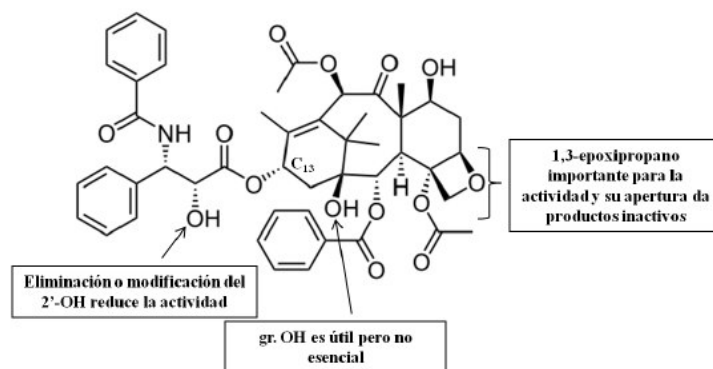


Figura 7. Estructura química del PTX (se señalizan los grupos funcionales más importantes para la actividad antitumoral)

Uno de los grandes inconvenientes que presenta, es su escasa solubilidad debido a su estructura química (fármaco clase IV según la clasificación BCS), por lo que existen dificultades para su administración. Dicho problema podría solucionarse mediante el uso de NPs de PLGA para su administración, presentando así una liberación controlada y selectiva del fármaco al órgano diana, con una mayor eficacia y menores efectos secundarios (Zhao & Feng, 2010).

El PTX se encuentra formulado y comercializado bajo el nombre de **Taxol®** (Laboratorio Bristol-Myers Squibb, S.L). Como efectos adversos, el más importante son las reacciones de hipersensibilidad que aparecen a los 10 min de la administración intravenosa, acompañándose de hipotensión, disnea, urticaria, dolor de pecho y los efectos comunes a el tratamiento de quimioterapia: neutropenia, alopecia, trastornos gastrointestinales...

Muchos de estos efectos adversos, así como la medicación pretratamiento necesaria se evitan gracias al uso de NPs.

1.4.3 Trastuzumab (Herceptin®)

Trastuzumab, comercializado como **Herceptin®** por Roche, es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante con dominio extracelular selectivo del factor de crecimiento epidérmico receptor humano 2 (HER2), que se sobreexpresa en un 25-30% de los cánceres de mama invasivos (Mi et al., 2012).

Los cánceres de mama con amplificación del gen HER2 o HER2+ tienden a crecer más rápido y es más posible que se extiendan y se vuelvan a formar en comparación con los HER2-.

El uso está destinado tanto como a los cánceres de mama metastásicos (CMM) como para los cánceres de mama precoces, ambos HER2+. Debe combinarse con algún citostático, como

el PTX (es el caso de este estudio) o el docetaxel. También puede combinarse con inhibidores de la aromatasa o con radioterapia

Trastuzumab ha sido aprobado por la FDA como tratamiento único o coadyuvante de la quimioterapia en el tratamiento de los cánceres HER2+. Herceptin® logra sus efectos a través de múltiples mecanismos, que incluyen el bloqueo de HER2 provocando la escisión del dominio extracelular, inhibiendo las vías de señalización, la toxicidad celular dependiente de anticuerpos, estimula la apoptosis, la reducción del angiogénesis y ayuda a la reparación del ADN (Mi et al, 2012.; Zhao & Feng, 2014). El efecto sinérgico se ha observado para la coadministración de Herceptin® y los citotóxicos convencionales, tales como PTX, Docetaxel o carboplatino. (Yu et al., 2016).

Además de como coadyudante, el uso de transtuzumab como ligando unido a la superficie de las NPs tiene función de direccionar la nanopartícula directamente al tumor (fig. 8), y permitiendo la entrada selectiva del fármaco citostático (PTX en este ensayo) en las células cancerosas HER2+. Así, se consigue reducir los efectos adversos asociados, a la vez que se aumenta la eficacia anticancerosa, pudiendo disminuir la dosis aplicada y aumentando la eficiencia (Yu et al., 2016).

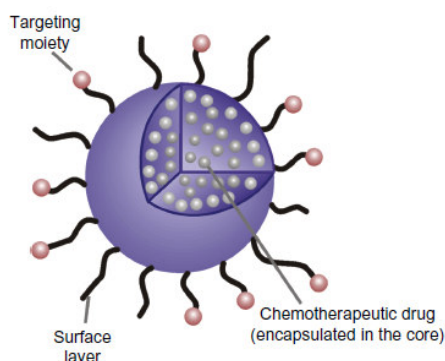


Figura 8. *Nanopartícula cargada con fármaco y modificada superficialmente con un ligando específico*

Como efectos adversos, trastuzumab causa síntomas similares a la gripe, el más grave es el descenso de la función cardíaca durante el tratamiento. Ésta se recupera cuando se finaliza el tratamiento con el anticuerpo. En casos poco frecuentes puede causar reacciones graves relacionadas con la respiración.

1.5 Preparación de las nanopartículas

Existen diversas técnicas de encapsulación de un principio activo. La selección de una técnica u otra se basa fundamentalmente en las características fisicoquímicas del polímero y el principio activo. El método elegido en este trabajo fue el método de *nanoprecipitación* (NPP), gracias a su buena reproducibilidad y alta capacidad de encapsular fármacos lipófilos (Fessi y cols., 1989).

Este método de síntesis de NPs, requiere dos fases (fig. 9): una acuosa (FA) y otra orgánica (FO). La FO consiste en una solución de un disolvente orgánico, miscible con el agua y de bajo punto de ebullición (o una mezcla de ellos), como pueden ser acetona o acetato de etilo y un polímero, el cuál puede ser de origen natural, semisintético o sintético (éste es el caso del estudio).

Los polímeros sintéticos utilizados son poliésteres biodegradables (en nuestro caso PLGA), los cuales se caracterizan por poseer mayor pureza y reproducibilidad que los polímeros naturales.

La FA consiste en un no-solvente, normalmente agua, junto con la sustancia formadora de película, precisando de tensioactivos.

En el método de NPP, se obtienen las NPs en una suspensión coloidal que se forma cuando se añade lentamente la FO sobre la FA, la cual, se encuentra bajo agitación moderada (fig. 9).

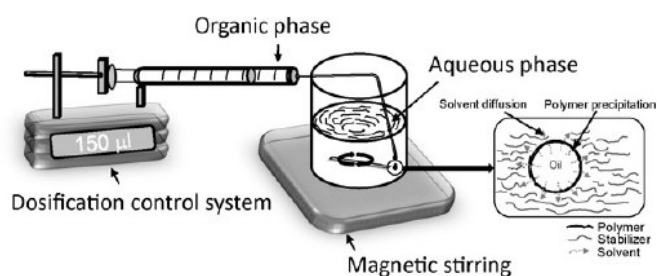


Figura 9. Método de nanoprecipitación utilizado para la síntesis de NPs (Mora-Huertas, C.E. et al. 2010)

Según el esquema de la fig. 9, podemos diferenciar 3 etapas en el proceso de NPP: (1) nucleación; (2) crecimiento y (3) agregación. La correcta separación entre la nucleación y el crecimiento es el factor clave para la formación de partículas uniformes. Se debe lograr una alta tasa de nucleación, la cual generará la saturación necesaria para evitar la agregación de las NPs.

