



SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS ONCOLÓGICOS

Mansilla, María

Química Fina, INTEC (CCT CONICET Santa Fe-UNL)

Director: Mengatto, Luciano

Codirector: Turino, Ludmila

Área: Ciencias de la salud

Palabras claves: Liberación controlada, Micropartículas, Drogas oncológicas.

INTRODUCCIÓN

Los pacientes oncológicos están expuestos a tratamientos como quimioterapia o radiación que, frecuentemente, producen efectos secundarios significativos. Un enfoque alternativo es la administración de los fármacos en el sitio que dejó la remoción del tumor o, directamente, en el interior del tumor. De este modo, esta aproximación terapéutica para combatir tumores sólidos y prevenir metástasis y recidivas, implica la implantación de un dispositivo biodegradable cargado con el/los agentes activos. La liberación localizada de los fármacos incrementa la concentración de los mismos en el sitio de acción, el tiempo de contacto con las células cancerosas y disminuye la exposición sistémica y su toxicidad asociada. En este sentido, el grupo de trabajo preparó y evaluó exitosamente *in vivo* un sistema que consiste en una solución de polímero biodegradable que tiene en suspensión partículas que contienen paclitaxel (PTX) (Pesoa y col., 2018). En respuesta a un cambio de temperatura ($T_{\text{ambiente}} \rightarrow T_{\text{corporal}}$) esta mezcla forma un gel en el sitio de aplicación. El desafío del presente trabajo fue la incorporación de otro fármaco (doxorubicina, DOX) para lograr liberación simultánea. El sistema con ambos agentes activos fue preparado y evaluado *in vitro* como sistema de liberación controlada.

OBJETIVOS

- Diseñar sistemas biodegradables que contengan y liberen drogas oncológicas.
- Estudiar propiedades y características fisicoquímicas y funcionales de los sistemas de liberación.

Título del proyecto: Desarrollo de un sistema de liberación controlada y localizada de drogas oncológicas.

Instrumento: PDTs

Año convocatoria: 2015

Organismo financiador: CIN - CONICET

Director: Luna, Julio

METODOLOGÍA

Las partículas se prepararon con el método de emulsión/evaporación y se utilizó el copolímero ácido láctico-co-glicólico (PLGA 50:50). Se empleó una emulsión orgánica/acuosa (O/A) y una doble emulsión acuosa/orgánica/acuosa (A1/O/A2), para preparar las partículas que contienen PTX y PTX/DOX, respectivamente. En ambos casos, la fase orgánica volátil fue diclorometano (DCM) y la fase acuosa, agua o una solución de poli-(vinil alcohol) (PVA). El DCM se removió del sistema por evaporación, dando lugar a la precipitación del polímero y a la formación de las partículas. Para la preparación de las emulsiones se utilizó un Homogeneizador de alta velocidad (IKA) y un Homogeneizador ultrasónico (Cole Parmer). Luego de obtenidas las partículas se evaluó la forma y la distribución de tamaños mediante microscopía óptica (Microscopio óptico trinocular marca LEICA). La cuantificación de los fármacos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Se determinaron para cada fármaco su contenido en la formulación (CF %, masa de fármaco/masa de formulación x 100) y la eficiencia de atrapamiento (E%, masa final de fármaco/masa inicial de fármaco x 100). Además, se evaluó el rendimiento para cada metodología de preparación de partículas (R %, masa de formulación/masa inicial de reactivos x 100). Para estudiar posibles interacciones fármaco-polímero se realizaron experimentos de espectroscopia IR (FTIR-8001 PC Shimadzu). Se evaluaron dos estrategias de formulación para liberación simultánea: gel de quitosán (Q) que contiene partículas con PTX y DOX libre y gel que contiene partículas con PTX/DOX. El Q y el glicerofosfato de sodio (GP) se disolvieron en solución acuosa de ácido acético (0,15 M) y en agua ultrapura, respectivamente. Luego se mezclaron (3:1 Q:GP) para preparar la mezcla termosensible (Pessoa y col., 2018; Mengatto y col., 2016). Las partículas y la DOX se incorporaron en la solución de Q antes de la preparación de la mezcla termosensible. Además, como control se realizaron experimentos de liberación desde las partículas sin gel. El medio de liberación fue buffer fosfato salino con sodio dodecil sulfato (PBS-SDS pH=7.4), a una temperatura de 37°C y con agitación orbital.

