



NANOGELES DEGRADABLES PARA LIBERACIÓN INTRACELULAR DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS

Candiotti, Candelaria

Facultad de Ingeniería Química (Universidad Nacional del Litoral)

Director/a: Gonzales, Verónica

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Nanogeles (NGs), *N*-vinilcaprolactama (VCL), Glutación (GSH)

INTRODUCCIÓN

Las vacunas a subunidades (proteínas, péptidos, ADN, ARN) utilizan proteínas purificadas o recombinantes obtenidas de los patógenos y son consideradas las más seguras en la actualidad. Debido a su naturaleza son formulaciones muy sensibles a factores como pH, presencia de enzimas, etc. Por ese motivo en este tipo de vacunas se suele emplear un sistema de entrega, para que los antígenos sean eficientemente transportados a los sitios inductivos y presentados luego de su administración. Para ello, en este trabajo sintetizamos Nanogeles (NGs), partículas formadas por redes de polímeros entrecruzados. Estos NGs actúan como sistema de entrega y tiene la capacidad de degradarse dentro de las células inmunológicas, liberando las proteínas en su interior. Los NGs se sintetizaron empleando *N*-vinilcaprolactama (VCL) como monómero base y diferentes entrecruzantes como etilenglicol dimetacrilato (EGDM), *N,N*-metilenbisacrilamida (BIS) y *N,N'*-bis(acriloil)cisteina (BAC). Este último posee un enlace disulfuro que se rompe en presencia de glutación (GSH). Como las células dendríticas (CDs), a las cuales queremos dirigir las proteínas, presentan una gran concentración de GSH en su interior, en comparación con su exterior, se pretende aprovechar esta diferencia de concentraciones para que los NGs se degraden en el interior de las células dendríticas y liberen las proteínas de manera dirigida. Debido a que la poli(*N*-vinilcaprolactama) (PVCL) es termosensible, los NGs de PVCL presentan una temperatura de transición volumétrica (VPTT) por debajo de la cual se encuentran hinchados, manteniendo la proteína en su interior; mientras que a temperaturas mayores los NGs colapsan expulsando todo su contenido. Por este motivo se persigue la obtención de NGs con VPTT mayores a la temperatura corporal para evitar que la proteína se libere antes de entrar en las CDs.

Título del proyecto: Nuevas Plataformas Poliméricas para su uso en Biotecnología

Instrumento: CAI+D

Año Convocatoria: 2020

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral



OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo sintetizar nanogeles de poli(N-vinilcaprolactama) que permitan liberar proteínas antigénicas dentro de las células dendríticas. De este objetivo principal, se desprenden tres objetivos específicos:

- Sintetizar NGs con tamaños que permitan ser capturados e internalizados por las CDs.
- Sintetizar NGs que se degraden dentro de las CDs por una diferencia en la concentración de glutatión.
- Obtener NGs con una VPTT mayor a 37°C.

METODOLOGÍA

Síntesis de NGs

La síntesis de los NGs se realiza por polimerización en emulsión empleando 4% de dodecil sulfato sódico (SDS) como emulsificante, NaHCO₃ como buffer y 2,5% de persulfato de potasio (KPS) como iniciador, donde todos los % están expresados respecto de la concentración de VCL. Las proporciones de monómeros e iniciador utilizadas para obtener los distintos NGs se presentan en la Tabla 1. La mezcla se mantuvo en agitación a 400 rpm y con burbujeo de N₂ durante 10 minutos y luego se la llevó a un baño termostático, donde se continuó con la agitación. Cuando se alcanzó los 70°C, se agregó el iniciador para dar comienzo a la reacción. A lo largo de la polimerización se tomaron muestras a las cuales se les adicionó un inhibidor (hidroquinona) para detener la reacción.

Tabla 1. Proporción de monómeros e iniciador empleadas para la síntesis de NGs.

	VCL (mg/ml)	BIS (%) *	BAC (%) *	EGDM (%) *	KPS (%) *
V3BIS4K2,5	30	4	-	-	2,5
V3BAC4K2,5	30	-	4	-	2,5
V3EG4K2,5	30	-	-	4	2,5

*los % están expresados respecto de la concentración de VCL.