La rápida difusión del disolvente orgánico desde la FO a la FA, conlleva la formación de NPs como resultado de la disminución interfacial y la disposición del PLGA para la formación de la membrana de las NPs.

La NPP, respecto a la técnica de emulsión- evaporación presenta la ventaja de ser un método con elevada capacidad para encapsular principios activos lipófilos (en nuestro caso el PTX), se consume menos energía durante el proceso de formación de las NPs, ya que únicamente requiere una agitación leve. La principal desventaja que presenta es la baja eficacia de encapsulación de principios activos hidrófilos con respecto a los lipófilos (Astete & Sabliov, 2006).

2. OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación se encuadra en una tecnología cada día más estudiada y explotada: *drug targeting* o direccionamiento de fármacos.

Concretamente, este trabajo está orientado a la nanotecnología y su aplicación en el desarrollo de nuevas estrategias de vehiculización del PTX, utilizando para ello NPs poliméricas de PLGA y el anticuerpo Trastuzumab como ligando para el tratamiento específico del cáncer de mama tipo HER2.

Por lo tanto, el OBJETIVO GENERAL del presente trabajo consiste en la síntesis de NPs biodegradables y biocompatibles conteniendo un fármaco antineoplásico para su direccionamiento activo a células cancerosas HER2+.

Para ello se abordarán los siguientes **objetivos específicos**:

1. Obtención de las NPs a base del polímero de PLGA mediante nanoprecipitación.
 - a. Obtención de NPs blancas (sin fármaco)
 - b. Obtención de NPs cargadas (con PTX)
2. Asegurar la homogeneidad de las NPs con un control del tamaño adecuado, distribuciones de tamaños estrechas y reproducibles, así como del potencial zeta.
3. Modificación superficial de las NPs obtenidas mediante bioconjugación, utilizando el anticuerpo Trastuzumab como ligando específico.
4. Caracterización de las partículas nanométricas modificadas superficialmente mediante bioconjugación.
5. Cuantificación de la cantidad de anticuerpo ligado mediante la cromatografía HPLC por exclusión de tamaño.

3. METODOLOGÍA

3.1 Materiales

En la realización del presente estudio, se han empleado los siguientes materiales:

- PLGA: 50:50 Resomer® 502, Resomer® 504, Resomer® PEG, como constituyentes de las NPs
- PTX: Phyton Biotech LLC
- Acetona grado HPLC: Panreac como disolvente orgánico
- Pluronic® F68: Sigma como disolvente acuoso
- Span® 60: Sigma como tensioactivo
- EDC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida]: Sigma, como activador superficial.
- NHS (N-hidroxisuccinimida): Sigma, Alemania; como activador superficial.
- Trastuzumab (Herceptin®, Roche)
- Tampón fosfato
- Se empleó agua Milli-Q Milipore en todas las formulaciones

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación de las nanopartículas

En el presente estudio se prepararon 6 tipos de NPs, siempre utilizando como polímero PLGA y variando los distintos tipos de polímero comercial: Resomer®: 502-Blancas, 502-Taxol, 504-Blancas, 504-Taxol, PLGA-PEG-Blancas, PLGA-PEG-Taxol. Estas NPs se prepararon por el método de NPP. Se han designado como *NPs blancas* a aquellas que no lleven fármaco en su formulación y *NPs cargadas* a las que sí contienen fármaco.

En todas las formulaciones cargadas, la cantidad de PTX se fijó al 12.5% p/p respecto al peso del polímero, añadiéndolo en la fase orgánica. Esta concentración ha sido optimizada por el grupo de investigación y los resultados de eficacia de encapsulación se presentaron en un Trabajo de Fin de Máster durante el curso 14/15.

A continuación, en la tabla 1, se muestra la composición de las distintas formulaciones ensayadas en este trabajo:

Nº	Formulación NPs	Fase orgánica (FO)			
		Resomer® (mg)	Span® 60 (mg)	Acetona (mL)	PTX (mg)
1	PLGA-502-B	45	15	3	-
1a	PLGA-502-PTX	45	15	3	5.64
2	PLGA-504-B	45	15	3	-
2a	PLGA-504-PTX	45	15	3	5.64
3	PLGA-PEG-B	45	15	3	-
3a	PLGA-PEG-PTX	45	15	3	5.64

Tabla 1. Formulaciones de NPs ensayadas mediante NPP (FA: 9mL de Pluronic®F68 0.5 % p/v)

Una vez preparadas ambas fases, se comienza a gotear la FO sobre la FA con ayuda de una bomba de jeringa a una velocidad de 5 mL/h (Martín-Banderas et al., 2012; Martín-Banderas et al. 2014; Martín-Banderas et al. 2015). La adición de una fase sobre la otra ocurre siempre bajo agitación magnética a temperatura ambiente. Una vez terminado el goteo, se mantiene la agitación hasta que se produzca la evaporización de la acetona (4h). Pasado este tiempo, se procede a medir el tamaño de las NPs y el potencial zeta en un equipo de difracción laser *Zetasizer Nano ZS90* (Malvern Instruments, Reino Unido).

A continuación, se procede a lavar y recuperar las NPs. Para ello, se lleva a cabo un proceso de ultracentrifugación a 4°C, durante 45 min, a 10.500 rpm (Eppendorf 504R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

3.2.2 Bioconjugación de las nanopartículas con trastuzumab

Existen múltiples técnicas de funcionalización de NPs con anticuerpos (Polo et al., 2013). El proceso de bioconjugación llevado a cabo en el presente trabajo ha sido realizado mediante unión covalente orientada a través de la fracción Fc del anticuerpo.

Para ello es necesario controlar el valor del pH del medio de conjugación el cual debe ser inferior al punto isoeléctrico del anticuerpo y a continuación, mediante la estrategia de la carbodiimida, es posible formar un enlace amida entre el anticuerpo y los grupos COOH del polímero.

Se estudiaron las siguientes variables sobre la influencia de la eficacia de bioconjugación: (i) tipo de polímero (502, 504, o PLGA-PEG); (ii) ratio partícula:anticuerpo variando cantidad de partículas o cantidad de anticuerpo (4:1; 11:1; 13:1; ó 26:1).

Tras el proceso de conjugación se realizaron los controles oportunos de tamaño y PZ como se indica en los siguientes apartados.

3.2.3 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

3.2.3.1 Tamaño y distribución de tamaños

Tanto el tamaño como la distribución de tamaños en una población de NPs son características fundamentales que pueden determinar su aplicación biológica final, toxicidad, distribución *in vivo* así como su grado de direccionamiento. Además, pueden influenciar en la carga y liberación de fármaco.