RESULTADOS

Las partículas presentaron forma esférica con diámetros iguales a $6,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$ y $18,5 \pm 4,4 \mu\text{m}$ para las que contienen PTX (Fig. 1-A) y PTX/DOX (Fig. 1.B), respectivamente.

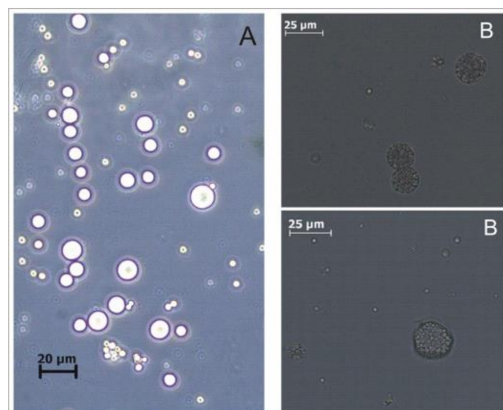


Figura 1: Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica. A) Partículas que contienen PTX, B) Partículas que contienen PTX/DOX.

En las partículas preparadas mediante doble emulsión (Fig. 1.B) se observó en su interior la presencia de gran cantidad de gotas de la fase acuosa 1.

En la Tabla 1 se muestran los valores de contenido de fármaco (CF %), eficiencias de atrapamiento (E%) y rendimiento (R %). La inclusión de DOX no afectó significativamente el contenido de PTX en las partículas ni su eficiencia de atrapamiento ($p > 0,05$). Ambas metodologías permitieron obtener rendimientos superiores al 85 %. En el caso de la doble emulsión, el volumen que se utiliza de fase A1 es pequeño (0,5 mL) y esto limita la cantidad de DOX a utilizar.

Tabla 1: Contenido de fármaco (*CF*), Eficiencia (*E*) y Rendimiento (*R*).

	Partículas PTX	Partículas PTX/DOX	
		PTX	DOX
CF (%)	8,6±1,2	9,4±0,2	0,58±0,02
E (%)	87,2±12,0	87,6±2,9	44,7±2,8
R (%)	87,7±2,8	84,9±2,8	

La eficiencia media obtenida para este fármaco ($\approx 45\%$) puede deberse a que el uso de doble emulsión no logra superar la incompatibilidad entre fármaco soluble en agua y polímero soluble en solvente orgánico.

Para estudiar la interacción entre el PLGA y los fármacos se realizaron experimentos de espectroscopia IR. Los espectros obtenidos para muestras de las partículas luego de la síntesis presentaron picos correspondientes a grupos funcionales del polímero. Este resultado es compatible con el hecho de que el PLGA es el componente mayoritario y no permite observar señales de los fármacos. Los espectros obtenidos para el material que se recolectó al final de los ensayos de liberación desde partículas sin gel, permitieron observar algunos picos correspondientes a DOX y corrimientos o modificaciones en la intensidad de picos relativos a PLGA (-OH terminales $3450-3500\text{ cm}^{-1}$, C-H $2885-3010\text{ cm}^{-1}$ y C=O 1760 cm^{-1}). Este resultado corroboró a nivel molecular lo que se visualizaba macroscópicamente, ya que dicho material presentaba una coloración típica de DOX. De este modo, se puede decir que existiría algún tipo de interacción como puente de hidrógeno o a través de cargas entre el PLGA-DOX (Betancourt y col., 2007). La DOX que se utilizó correspondió a la forma clorhidrato de doxorubicina. No obstante, los porcentajes de liberación fueron cercanos al 100 %.

