

# Sistemas nanoparticulados de vehiculización de fármacos: transportador vs fármaco

Este artículo nos fue provisto por el Dr. Dante Beltramo

Alasino RV<sup>1</sup>, Leonhard V<sup>2</sup>, Garro AG<sup>3</sup>, Beltramo DM<sup>4</sup>

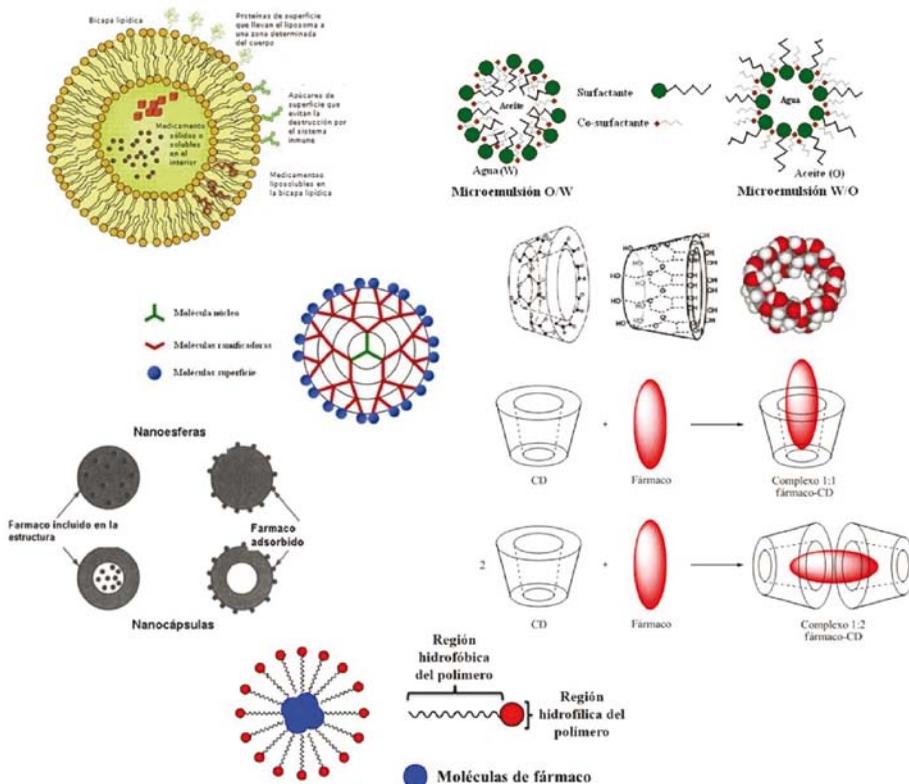


El Dr. Dante Miguel Beltramo, es Bioquímico y Dr. En Bioquímica por la Universidad Nacional de Córdoba. Es Miembro de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico, Categoría PRINCIPAL, e Investigador Superior y Responsable de la Unidad de Biotecnología del CEPROCOR. Ejerce además como Profesor Titular de Biotecnología y participa como Miembro del Comité Científico Académico de la Fac. de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba. Ha efectuado numerosas publicaciones y participado en numerosos conferencias y congresos científicos nacionales e internacionales. Además ha colaborado en la edición de libros de su especialidad. Ha sido y es Director de Tesis Doctorales y/o de Becarios e Investigadores del CONICET. Sus trabajos de investigación le han permitido obtener dos patentes nacionales, tres internacionales y al momento se encuentran en trámite otras ocho patentes.

La eficacia terapéutica de un fármaco está condicionada por muchos factores, dentro de los cuales la solubilidad y el acceso al sitio de acción juegan un rol primordial [1]. Se estima que aproximadamente el 40% de los medicamentos que se encuentran actualmente en el mercado y cerca del 90% de las moléculas en desarrollo presentan baja solubilidad en agua [2,3]. Así, las propiedades de solubilidad de los compuestos continúa siendo uno de los mayores obstáculos en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos.

Estudios recientes muestran que el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas no es suficiente por sí mismo para alcanzar la excelencia terapéutica. En tal sentido, la mejora en la formulación de medicamentos existentes, mediante nuevas formas de dosificación, cambio de formas de los medicamentos (éster /sal), profármaco/metabolito activo, diferentes rutas, etc., está ganando mercado en la industria farmacéutica que además se enfrenta a la falta de innovación en nuevas moléculas [4].