Las medidas de los diámetros (nm) e índice de polidispersión Pdl de las NPs, se llevaron a cabo empleando un equipo de difracción láser *Zetasizer Nano ZS90* (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). El fundamento de este aparato para la determinación del tamaño de las partículas es la medida de la difusión de las mismas, que se mueven bajo el movimiento browniano y la convierte a la medida y distribución de tamaño utilizando la relación de Stokes-Einstein.

3.2.3.2 Carga eléctrica superficial: potencial zeta (PZ)

El potencial zeta de las NPs se utiliza para caracterizar la carga eléctrica superficial que poseen. Muestra el potencial electrocinético de las NPs y depende de la composición de la partícula y el medio en el que se dispersa. Las NPs con un PZ por encima de ± 30 mV han demostrado ser estables en suspensión.

El PZ también se puede utilizar para determinar si un material cargado es encapsulado en el centro de la nanopartícula o en la superficie (Goldberg et al., 2007). Al igual que para el análisis del tamaño y Pdl de las NPs, el dispositivo que se usó para la determinación del potencial zeta fue *Zetasizer Nano ZS90* (Malvern Instruments, Reino Unido).

Para llevar a cabo las medidas de tamaño, Pdl y PZ, se tomaron muestras de las suspensiones de NPs, previa dilución en agua Mili-Q.

3.2.3.3 Cuantificación del anticuerpo mediante HPLC-SEC

Para determinar la cantidad de anticuerpo conjugado a las NPs se empleó la cromatografía de alta resolución, HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Cromatografía Líquida de Alta Resolución). Se trata de un tipo de cromatografía en columna ampliamente utilizada en la actualidad para separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla en función de la polaridad y las interacciones establecidas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

En este caso se utilizó una cromatografía HPLC-SEC por exclusión de tamaño, utilizando las siguientes condiciones: fase estacionaria columna XBridge® BEH 200Å SEC 3,5µm, volumen de inyección 10 µL, flujo 0.86 mL/min, temperatura 25°C, y una fase móvil de tampón fosfato. El tiempo de retención de lectura fue de 4.3 min.

El método analítico desarrollado por HPLC-SEC para la determinación del anticuerpo fue optimizado y adaptado a las condiciones de nuestro laboratorio, obteniéndose un pico de absorción adecuado (estrecho, aislado y simétrico), con un tiempo de retención de 4.3 min. Durante un análisis corto de 10 min (fig. 10).

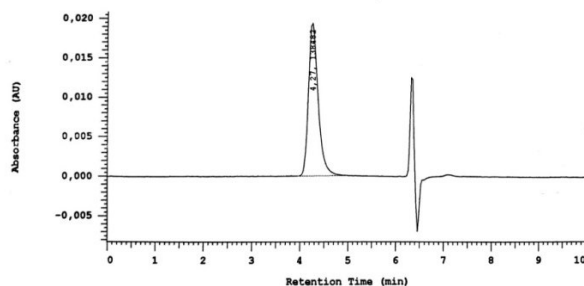


Figura 10. Cromatograma de Herceptin® por cromatografía HPLC-SEC

La cantidad de anticuerpo conjugada se expresó como Eficacia de Conjugación (EC%) y se determinó siguiendo la fórmula mostrada en la fig. 11.

$$\text{Conjugation efficiency} = \frac{\text{Total amount} - \text{The amount in supernatant}}{\text{Total amount}} \times 100\%$$

Figura 11. Fórmula utilizada para calcular la eficacia de conjugación del anticuerpo (Wu et al., 2014)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo experimental se enmarca dentro de un proyecto actual del grupo de investigación en el que se ha optimizado la encapsulación de PTX en este tipo de matrices. De forma resumida, podemos decir que se obtienen partículas con un diámetro medio de 120 – 160 nm con eficacias de encapsulación entre el 75-80%. Las partículas han sido ensayadas in vitro en cultivos celulares mostrando valores de IC50 inferiores al fármaco libre en el mismo intervalo de concentraciones ensayadas.

A continuación, se muestran los principales resultados de este trabajo.

4.1. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

4.1.1. Caracterización de nanopartículas elaboradas mediante NPP

4.1.1.1. Tamaño y distribución de tamaños (PDI)

El método para determinar el tamaño de partícula y la distribución de tamaños fue el descrito en el apartado 3.2.3.1. Como podemos observar en la tabla 3, los diámetros medios obtenidos para las NPs blancas se sitúan en el intervalo 150 – 230 nm, siendo las NPs PEGiladas las de menor tamaño, seguidas de las elaboradas con Resomer® 502, y posteriormente 504. Las NPs PEGiladas poseen un menor tamaño ya que las cadenas de PEG son de naturaleza hidrófila, al igual que el medio en el cual se dispersan, por lo que al situarse en la interfase estabiliza al sistema durante la síntesis, resultando en un menor tamaño medio de partícula.

En cuanto a las partículas con fármaco, se puede observar que el tamaño medio aumenta significativamente (formulaciones 1ª, 2ª y 3ª, tabla 2). En cuanto a la formulación PEG-PTX observamos que aumenta ≈ 70 nm su diámetro, un porcentaje de aumento mucho superior al de las otras formulaciones. Además aumenta el valor de PDI. Esto podría explicarse a que la presencia de PTX, altamente lipófilo, desestabiliza al sistema en mayor grado debido a la menor lipofilia del PLGA-PEG.

Nº	Tipo Polímero	Carga PTX (%p/p)	Diámetro ± DE (nm)	Pdl ± DE
1	502	0	179.48 ± 11.03	0.15 ± 0.03
2	504	0	232.36 ± 23.11	0.30 ± 0.11
3	PLGA-PEG	0	149.83 ± 2.60	0.20 ± 0.01
1ª	502	12.5	209.88 ± 2.88	0.21 ± 0.03
2ª	504	12.5	219.68 ± 29.66	0.19 ± 0.06
3ª	PLGA-PEG	12.5	221.70 ± 2.6	0.36 ± 0.01

Tabla 2. Diámetro medio y Pdl de las formulaciones de NPs obtenidas por NPP (n=12) (DE: desviación estándar)

Respecto a la distribución de tamaños (Pdl), podemos ver que todas las formulaciones ensayadas presentan homogeneidad y uniformidad de tamaños, con valores de Pdl por debajo de 0.4. Para los tres tipos de polímero ensayados, las NPs blancas presentaron menor tamaño y una distribución de tamaño más estrecha que las NPs cargadas. Este hecho puede ser explicado debido a la elevada lipofilia del fármaco que desestabiliza el sistema durante el proceso de síntesis.

A modo de ejemplo, en la fig. 12, se muestra una distribución típica para las NPS elaboradas por NPP donde se muestra la influencia de la presencia de PTX o PEG en la formulación.