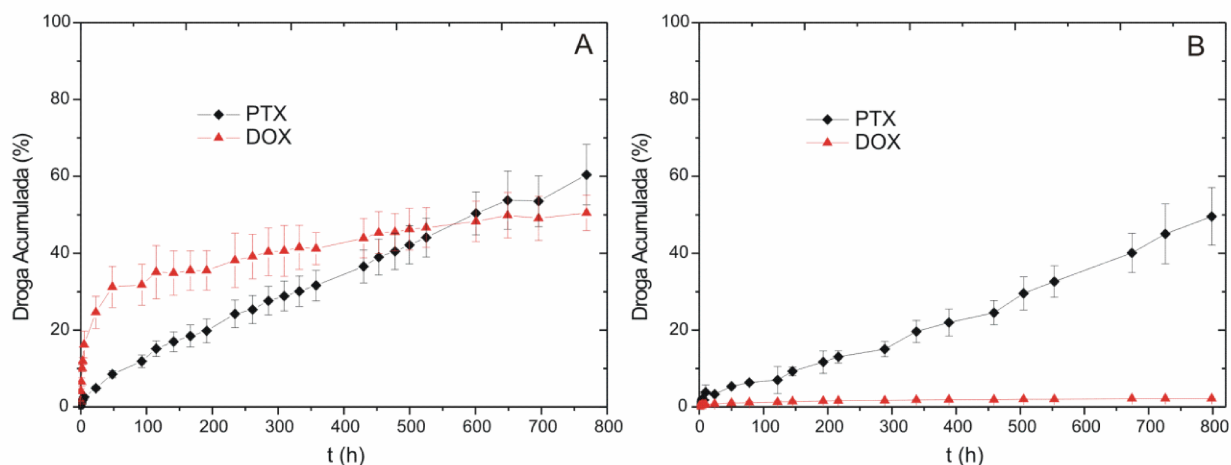


Figura 2: Ensayos de liberación *in vitro*. A) Gel con partículas que contienen PTX y DOX libre, B) Gel con partículas que contienen PTX/DOX.

La Fig. 2 muestra los resultados de los ensayos de liberación *in vitro*. La inclusión de las partículas en la mezcla termosensible permitió ralentizar la liberación de ambos fármacos en comparación a la liberación desde partículas sin gel (Datos no mostrados). Comparando la liberación de PTX desde partículas sin (Fig. 2.A) y con DOX (Fig. 2.B), ambas incluidas en geles de Q, no se observaron grandes diferencias entre los perfiles. Por otro lado, la inclusión de la DOX en las partículas permitió ralentizar su liberación desde la mezcla termosensible en

comparación a la liberación directa desde el gel (DOX libre). En otras palabras, el efecto de contención que ejerció el gel fue más significativo sobre la DOX que sobre el PTX cuando ambos estaban atrapados en la misma partícula (Fig. 2.B). Los mecanismos de transición desde solución a gel implican interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y también uniones iónicas. Estas últimas se originan entre los grupos amino del Q (con carga positiva) y los grupos fosfatos (con carga negativa) del GP. La presencia de 3 cargas negativas por molécula de GP podría permitir que alguna de ellas quede disponible para interactuar con DOX. De este modo, a la interacción de la DOX con el PLGA en las partículas se le sumaría una segunda interacción entre la DOX y el polímero del gel, resultando en un mayor control sobre su liberación.

CONCLUSIONES

El sistema que consiste en una solución de polímero biodegradable que tiene en suspensión partículas que contienen PTX y forma un gel en el sitio de aplicación en respuesta a la temperatura fue preparado y evaluado exitosamente *in vivo*. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que es posible la inclusión de DOX en el mismo sistema para tener liberación simultánea. Esta inclusión se puede realizar mediante el fármaco libre en el gel o contenido en partículas junto con PTX. Otras alternativas a explorar son, agregados de excipientes u otros polímeros que permitan aumentar las eficiencias de atrapamiento de DOX y, preparar partículas que contengan solo DOX. Finalmente, seleccionar el sistema de liberación controlada de mejor potencial para los ensayos *in vivo* como tratamiento en modelos murinos de adenocarcinoma de mama.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Betancourt, T., Brown, B., Brannon-Peppas, L. (2007). Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation. *Nanomedicine*, Vol. 2, pp. 219-232.

Mengatto, L.N., Pesoa, J.I., Velázquez, N.S., Luna, J. (2016). Application of simultaneous multiple response optimization in the preparation of thermosensitive chitosan/glycerophosphate hydrogels. *Iran Polym J*, Vol.25, pp. 897-906.

Pesoa, J., Rico, M.J., Rozados, V., Scharovsky, O.G., Luna, J., Mengatto, L.N. (2018). Paclitaxel delivery system based on poly(lactide-co-glycolide) microparticles and chitosan thermosensitive gel for mammary adenocarcinoma treatment. *J Pharm Pharmacol*, Vol. 70, pp. 1494-1502.

Agradecimientos

Consejo Interuniversitario Nacional - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Proyecto PDTs 453). Universidad Nacional del Litoral.