Figura 1. Representación esquemática de distintas nanoestructuras



Una de las estrategias más utilizadas en relación a este tema es la administración de drogas a través de transportadores y, más específicamente el desarrollo de sistemas de administración de nanomedicamentos. Durante las dos últimas décadas de investigación, múltiples sistemas de administración de fármacos han sido evaluados, tanto para la vehiculización de drogas hidrofílicas como hidrofóbicas, como: liposomas, microemulsiones, ciclodextrinas, dendrímeros, nanopartículas y micelas. La Figura 1 muestra una representación esquemática de algunos de estos sistemas.

Dentro de este grupo, las nanopartículas (poliméricas, lipídicas y proteicas) han recibido mayor atención debido a la mayor estabilidad y oportunidad de modificaciones adicionales de la superficie [5,6].

Otra de las características de estos sistemas es que filtran preferentemente en tejidos tumorales,

Be sure. **testo**



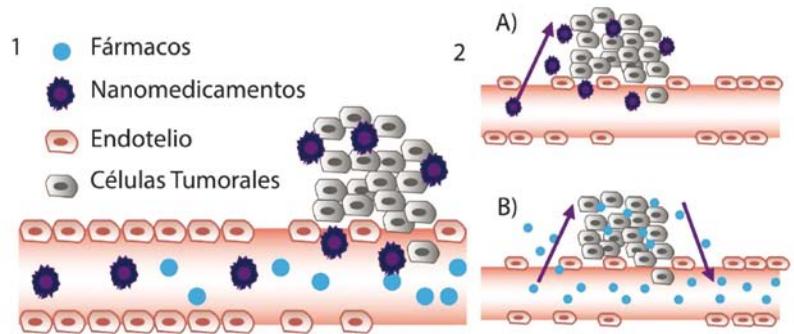
## Medición, registro y emisión de alarmas **Testo Saveris**

- Integración de sondas de temperatura y humedad, así como transmisores de cualquier otra variable (ej. Presión diferencial en salas limpias - punto de rocío en aire comprimido).
- Combinación de sensores inalámbricos o Ethernet en un mismo sistema.
- Operación autónoma, segura y eficiente.
- Emisión de alarmas al superar valores límite, en forma sonora, óptica, SMS y/o e-mail.
- Opción de soft de cumplimiento CFR21 parte 11.

[www.testo.com.ar/saveris](http://www.testo.com.ar/saveris)

**Nuestro laboratorio de calibración y servicio técnico ofrece y garantiza un soporte adecuado y permanente.**

**Figura 2. Esquema del efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR). Diferencias entre tejidos normales y tumorales que explican la acumulación pasiva de nanotransportadores debido al efecto EPR, células endoteliales desorganizadas separadas por espacios de 200 a 600 nm.**



**El descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas no es suficiente por sí mismo para alcanzar la excelencia terapéutica.**

sitios de inflamación y sitios de infección a través de vasos permeables y luego se retienen en el lugar debido a la reducción del drenaje linfático.

Este proceso se conoce como el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR). Una vez allí, las nanopartículas pueden actuar como un depósito local de medicamentos, dependiendo de la composición del portador, proporcionando un suministro continuo del compuesto terapéutico en el sitio de la enfermedad (Figura 2).

En el laboratorio de Biotecnología de CEPROCOR, trabajamos en proyectos de nanotecnología orientados a la vehiculización inteligente de fármacos. Para lograr este objetivo, elegimos trabajar con micelas. Si bien las micelas han existido durante décadas, no fue hasta tiempos más recientes que estas partículas se comenzaron a estudiar como sistemas de administración de fármacos, siendo actualmente uno de los principales actores en la investigación de nanopartículas. Las micelas son estructuras formadas por moléculas anfifílicas en medios acuosos. Los monómeros que constituyen la micela se organizan de manera tal que los grupos polares quedan en la superficie y las zonas apolares inmersos en el interior de la micela, disposición que reduce al mínimo el contacto entre el agua y las regiones hidrofóbicas lo que permite la solvatación de los grupos de las cadenas polares. La formación de las micelas es un proceso cooperativo, el ensamblaje de unas pocas moléculas no puede proteger las colas hidrófobas del contacto con el agua; en consecuencia, las disoluciones acuosas de anfífilos no integran micelas hasta que su concentración no sobrepasa un valor, la concentración micelar crítica (CMC), por encima del cual casi todo el anfífilo adicional se agrega a las estructuras. El equilibrio anfífilo-micela es de tipo dinámico, es decir, que existe un intercambio permanente de moléculas entre las micelas y la fase acuosa.