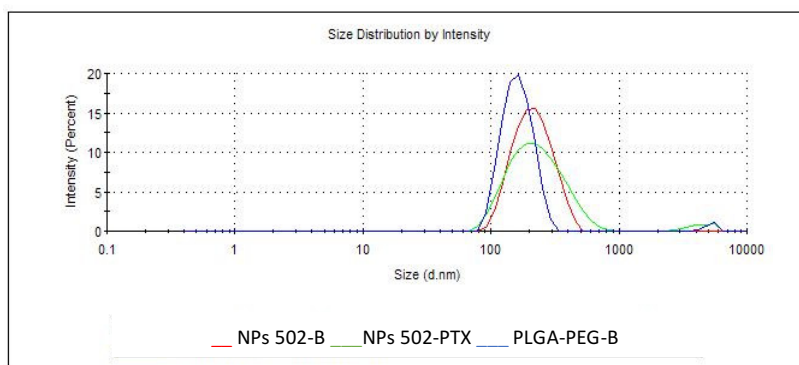


Figura 12. Distribución de tamaño de NPs 502 blancas y cargadas y NPs PEGiladas blancas

4.1.1.2 Carga eléctrica superficial: potencial zeta (PZ)

Siguiendo la metodología del apartado 3.2.3.2, se determinó la carga eléctrica superficial para las NPs sintetizadas por NPP. A continuación, en la fig. 13 se resumen los datos obtenidos.

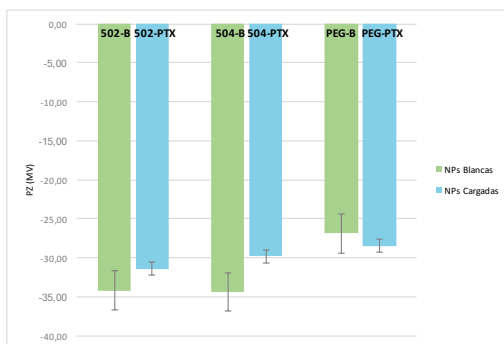


Figura 13. PZ en función del tipo y carga del polímero de NPs de PLGA obtenidas por NPP

Como podemos observar, las NPs elaboradas con Resomer® 502 y 504 presentan valores de PZ muy similares: -34.18 mV y -34.39 mV, respectivamente. Estos valores son debidos a la estructura química del polímero causado por la presencia de grupos carboxilo. En el caso de PLGA-PEG, se obtiene valores menos negativos de PZ (-26.9 mV) ya que estos grupos ácidos han sido ocupados por cadenas de PEG. Al hacerse ligeramente menos negativo el PZ, es de esperar una mayor adhesión de las NPs a las membranas biológicas, facilitándose la entrada de éstas a las células (Zhao & Feng., 2010).

La presencia de fármaco supuso valores de PZ ligeramente menos negativo. Esto podría explicarse a que parte del fármaco encapsulado quedaría en la superficie de la nanopartícula, reduciendo ligeramente la electronegatividad de las NPs (Martin-Banderas et al., 2014).

Con estos datos podemos concluir que la técnica de NPP además de encapsular correctamente el PTX a una concentración de 12.5% p/p nos permite estabilizar las NPs de PLGA, ya que a medida que disminuye el potencial, más estables son y menos tienden a agregarse gracias a sus grupos carboxilo de la superficie, que permiten la repulsión.

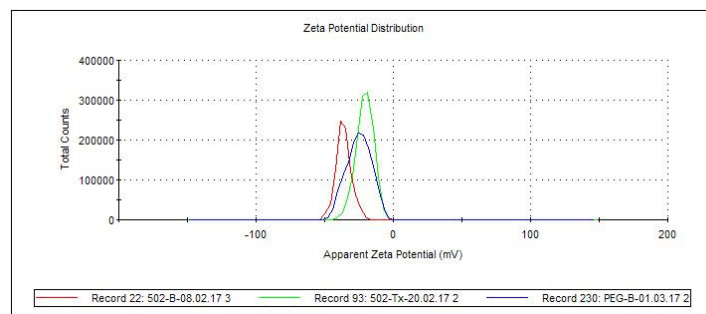


Figura 14. PZ de NPs 502 blancas y cargadas y NPs PEGiladas blancas

4.1.2. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas bioconjugadas con trastuzumab

En el presente estudio se conjugaron los tres tipos de NPs elaboradas (502, 504, PLGA-PEG) blancas y cargadas. Se estudió la eficacia de bioconjugación variando la cantidad inicial de NPs a conjugar (5, 15, 35 mg) con una cantidad fija de trastuzumab (1360 µg). Posteriormente, y como veremos a continuación, el ensayo continuó conjugando 35 mg de NPs con el doble de cantidad del anticuerpo ensayado anteriormente (2720 µg), por lo que empezaremos comparando la primera variable que son las cantidades de NPs para después discutir el por qué doblar la cantidad de anticuerpo.

4.1.2.1. Tamaño y distribución de tamaños (Pdl)

Con objeto de conocer las características de las NPs modificadas superficialmente mediante bioconjugación con el anticuerpo trastuzumab según la metodología descrita en el apartado 3.2.2, éstas fueron caracterizadas según la metodología descrita en el apartado 3.2.3.1, a fin de determinar el tamaño medio de las partículas y su índice de polidispersión.

Era de esperar que el tamaño de las partículas después de ser conjugadas con trastuzumab aumentase, debido al tamaño de dicho anticuerpo (~148 kDa, ~9nm) (Nebija et al., 2014).

A continuación, las figs. 15, 16 y 17 muestran las variaciones de tamaño y PDI de las diferentes formulaciones ensayadas.

En la fig. 15, se muestran los resultados obtenidos tras la conjugación de partículas elaboradas con Resomer® 502, blancas o cargadas.

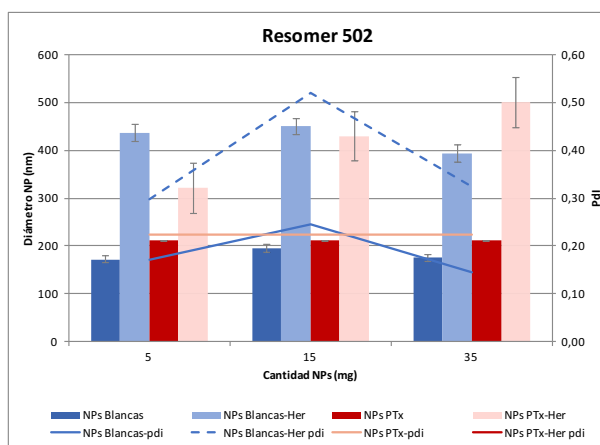


Figura 15. Tamaños y Pdl de partículas elaboradas con Resomer® 502

En el caso de NPs blancas podemos observar un aumento de tamaño considerable tras el proceso de conjugación, pasando de valores 170 a 450 nm, aproximadamente. Esto podría traducirse en una elevada eficacia de unión del anticuerpo a la superficie de la partícula.

En cuanto a las NPs cargadas, podemos observar que el aumento tamaño ocurre en menor grado, aunque sigue siendo importante, pasando de valores de 211 a 400 nm, aproximadamente cuando se parte de 5 ó 15 mg de NPs.

Vemos que el tamaño de las partículas, aunque son iguales en un principio aumentan a medida que aumenta la cantidad de partículas ensayadas, alcanzando el máximo tamaño a los 35 mg en las NPs PTX (500 nm). Esto puede deberse a un aumento de la conjugación del anticuerpo o también a un aumento de la agregación de las NPs, ya que al tener grupos carboxilo en la superficie y el anticuerpo tener carga positiva, tienden a atraerse las NPs conjugadas entre sí formando agregados.