Caracterización de NGs

A las muestras tomadas en distintos tiempos de reacción, se les midió el diámetro de partícula (D) utilizando la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) para realizar curvas de D vs Tiempo. Todas las muestras se midieron a una concentración de 1 mg/mL y a 55°C, utilizando un ángulo de 175°.

A su vez, se les realizó un análisis mediante H1-RMN para determinar cómo evoluciona en el tiempo la conversión de los monómeros. Para este análisis, se utilizó acetato de sodio (AcNa) como patrón interno, cuyo espectro presenta un pico a 1.7 ppm (flecha naranja en Fig. 1). Para determinar la concentración de VCL y los entrecruzantes se integró el pico correspondiente al doble enlace vinílico (flecha azul en Fig. 1), se lo relacionó con el área del pico de AcNa. Los espectros se realizaron empleando la técnica WATERGATE para la supresión del pico del agua (a 4.7 ppm).

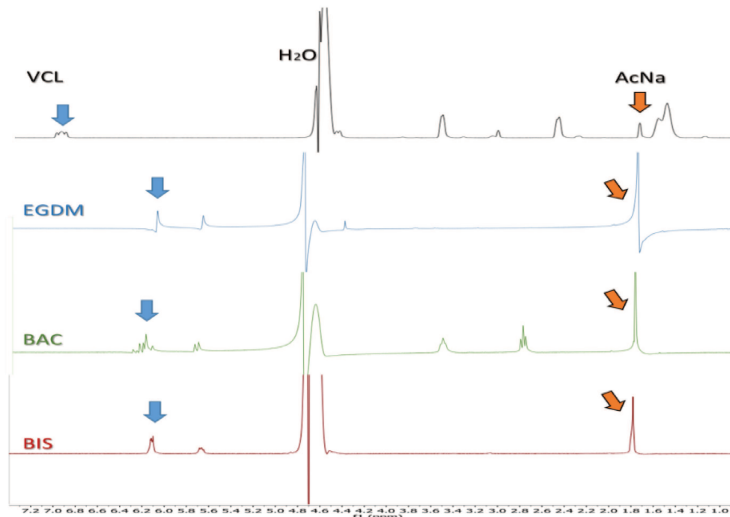


Figura 1. Espectros de H1-RMN de los diferentes monómeros.

La conversión se calculó empleando la ecuación:

$$\text{conversión} = \frac{[\text{monómero}]_i - [\text{monómero}]_{\text{LIBRE}}^t}{[\text{monómero}]_i}$$

Donde $[\text{monómero}]_i$ es la concentración de VCL o entrecruzante cargada inicialmente y $[\text{monómero}]_{\text{LIBRE}}^t$ es la concentración de VCL o entrecruzante sin reaccionar en tiempo t .

La muestra final de la polimerización se caracterizó para determinar la respuesta térmica de los NGs. Se diluyó a 1 mg/mL y se midió la transmitancia (%T) a 600 nm en un rango de temperatura de 20-45 °C con intervalos de 1°C.

RESULTADOS

Evolución de la conversión

En la Figura 2 se muestran las evoluciones de las conversiones de los monómeros para las tres reacciones sintetizadas con los diferentes entrecruzantes. En todas las reacciones se obtuvieron elevadas conversiones finales.

En todos los casos se observa que los entrecruzantes se consumen más rápido que la VCL. En numerosos artículos, puede encontrarse evidencia de un consumo temprano de BIS respecto de la VCL en la síntesis de NGs, donde proponen que estos poseen una morfología conformada por un núcleo densamente entrecruzado y una coraza mayormente compuesta por cadenas lineales de PVCL (Figura 2 d). (Imaz A, 2009, Janssen F. A. L, 2017) Esto nos lleva a suponer que lo mismo ocurre en las síntesis realizadas con BAC y EGDM (Figura 2 b y c).