Las micelas constituyen un método eficiente para la entrega de fármacos poco solubles en agua [7], y su utilidad es aplicable en particular a los agentes quimioterapéuticos [8]. Las micelas, dado su tamaño (<100 nm) son capaces de penetrar en el tejido afectado (tumores, inflamación, etc.) de manera selectiva por el efecto EPR para conseguir concentraciones más altas, y permanecer durante tiempos más prolongados que las formas de dosificación regulares, con lo cual reduce las dosis requeridas del fármaco [9-10]. Algunos procesos corporales normales también juegan un papel en

la permeabilidad del fármaco y la retención, el sistema reticuloendotelial (RES), compuesto de monocitos y macrófagos, es responsable “del recubrimiento y la limpieza de las células viejas, restos celulares diversos, sustancias extrañas, y patógenos de la sangre” [11,12]. Las micelas son capaces de evitar la opsonización por el RES y lograr tiempos de circulación más largos, lo que permite una mayor permeabilidad a los tejidos y una mayor respuesta terapéutica. Además, presenta ventajas adicionales en relación a las drogas que transporta, no solo protegiendo al fármaco incorporado manteniéndolo aislado del ambiente acuoso externo y evitando así procesos de hidrólisis y degradación enzimática, sino también por el hecho de reducir la toxicidad y demás efectos adversos de los fármacos, aumentar la permeabilidad de los mismos a través de las barreras fisiológicas y favorecer su biodistribución en el organismo.

Por otra parte, las micelas pueden ser direccionadas mediante la unión química de moléculas específicas en su superficie.

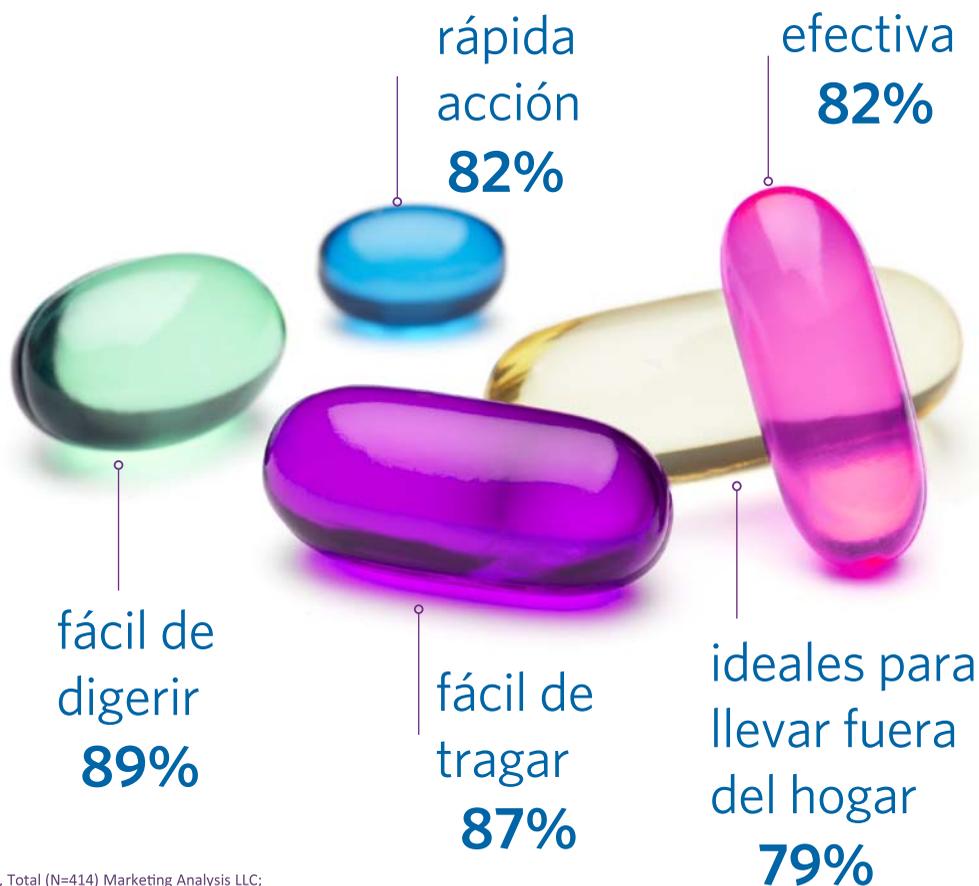
**Las micelas constituyen un método eficiente para la entrega de fármacos poco solubles en agua.**