Respecto a los valores de Pdl, podemos observar que el índice más alto se obtiene cuando se emplean 15 mg de NPs blancas, alcanzándose un dato de 0.5. Este mayor aumento en la dispersión del tamaño podría explicarse por la formación irregular de agregados de partículas producida por la atracción de las NPs (agregados heterogéneos).

De igual modo, al ensayar 35 mg de NPs se producen agregados, pero poseen un Pdl menor. Esto podría traducirse también en la formación de acúmulos aunque en este caso de forma regular (agregados homogéneos).

A continuación, en la fig. 16, se muestran los resultados obtenidos tras la conjugación de partículas elaboradas con Resomer® 504, blancas o cargadas.

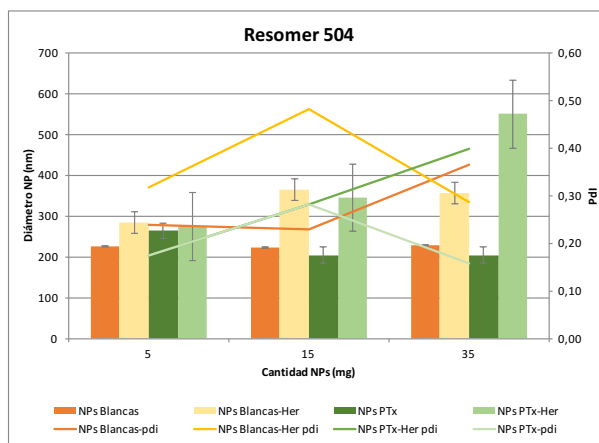


Figura 16. Tamaños y Pdl de partículas elaboradas con Resomer® 504

Las NPs blancas tienen valores de tamaños de ≈ 225 nm una vez conjugadas con el anticuerpo aumentan de tamaño como es de esperar, pasando a valores de 360 nm, aproximadamente.

Como podemos observar, las cantidades de 5 y 15 mg aumentan de tamaño según lo esperado. En cuanto a 35 mg podemos observar que en las NPs cargadas se produce un gran aumento de tamaño, llegando a diámetros de 550 nm debido a la formación de agregados.

Respecto a los Pdl, podemos observar que el Pdl más elevado es de un valor de 0.48 cuando se emplean 15 mg de NPs, tal y como sucede en el caso anterior este mayor aumento en la dispersión del tamaño podría explicarse por la formación irregular de agregados de partículas producida por la atracción de las NPs (agregados heterogéneos).

La formación de estos agregados cuando se emplean cantidades superiores de partículas podría explicarse por la elevada concentración de partículas en el medio de conjugación. El volumen de medio de reacción permaneció constante, por lo que a mayor concentración de partículas, si estas no presentan valores de PZ suficientemente elevados, tenderán a formar agregados de partículas.

Por último, en la fig. 17 se muestran los resultados obtenidos tras la conjugación de partículas elaboradas con PLGA-PEG, blancas o cargadas.

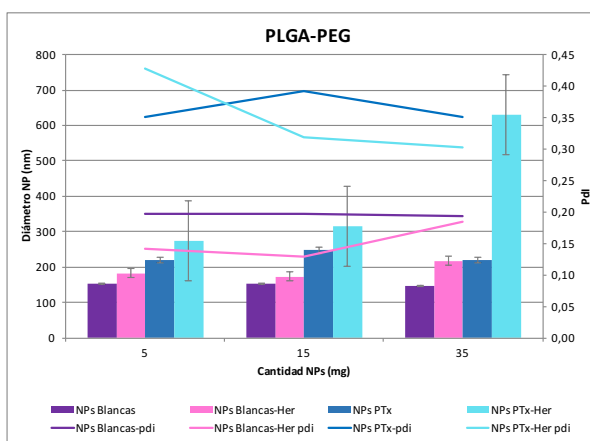


Figura 17. Tamaños y Pdl de partículas elaboradas con PLGA-PEG

Las NPs blancas tienen valores de 150 nm aproximadamente, pasando a valores medios de 200 nm una vez conjugadas con el anticuerpo.

En la gráfica podemos apreciar que el aumento de tamaño tras el proceso de conjugación no es tan notorio como en los dos casos anteriores. Observamos que tanto en las partículas blancas como en las cargadas, el aumento se produce en la misma medida

prácticamente, a excepción del polímero PLGA-PEG cargado con fármaco, en la condición de 35 mg.

En este caso concreto podemos observar un aumento notable del tamaño. Al igual que en los casos anteriores a mayor concentración de partículas, si estas no presentan valores de PZ suficientemente elevados, tenderán a formar agregados de partículas.

Respecto a los Pdl observamos de igual forma que en los dos anteriores que el valor más alto se sitúa a los 15 mg de NPs. El resto de partículas tienen valores de Pdl menores, asegurando una distribución de tamaño homogénea.

4.1.2.2. Carga eléctrica superficial: potencial zeta (PZ)

Siguiendo la metodología del apartado 3.2.3.2, se determinó la carga eléctrica superficial para las NPs bioconjugadas con Herceptin®. Teóricamente, se espera que el PZ se vaya haciendo menos negativo a medida que aumente el número de moléculas de anticuerpo en la superficie de las NPs debido a la ocupación de los grupos carboxilo de las partículas por éste. El valor máximo de PZ obtenido, podría ser indicativo de dos situaciones: (i) que se ha alcanzado la saturación de grupos carboxilos disponibles y/o (ii) se ha alcanzado una situación de saturación de la superficie disponible en la partícula por impedimento estérico.

Los valores obtenidos se muestran en la fig. 18. Como podemos observar, la conjugación producida utilizando 5 ó 15 mg de NPs, independientemente del tipo de polímero empleado, pasaron de ser altamente negativos (-32 mV) a valores notablemente positivos (promedio de +13 mV), alcanzando el máximo PZ en los 15 mg de NPs ensayadas con el polímero 504-PTX, con un valor de +20 mV. Estos resultados son indicativos de que el proceso de bioconjugación ha sido satisfactorio en las condiciones y método ensayado.

Cuando se emplean 35 mg de NPs, podemos ver en la fig. 20 que los valores de PZ tras la conjugación continúan siendo negativos, aproximadamente de -35 a -10 mV para partículas elaboradas con Resomer® 504. En el caso de partículas de Resomer® 502 tanto blancas como cargadas se obtuvieron valores de PZ de +11 mV. En el caso de partículas de PLGA-PEG los valores de PZ varían de -29 a -0.35 mV, alcanzándose valores de PZ cercanos a la neutralidad.

Esto puede interpretarse del siguiente modo: la cantidad de anticuerpo inicial de 1360 µg no es suficiente para saturar todos los grupos carboxilo presentes en la superficie correspondiente a 35 mg de NPs de 504 o PLGA-PEG. De forma que al quedar aún grupos carboxilo libres, el PZ sigue teniendo un signo negativo.