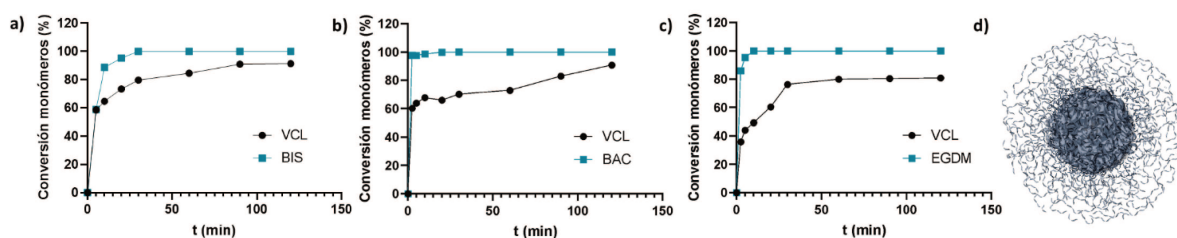


Figura 2. Evolución de la conversión de los monómeros en las reacciones V3BIS4K2,5 (a), V3BAC4K2,5 (b) y V3EG4K2,5 (c), y esquema de la morfología de los NGs (d).

Evolución del Diámetro

En la Figura 3 a) se observa la evolución del diámetro de partículas de las tres reacciones consideradas, el cual aumenta a medida que incrementa la conversión de VCL indicando que el proceso de nucleación ocurre principalmente al inicio de la polimerización y que los NGs aumentan su tamaño a medida que avanza la reacción. Esto coincide con lo reportado por Janssen y col. en la síntesis de NGs de PVCL y BIS. (Janssen F. A. L, 2017) En todas las reacciones se obtuvo un diámetro final menor a 200 nm, lo cual es óptimo para que los NGs sean captados por las CDs.

Respuesta Térmica

En la Figura 3 b) se observa la respuesta térmica de los NGs, medida a través de la transmitancia. Se observa que la VPTT depende del entrecruzante empleado en la síntesis de los NGs, obteniéndose una mayor VPTT para los NGs sintetizados con EGDM y BAC. Cabe destacar que la VPTT de ambos NGs es superior a la temperatura corporal, por lo que ambos sistemas permitirían contener la proteína, sin liberarla por el cambio de temperatura.

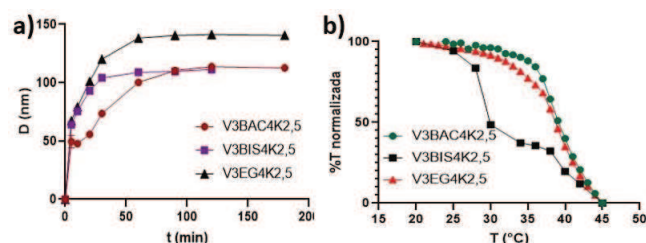


Figura 3. a) Evolución del diámetro de partículas de las reacciones V3BIS4K2,5, V3BAC4K2,5 y V3EG4K2,5 y b) Respuesta térmica medida por transmitancia de las reacciones V3BIS4K2,5, V3BAC4K2,5 y V3EG4K2,5.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados experimentales, se puede decir que las reacciones V3EG4K2,5 y V3BAC4K2,5 son las más adecuadas, dado que poseen muy buenas conversiones, diámetros de partícula óptimos y una mayor VPTT. Es por esto que se propone tomar ambas reacciones para obtener una combinación entre un entrecruzante degradable (BAC) y uno no degradable (EGDM). Dicha combinación, en diferentes proporciones, permitirá obtener distintos grados de degradación en presencia de GSH según la relación entre ambos entrecruzantes.

BIBLIOGRAFÍA BASICA

Imaz, A.; Forcada, J. 2009. Optimized buffered polymerizations to produce N-Vinylcaprolactam-based microgels. Eur Polym. J.

Janssen, F. A. L.; Kather, M.; Kroger, L. C.; Mhamdi, A.; Leonhard, K.; Pich, A.; Mitsos, A. 2017. Synthesis of poly(N-Vinylcaprolactam)-based Microgels by precipitation polymerization: process modeling and experimental validation. Ind. Eng. Chem.