En este último caso, la liberación local de la droga libre desde las micelas en el órgano objetivo debería llevar a un aumento de la eficacia de la misma. Algunas de estas estructuras pueden ser diseñadas de tal manera que puedan ser activadas por cambios en el pH del medio ambiente, por estímulos químicos, mediante la aplicación de un campo magnético rápidamente oscilante, o por aplicación de una fuente de calor externa [13,14].

Las micelas a base de polímeros han sido el foco principal de los investigadores en los últimos años. El uso de micelas preparadas a partir de copolímeros anfífilos para la solubilización de fármacos poco solubles ha atraído gran atención [15,16]. Las micelas poliméricas a menudo son más estables en comparación con las micelas preparadas a partir de los detergentes convencionales (tienen menor valor CMC), algunos co-polímeros anfífilos tienen valores de CMC tan bajos como  $10^{-6}$  M [17], que es aproximadamente dos órdenes de magnitud menor que la de los agentes tensioactivos tales como Tween 80. No obstante, la obtención de micelas poliméricas continúa siendo un proceso engorroso y muchas veces costoso.

Nosotros comenzamos trabajando inicialmente con micelas de gangliósidos, lípidos mayoritarios del sistema nervioso. Los gangliósidos o sialoglicoesfingolípidos, son glucolípidos que contienen un dominio hidrofóbico compuesto por una

## las cápsulas blandas de gelatina son asociadas con los siguientes atributos



% de Acuerdo, Total (N=414) Marketing Analysis LLC;  
OTC/VMS Delivery Forms Study 2009

productos innovadores. comercialización más rápida.  
suministro confiable.

Como líder innovador en formulación y fabricación de cápsulas blandas, Catalent respalda el éxito y el crecimiento de negocios de sus clientes con una red de 3 plantas de fabricación en América Latina.

ceramida (ácido graso + esfingosina) unidos a través de un enlace glicosídico a cabezas polares grandes formadas por unidades de oligosacáridos cargadas negativamente con una o más unidades de ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico, que adoptan su nombre dependiendo de la cantidad y ubicación de los mismos en la molécula. Los gangliósidos se auto-ensamblan espontáneamente en solución acuosa, aquellos con cabeza polar pequeña, tales como GM3 y GM4, forman vesículas; mientras que aquellos que poseen cabezas polares más complejas, con tres azúcares o más y una o más moléculas de ácido siálico, mono-di o tri-sialoglicoesfingolípidos (GM2, GM1, GD, GT), forman micelas con un bajo valor de CMC, entre  $10^{-10}$ - $10^{-8}$  M, son justamente estos lípidos con los que realizamos nuestros estudios. Estas características de las micelas de gangliósidos le otorgan ventajas significativas al sistema, el auto-ensamble espontáneo simplifica enormemente la preparación y carga de las micelas y su extremadamente baja concentración micelar crítica (CMC) determina que el equilibrio monómero-micela se desplace hacia la forma agregada cuando se encuentra cargada con algún fármaco, lo cual evita el problema de inestabilidad por dilución que presentan otros tipos de micelas, tanto lipídicas como poliméricas que tienen una CMC en el orden de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  [18]. Por otra parte, el tamaño de las micelas, de entre 10 y 15 nanómetros, les permite evadir una rápida remoción por el sistema retículo endotelial, que captura con mayor facilidad estructuras por encima de los 100 nanómetros. Además, su carga electronegativa les confiere gran estabilidad en solución debido a una fuerte repulsión electrostática.