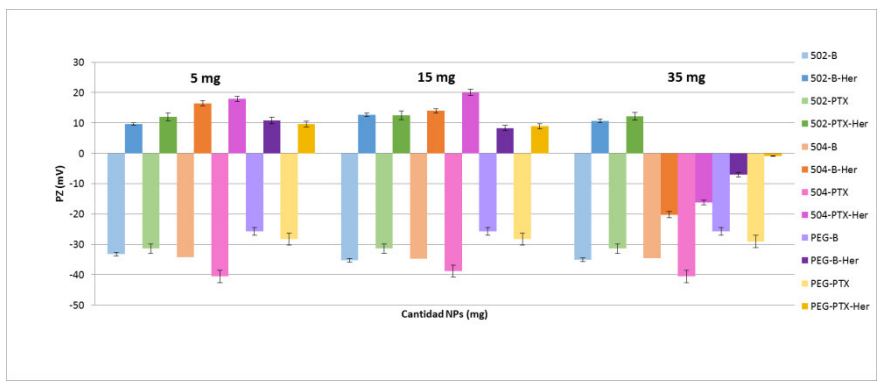


Figura 18. Potenciales zeta ensayados de las distintas formulaciones de NPs con 1360 µg de Herceptin®

Esto se corroborará en el siguiente apartado con la discusión de los resultados eficacia de conjugación.

Esto nos llevó a conjugar la cantidad de 35 mg de NPs con el doble de cantidad de Herceptin®. Los resultados obtenidos se resumen a continuación (ver fig. 19).

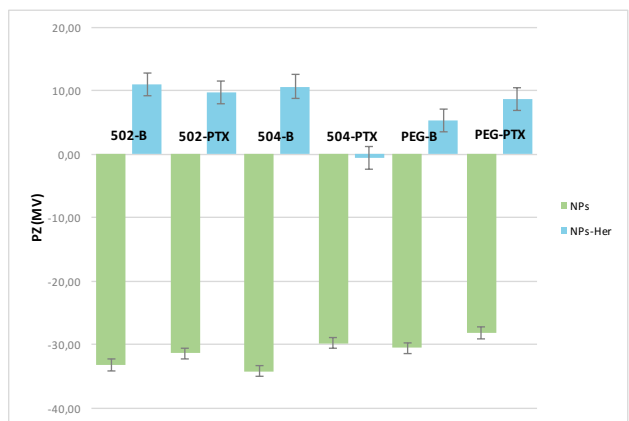


Figura 19. Potenciales zeta ensayados con 35 mg de NPs y 2720 µg de Herceptin®

Como podemos observar en la fig. 19, al duplicar la cantidad de anticuerpo el PZ cambia de signo haciéndose positivo (504-B, PLGA-PEG-B y PLGA-PEG-PTX) o cercano a la neutralidad (504-PTX), indicando que se ha conseguido aumentar la cantidad de anticuerpo sobre la superficie de las partículas. Las partículas elaboradas con Resomer® 502, mantuvieron su valor de PZ (+11 mV).

4.2. Eficacia de bioconjugación con trastuzumab

Una vez obtenidas las partículas nanométricas modificadas superficialmente mediante conjugación con trastuzumab y caracterizadas por su tamaño y potencial zeta, se procedió a evaluar la eficacia del proceso. Para ello, se llevó a cabo una cuantificación del anticuerpo libre por medio de una cromatografía líquida de alta resolución por exclusión de tamaño (HPLC-SEC), según la metodología del apartado 3.2.3.3.

Se estableció un recta de calibrado en el intervalo de concentraciones de 0.09 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Obteniéndose la siguiente ecuación: $y = 389303x - 7425,1$ con un R^2 de 0.99968.

Para cuantificar la cantidad de anticuerpo conjugado sobre las partículas, se llevó a cabo una cuantificación indirecta. Para ello, se centrifugaron las NPs ya conjugadas durante 45min a 10.500 rpm, y posteriormente se filtró el sobrenadante que se analizó por HPLC-SEC. De este modo se cuantificó la cantidad de anticuerpo no conjugada. Por diferencia, se puede obtener la cantidad conjugada que se expresó como Eficacia de Conjugación (EC%) (fig. 20).

Previamente a este estudio, se hizo un estudio de adsorción del anticuerpo sobre distintas membranas, utilizando para ello: (i) Arcodisc® nylon 0.45 μm , (ii) GHP Arcodisc® (polipropileno) 0.2 μm , (iii) Millex® GV (PVDF) 0,22 μm (fig. 20). Este ensayo se realizó con el objeto de reducir las pérdidas de anticuerpo por adsorción inespecífica del mismo en los filtros empleados.

De este modo se determinó que los filtros utilizados Millex®GV de PVDF, presentaron menor absorción del anticuerpo desde el sobrenadante.

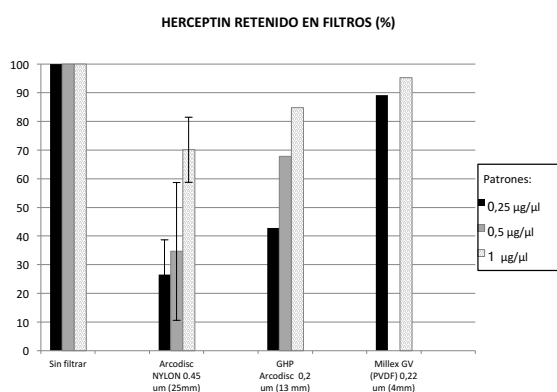


Figura 20. Gráfica comparativa del % de retención de Herceptin® en diferentes filtros

Los resultados de EC% obtenidos se recogen en el siguiente gráfico:

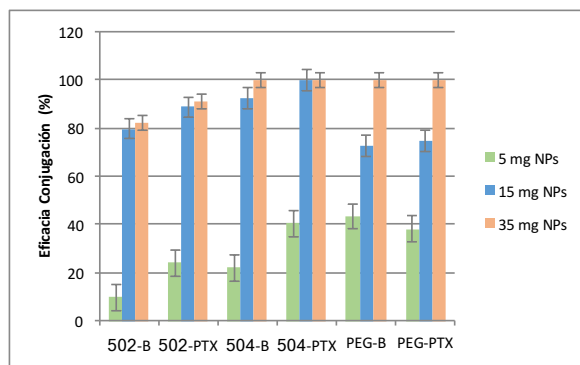


Figura 21. Eficacia de conjugación de trastuzumab (1360 µg) sobre la superficie de las NPs empleando diferentes cantidades (5, 15 ó 35 mg)

Como podemos observar, la EC% aumenta a medida que aumenta la cantidad de NPs ensayadas, siendo mayor el porcentaje de conjugación en las partículas cargadas de fármaco, ya que, como hemos expuesto antes, las NPs cargadas podrían presentar cierta cantidad de fármaco en la superficie, pudiendo interactuar de forma inespecífica con el anticuerpo quedando este adsorbido en la superficie de las partículas por fuerzas intermoleculares de tipo débil (Martín-Banderas et al., 2015).