Otro factor importante a resaltar respecto del uso de los gangliósidos es que al ser constituyentes naturales

del organismo y que ya han sido utilizados en el tratamiento de otras patologías, podría agilizar en gran medida la aprobación de un potencial producto en base a componentes conocidos y ya aprobados.

Los trabajos que realizamos mostraron que las micelas de gangliósidos (GM1) incorporan de forma espontánea fármacos oncológicos con distinta naturaleza polar, hidrofóbicos como los taxanos, e hidrofílicos como la doxorubicina [18,19]. Además, siguiendo un orden específico, las micelas pueden incorporar ambos fármacos en diferentes dominios de la misma estructura. Los complejos GM1-Ptx o GM1-Doxo son estables en solución acuosa, sin que se vea afectada la actividad biológica de el o los fármacos cuando entran en contacto con células susceptibles. Por otra parte, nuestros estudios revelan que estas micelas de GM1 no producen lisis de glóbulos rojos, y tampoco influyen en la actividad plaquetaria, dos factores relevantes a considerar en las propiedades de un transportador. Sin embargo, los complejos GM1-Ptx, o GM1-Doxo interaccionan con albúmina sérica humana (USA Patent 2013/0195924 A1) [20]. Esta asociación resulta muy beneficiosa para una formulación inyectable, y en especial para fármacos oncológicos, ya que existen evidencias de que la albúmina y moléculas asociadas pueden extravasar el endotelio por un mecanismo de transcitocis vía interacción con una gp60 y luego, vía proteínas SPARC, acercarse a las células tumorales que sobre-expresan receptores específicos, lo que permitiría una mayor acumulación de los complejos con albúmina en el sitio específico del tumor. Estudios «in vitro» e «in-vivo» evidenciaron que el Ptx encapsulado en las micelas de GM1 o GM1-albúmina, produce un efecto biológico similar a la formulación comercial de referencia del fármaco.

**A partir de la incorporación del fármaco en el nanocarrier, la farmacocinética y biodistribución del mismo pasan a depender de la naturaleza estructural del nanotransportador.**

El sistema micelar a base de gangliósidos continúa sumando nuevas potencialidades desde distintos enfoques, reportes recientes de Ladish et al [21] exponen al GM1 como modulador del sistema inmune a través de la activación de células inmunosupresoras (MDSC), y más recientemente, el grupo de Wang Y et al.[22], siguiendo el procedimiento por nosotros descrito, demostró que las micelas de GM1 cargadas con Doxorubicina atraviesan barrera hematoencefálica (BHE) y liberan el fármaco de forma efectiva. Este estudio expone un nuevo sistema de nanodelivery, que no solo puede penetrar BHE de manera efectiva, sino que también es capaz



**LABCO**<sup>®</sup>

Laboratorio de Control S.A.

**LABORATORIO DE ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO, MICROBIOLÓGICO Y DE EFLUENTES PARA TERCEROS**

**NUESTROS SERVICIOS**

**NUEVO EQUIPO ICP-OES PRECIO PROMOCIONAL**

- **Espectrofotometría de Absorción Atómica**
- **Espectrofotometría Infrarroja**
- **Microbiología**
- **Ensayos Físicoquímicos**
- **Análisis por Cromatografía Líquida (IR-DAD-UV-FL-COND)**
- **Desarrollo y Validaciones de técnicas analíticas**

- **Análisis de efluentes**
- **Cromatografía gaseosa (Detectores FID,  $\mu$ DCE, DCT)**
- **Tamaño de Partícula (Difracción Laser - Microscopia)**
- **Ensayos Mét. Elisa (Micotoxinas - Gluten)**
- **Análisis de agua (Físicoquímico y Microbiológico S/ Ley - CAA)**

**SERVICIO DE RETIRO DE MUESTRAS EN C.A.B.A. Y GRAN BS. AS.\***

\*Consultar por monto mínimo

**TRABAJAMOS PARA LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA, ALIMENTICIA, COSMÉTICA Y MEDIO AMBIENTE**

HABILITACIONES  
CERTIFICACIONES





Tte. Gral. Guido 1095 (1708) Morón • Bs. As.