Cuando se emplearon 5 mg de NPs, los valores de EC fueron de 10-43% para todas las formulaciones. En este caso, como se ha expuesto anteriormente, se obtuvieron valores de PZ positivos tras el proceso de conjugación. Esto indica que los grupos carboxilos han sido ocupados por el anticuerpo y que estamos en una situación de exceso del mismo, por lo que los valores de EC% son menores que en el caso de 15 mg, por ejemplo.

Esta EC% aumenta al emplear 15 mg, llegando a valores máximos del 100% en el caso del 504-PTX, y del 92.4% en el 504 blancas. Esto puede explicarse debido a que este polímero presenta el mayor peso molecular y por lo tanto mayor cantidad de grupos carboxilo disponibles en su estructura química.

Cuando se emplearon 35 mg de NPs, se puede observar para las formulaciones de 504 y PLGA-PEG se obtuvieron valores de EC% del 100%. Estas formulaciones presentaron valores de PZ negativos tras el proceso de conjugación con 1360 µg de anticuerpo. En el caso de formulaciones de 502 se observa un porcentaje de EC menor, del 82-93%, no alcanzándose el 100%. Estas formulaciones presentaron valores de PZ positivos tras el proceso de conjugación.

Dado que para las formulaciones de 504 y PLGA-PEG presentaron EC% del 100% y mantuvieron valores de PZ negativos, se procedió a duplicar la cantidad de anticuerpo. Se incluyó la formulación 502 como control.

Los resultados obtenidos se recogen en la fig. 22, donde podemos observar que para las formulaciones de 502 la EC% disminuyó como era de esperar ya que para la cantidad inicial de anticuerpo presentaron valores positivos máximos de PZ de $\approx +11$ mV tal como se recoge en la fig. 18.

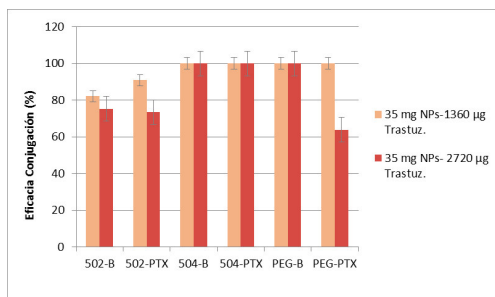


Figura 22. Eficacia de conjugación ensayada con 35 mg de NPs y 2720µg de trastuzumab.

Para las formulaciones de 504, blancas y cargadas, la EC% no disminuyó y los valores de PZ pasaron a ser positivos o cercanos a la neutralidad indicando que la cantidad de anticuerpo sobre la superficie de la partícula era mayor.

Para las formulaciones de PLGA-PEG blancas la EC% no disminuyó, sin embargo para la cargada la EC% disminuyó del 100% al 64%. En ambos casos los valores de PZ cambian de signo haciéndose positivos tal como se indica en la fig.19. En este caso y a diferencia de lo explicado anteriormente, la presencia conjunta de cadenas de PEG y fármaco en la superficie de la partícula puede traducirse en una disminución de la EC% por posibles fenómenos de impedimento estérico.

A modo de ejemplo, en la fig. 23 se muestra la distribución de tamaño de NPs antes y después del proceso de bioconjugación con Herceptin®.

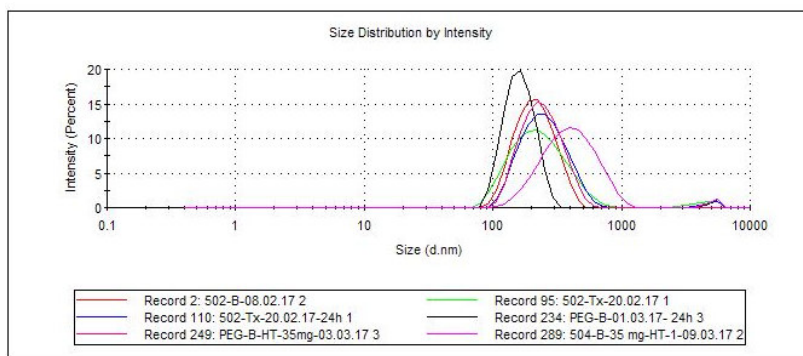


Figura 23. Distribución de tamaño antes y después de conjugar NPs 502 blancas y cargadas, y PLGA-PEG con Herceptin®

Para finalizar, se estimó la densidad de anticuerpo en la superficie de las partículas siguiendo la siguiente ecuación (Wu et al., 2014; Saha et al., 2014):

$$n = \frac{NA \times \frac{m1}{M}}{\frac{m2}{\rho} \div \frac{4}{3} \pi \left(\frac{D}{2}\right)^3}$$

Donde:

- NA:** nº Avogadro
- m1:** peso de anticuerpo
- m2:** peso de NPs
- M:** peso molecular anticuerpo
- ρ:** densidad de las Nps (estimado 1.2 g/L)
- D:** diámetro de las NPs (considerado 200 nm)

Obteniéndose valores aproximados de entre 150 y 3000 moléculas de anticuerpo por cm².

5. CONCLUSIONES

Como se indicó en el apartado de objetivos, este Trabajo de Fin de Grado se centra en la síntesis de NPs de PLGA, portadoras de PTX, y su posterior funcionalización con el anticuerpo monoclonal trastuzumab selectivo del receptor HER2 para el tratamiento del cáncer de mama HER2+.

Para conseguir dicho objetivo, se plantearon una serie de objetivos parciales en base a los cuales se han estructurado las conclusiones obtenidas en este trabajo, y que se exponen a continuación.

1. Se han sintetizado, por medio del método NPP, partículas nanométricas monodispersas a base del polímero PLGA, obteniendo tamaños en el intervalo de 150 – 230 nm y distribuciones de tamaños estrechas y reproducibles ($PDI < 0.35$). Siendo las NPs PEGiladas las de menos tamaño por lo que podrían tener facilitada su absorción, evitar ser reconocidas por los macrófagos, y así, alcanzar su objetivo, el tumor, de forma más exitosa.
2. Se ha encapsulado el fármaco anticanceroso PTX a una concentración del 12.5% p/p, obteniendo partículas estables y con distribuciones de tamaños estrechas y reproducibles.
3. Se ha puesto a punto un método para la funcionalización de la superficie de la NP por medio de un proceso de bioconjugación con un anticuerpo monoclonal humanizado, trastuzumab.
4. El método e funcionalización ha resultado ser altamente eficaz y reproducible. En cuanto a la optimización de este proceso, se ha determinado que para una cantidad de 35 mg de NPs la eficacia de conjugación del proceso es del 100%. Así como destacar el Resomer® 504 por ser el que más grupos carboxilo tiene libres, permitiendo así ligar más cantidad de anticuerpo y, por lo tanto, una mayor selectividad por el tumor.

En resumen, en base a los resultados obtenidos, podemos afirmar que en el presente trabajo se ha bioconjugado exitosamente el anticuerpo trastuzumab a NPs sintetizadas de PLGA conteniendo PTX. Estos métodos tanto de encapsulación como de bioconjugación sirven de plataforma para futuros activos y/o biomoléculas, pudiendo así tratar distintos patologías.