Tel.: (54-11) 4483-4494/97 ó 4627-7774 • administracion@labco.com.ar • www.labco.com.ar



## URBANO / DIVISIÓN PHARMA

Capilaridad, tecnología y personalización  
al servicio de la ciencia.

- Distribución de Muestras Biológicas con y sin refrigeración
- Distribución de Ensayos Clínicos
- Warehousing, preparación y distribución de medicamentos
- Distribución de Productos Médicos

URBANO Argentina:  
Casa Central, Ferré 6660 ( CABA ) y más de 60  
sucursales en todo el país. [comercial@urbano.com.ar](mailto:comercial@urbano.com.ar)

[www.urbano.com.ar](http://www.urbano.com.ar)

de reparar los nervios al mismo tiempo. Así, las micelas de GM1 cargadas con fármacos con múltiples funciones presentan un gran potencial para el suministro de fármacos para tratar enfermedades intracraneales como tumores cerebrales y enfermedades neurodegenerativas.

Por otra parte, trabajando en la funcionalización de este mismo sistema mediante la adición de moléculas de reconocimiento específico, logramos obtener micelas de GM1 recubiertas por anticuerpos. El complejo ternario GM1-Droga-IgG presenta una elevada estabilidad y cada uno de los componentes mantiene su funcionalidad, la micela conserva su capacidad de carga y los anticuerpos unidos a la micela reconocen a sus antígenos específicos (presentada la solicitud de patente). Las micelas de GM1-Ac, además de cumplir con los requisitos deseados en un nanotransportador, con todos los beneficios ya mencionados de los gangliósidos, también suma los de los propios anticuerpos *per se*. Este nuevo sistema presenta una gama de potencialidades, ya sea desde la opción de actuar como nanotransportador con direccionamiento preferencial a distintos tejidos, o bien con la alternativa de permitir que los anticuerpos incorporados alcancen sitios a los cuales no accederían sin la estructura transportadora.

Además de las micelas de gangliósidos, recientemente hemos desarrollado otro nanotransportador micelar en base a moléculas complejas con actividad bactericida conocidas como lipoglicopéptidos, aprobados por FDA, ANMAT y EMEA. Estas micelas tienen la capacidad de cargar de forma espontánea y estable drogas hidrofóbicas como Ptx,

Dtx, AmB e Ibuprofeno. Ensayos *in vitro* demostraron que las drogas muestran la misma actividad que los respectivos controles de fármaco libre (Patente: W02016120824A1). En este sistema en particular, las características propias de los lipoglicopéptidos aportan propiedades adicionales a las de un simple nanocarrier, como la potencialidad de sumar su actividad como antibiótico así como la de alcanzar altas concentraciones durante períodos de tiempo prolongados dado su elevado tiempo de vida media. Por otra parte, otra característica importante de estos antibióticos es su distribución preferencial a ciertos tejidos como piel, pleura y huesos, algunos de ellos de difícil acceso a los medicamentos tradicionales. Además, alcanza altas concentraciones en riñón, pulmones, glándulas suprarrenales y también en glóbulos blancos, lo que los hace atractivos para el tratamiento de cierto tipo de tumores.

En el marco de lo expuesto en este breve resumen, surge uno de los grandes interrogantes de la nanotecnología actual, la relevancia del nanocarrier en la performance de un medicamento nanotecnológico. A partir de la incorporación del fármaco en el nanocarrier, la farmacocinética, biodistribución y el tráfico intracelular del principio activo se independizan de su estructura química y pasan a depender de la naturaleza estructural del nanotransportador. No obstante, resulta imposible disociar el efecto beneficioso de ambos componentes, por lo tanto, debemos pensar en obtener un efecto sinérgico entre las distintas moléculas, a fin de hacer de la nanotecnología una herramienta superadora en el tratamiento de patologías complejas actuales. ■

## Bibliografía

- Fahr A and Liu X. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. *Expert Opin Drug Deliv*, 4 : 403 – 416, 2007.
- Chen H , Khehtong C, Yang X , Chang X and Gao J. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discov Today*, 16 : 354 – 360, 2011.
- Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J Pharm Pharmacol*, 62: 1607–21, 2010.
- Drews J, Ryser S. Innovation deficit in the pharmaceutical industry. *Drug Inf J*, 30: 97–108, 1996.
- Stark WJ. Nanoparticles in biological systems . *Angew Chem Int Ed Engl*, 50: 1242 – 1258, 2011.
- Herrero-Vanrell R, Rincón AC, Alonso M, Reboto V, Molina-Martinez IT and Rodríguez-Cabello JC. Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release. *J Control Release*, 102:113 – 122, 2005.
- Saha SC, Patel D, Rahman S, Savva M. Caracterización físico-química, la solubilización y estabilización de 9-nitrocamptotecina usando copolímeros de bloques pluriónicos. *J Pharm Sci*, 102: 3653-3665, 2013.
- Qiu JF, Gao X, Wang BL, Wei XW, Gou ML, et al. Preparación y caracterización de monometoxi poli (etilenglicol) -poli (ε-caprolactona) micelas para la solubilización y la entrega *in vivo* de luteolina. *Int J Nanomedicine*, 8: 3.061-3.069, 2013.
- Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the epr effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*, 65: 271-284, 2000.
- Gabizon AA. Liposome circulation time and tumor targeting: implications for cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 16: 285-294, 1995.
- Kwon GS, Okano T. Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv Drug Delivery Rev*, 21: 107-116, 1996.
- Adams ML, Lavasanifar A, Kwon GS. Copolímeros en bloque anfífilos para administración de fármacos. *J Pharm Sci*, 92: 1343-1355, 2003.
- Cammass S, Suzuki K, Sone C, et al. Thermo-responsive polymer nanoparticles with a core-shell micelle structure as site-specific drug carriers. *J Control Release*, 48: 157-164, 1997.
- Le Garrec D, Taillefer J, Van Lier JE, et al. Optimizing pH responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model. *J Drug Target*, 10: 429-437, 2002.
- Torchilin VP. Structure and design of polymeric surfactant based drug delivery systems. *J Control Release*, 73:137-172, 2001.
- Kwon GS, Kataoka K. Block copolymer micelles as long circulating drug vehicles. *Adv Drug Deliv Rev* 16: 295-309, 1995.
- Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release* 82: 189-212, 2002.
- Leonhard V, Alasino RV, Bianco ID, Garro AG, Heredia V and Beltramo DM. Self-assembled micelles of monosialogangliosides as nanodelivery vehicles for taxanes. *J Control Release*, 162 (3): 619-627, 2012.
- Leonhard V, Alasino RV, Bianco ID and Beltramo DM. Biochemical characterization of the interactions between Doxorubicin and lipidic GM1 micelles with or without Paclitaxel loading. *Int J Nanomedicine*, 10: 3377-3388, 2015. doi:10.2147/IJN.S77153
- Leonhard V, Alasino RV, Bianco ID and Beltramo DM. Selective binding of albumin to GM1 ganglioside micelles containing Paclitaxel. *J Nanom and Nanotech*, 4:159, 2013. doi:10.4172/2157-7439.1000159 4 159.
- Wondimu A, Liu Y, Su Y, Bobb D, Ma JS, Chakrabarti L, Radoja S, Ladisch S. Gangliosides drive the tumor infiltration and function of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*, 74(19), 5449-57, 2014.
- Zou D, Wang W, Lei D, Yin Y, Ren P, Chen J, Yin T, Wang B, Wang G, Wang Y. Penetration of blood-brain barrier and antitumor activity and nerve repair in glioma by doxorubicin-loaded monosialoganglioside micelles system. *Int J Nanomedicine*, 12, 4879-4889, 2017. doi:10.2147/IJN.S138257.
- Centro de Excelencia en Productos y Procesos Córdoba (CEPROCOR), Córdoba, Argentina; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina. E-mail: v.alasino@gmail.com.ar
- Centro de Excelencia en Productos y Procesos Córdoba (CEPROCOR), Córdoba, Argentina; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina. E-mail: vickyleonhard@hotmail.com
- Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba (CEPROCOR), Córdoba, Argentina, E-mail: garroariel@hotmail.com
- Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba (CEPROCOR), Córdoba, Argentina; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina; Cátedra de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina. E-mail: dantemiguelbeltramo@gmail.com.ar