AGRADECIMIENTOS

C. Romero agradece al grupo de investigación de la Profa. Mercedes Fernández Arévalo la oportunidad de trabajar en esta línea de investigación.

BIBLIOGRAFIA

- Abraham SA, Waterhouse DN, Mayer LD, Cullis PR, Madden TD, Bally MB. The liposomal formulation of doxorubicin. *Methods Enzymol.* 2005; 391(SPEC. ISS.):71–97.
- Astete, C. E., Sabliov, C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer.* 2006; 17(3): 247-289.
- Bawarski N, Chidlowsky E, Bharali DJ, Mousa SA. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomed Nanotech Biol Med.* 2008; 4:273-282.
- Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64(SUPPL.):206–12.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54(5):631–51.
- Dinarvand R, Sepehri N, Manoochehri S, Rouhani H, Atyabi F. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int J Nanomedicine.* 2011; 6:877–95.
- Dong Y, Feng SS. Poly(d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles prepared by high pressure homogenization for paclitaxel chemotherapy. *International Journal of Pharmaceutics.* 2007; 342: 208–214
- Feng SS, Mu L, Win KY, Huang G. Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel. *Current Medicinal Chemistry.* 2004; 11:413-24.
- Ferrari M. Ciclo de conferencias y debates en ciencias. Revolución nanotecnológica: Estado actual de las aplicaciones prácticas y avances de la Nanociencia: desde las aplicaciones robóticas-biomédicas a las energéticas. Ciclo de conferencias y debates en ciencias. Fundación Ramón Areces. 2010.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Amoury N, Benita S. *Int. J. Pharm.* 1989; 113:r1–r4.
- Feynman R. There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics. California Institute of Technology. *Engineering and Science magazine.* 1960.
- Fu Y, Li S, Zu Y, Yang G, Yang Z, Luo M, Jiang S, Wink M, Efferth T. Medicinal chemistry of paclitaxel and its analogues. *Current Medicinal Chemistry.* 2009; 16:3966-3985.
- Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomat Sci.* 2007; 18:241-68.

- Kingsdon D.G.I. Taxol, a molecule for all seasons. *Chemical Communications*. 2001; 867-880.
- Martín-Banderas L, Álvarez-Fuentes J, Durán-Lobato M, Prados J, Melguizo C, Fernández-Arévalo M, Holgado M.A. Cannabinoid derivate-loaded PLGA nanocarriers for oral administration: formulation, characterization and cytotoxicity studies. *Int J Nanomed*. 2012; 7: 5793-5806.
- Martín-Banderas L, Muñoz-Rubio I, Álvarez-Fuentes J, Durán-Lobato M, Arias JL, Holgado MÁ, et al. Engineering of $\delta 9$ -tetrahydrocannabinol delivery systems based on surface modified-PLGA nanoplatfoms. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014; 123:114–22.
- Martín-Banderas L, Muñoz-Rubio I, Prados J, Álvarez-Fuentes J, Calderón-Montaña JM, López-Lázaro M, et al. In vitro and in vivo evaluation of $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol/PLGA nanoparticles for cancer chemotherapy. *Int J Pharm* [en línea]. 2015; 487(1–2):205–12. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517315003622>
- Mi, Y., Liu, X., Zhao, J., Ding, J., Feng, S.-S. Multimodality treatment of cancer with herceptin conjugated, thermomagnetic iron oxides and docetaxel loaded nanoparticles of biodegradable polymers. *Biomaterials* 2012; 33, 7519–7529.
- Micha JP, Goldstein BH, Birk L, Rottenmeier MA, Brown JV, III. Abraxane in the treatment of ovarian cancer: The absence of hypersensitivity reactions. *Gynecologic Oncology*. 2006; 100:437–438.
- Miele E, Spinelli GP, Miele E, Tomao F y Tomao S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*. 2009; 4:99–105.
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*. 2010; 385(1–2):113–42.
- Nebija D, Noe CR, Urban E, Lachmann B. Quality control and stability studies with the monoclonal antibody, trastuzumab: Application of 1D-vs. 2D-Gel electrophoresis. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(4):6399–411.
- Organización Mundial de la Salud. (<http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>), [disponible en línea] (consultado en junio 2017)
- Polo E, Puertas S, Moros M, Batalla P, Guisán JM, Fuente JM De, et al. Immobilization of Enzymes and Cells. 2013;1051:149–63.
- Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, and Fuchs H. Nanomedicine—

- Challenge and Perspectives *Angewandte Chemie International*. 2009; 48:872–897.
- Saha B, Evers TH, Prins MWJ. How antibody surface coverage on nanoparticles determines the activity and kinetics of antigen capturing for biosensing. *Anal Chem*. 2014;86(16):8158–66.
- Samitier, J. (2005). Presentación del Lanzamiento Público de la Plataforma Española de Nanomedicina (<http://www.nanomedspain.net>).
- Sociedad Española de Oncología Médica. Las Cifras del Cáncer en España 2016. *Soc Española Oncol Médica*. 2016; 1–20.
- Sparreboom A, Scripture CD, Trieu V, Williams PJ, De T, Yang A, Beals B, Figg WD, Hawkins M, Desai N. Comparative, preclinical and clinical pharmacokinetics of a cremophor-free, nanoparticles albumin-bound paclitaxel (ABI-007) and paclitaxel formulated in cremophor (taxol). *Clinical Cancer Research*. 2005; 11:4136–4143.
- Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. 2007; 2:16.
- Torchilin VP. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci*. 2000; 11(2): 81-91
- Wu J, Zhao J, Zhang B, Qian Y, Gao H, Yu Y, et al. Polyethylene glycol-poly(lactic acid) nanoparticles modified with cysteine-arginine-glutamic acid-lysine-alanine fibrin-homing peptide for glioblastoma therapy by enhanced retention effect. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(1):5261–71.
- Yu K, Zhao J, Zhang Z, Gao Y, Zhou Y, Teng L, et al. Enhanced delivery of Paclitaxel using electrostatically-conjugated Herceptin-bearing PEI/PLGA nanoparticles against HER-positive breast cancer cells. *Int J Pharm*. 2016; 497(1–2):78–87.
- Zhao L, Feng S. Enhanced oral bioavailability of paclitaxel formulated in vitamin E-TPGS emulsified nanoparticles of biodegradable polymers: In vitro and in vivo studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010; 99(8): 3552-3560.
- Zhao, J., Feng, S.-S. Effects of PEG tethering chain length of vitamin E TPGS with a Herceptin-functionalized nanoparticle formulation for targeted delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 2014; 35, 3340–3347.

ANEXO

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

NPs	NPs
PLGA	Poli (D,L-lactida-co-glicólico)
PEG	Polietilenglicol
NPP	Nanoprecipitación
FA	Fase acuosa
FO	Fase orgánica
PTX	Paclitaxel
HER	Herceptin®
FDA	Food and Drug Administration
PdI	Índice de polidispersión
PZ	Potencial zeta
DE	Desviación estándar
HPLC	High performance liquid chromatography