



Materiales moleculares nanoestructurados en el desarrollo de nuevos fármacos

Nora Ventosa

En la actualidad, herramientas y técnicas analíticas permiten la observación y la manipulación de estructuras biológicas que hace tan solo unos pocos años se veían como ciencia ficción. El enorme desarrollo que está experimentando el campo de la nanomedicina no sería explicable sin los importantes avances que se están realizando en la comprensión fundamental de sistemas biológicos complejos, al servicio de los sistemas de detección y tratamiento de enfermedades.

Durante la última década, la nanomedicina y la nanobiología han experimentado una transformación radical desde la fantasía hasta la ciencia real. Actualmente, muchos procesos biológicos se estudian a escala nanoscópica, utilizando la estructura y las propiedades de nanomateriales sintéticos en la interfaz nano-bio, para examinar enfermedades y tratamientos a unos niveles antes inalcanzables.¹

En este marco y desde hace ya varios años, se ha constatado que los progresos realizados en el área de la preparación de materiales con excepcionales prestaciones, derivadas de su estructura a escala nanoscópica y microscópica, pueden contribuir de manera muy significativa al desarrollo de sistemas de detección y tratamiento de enfermedades con eficacias y especificidades sin precedentes. Estos nanomateriales pueden ayudar al desarrollo de nuevos fármacos con elevada permeabilidad, a través de las membranas biológicas que presenten perfiles de liberación controlados y que puedan ser dirigidos y liberados en las dianas terapéuticas.

► Nanotransportadores moleculares de activos

Siguiendo esta estrategia, se está trabajando en el desarrollo de nanotransportadores moleculares de activos terapéuticos (*drug nanocarriers* o *drug delivery systems, DDS*) que permitan llevar de forma precisa, en tiempo y espacio, dichos activos desde el lugar de su administración hasta las células, tejidos u órganos enfermos.²⁻⁴ Estas nanoestructuras pueden, por ejemplo:

- proteger el activo de una degradación prematura,
- aumentar la absorción del fármaco facilitando su difusión a través del epitelio,
- modificar la farmacocinética y el perfil de distribución del activo en el tejido y/o
- mejorar la penetración celular y la distribución.

El suministro selectivo de activos, en tiempo y espacio, de estas nanomedicinas se traduce en tratamientos más efectivos, más cortos, con menos efectos secundarios y más placenteros para el paciente.

Desde los primeros liposomas propuestos en 1974 por Gregoriadis *et al.*,⁵ se han desarrollado múltiples estructuras de dimensiones nano y mesoscópicas para el transporte de activos terapéuticos.

En la figura 1 se esquematizan los nanotransportadores más utilizados actualmente en el desarrollo de nanomedicinas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Estas nanoestructuras pueden estar constituidas por una única molécula, como los dendrímeros, los nanotubos de carbono o los polímeros, o bien por múltiples unidades moleculares, generalmente lípidos o polímeros, ensambladas entre sí mediante interacciones débiles (puentes de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, interacciones entre los electrones π de anillos aromáticos, etc.). Dentro de este último grupo se encuentran las micelas, las vesículas o liposomas, las partículas poliméricas, las partículas sólidas lipídicas y las nanocápsulas.

La mayoría de las nanomedicinas que se encuentran hoy día en el mercado son absorbidas selectivamente en las dianas

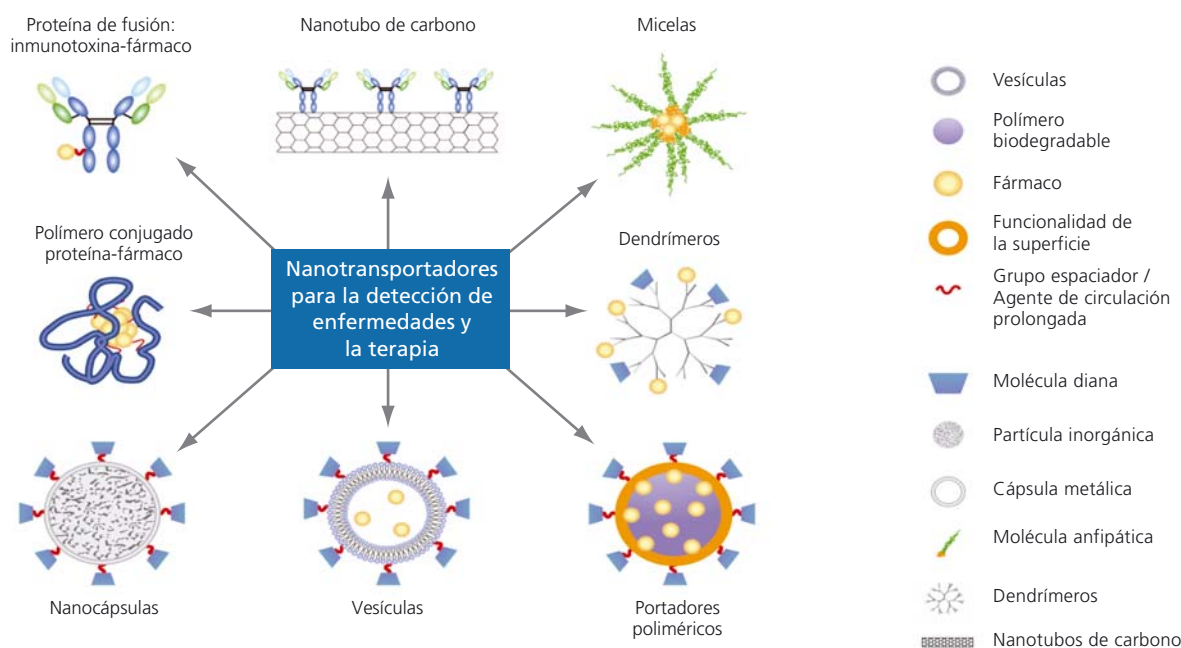


Figura 1. Ejemplos de sistemas nanoestructurados de suministro de activos para la detección y el tratamiento de enfermedades. Los componentes principales de este tipo de sistemas incluyen generalmente un nanotransportador, una unidad de direccionamiento y el activo.

Fuente: Adaptada de Peer et al.⁶

terapéuticas mediante orientación pasiva (*passive targeting*). Por ejemplo, en terapias del cáncer, la absorción selectiva de estas nanomedicinas en las zonas tumorales se produce por extravasación debida a la mayor permeabilidad de la vasculatura y a la ineficiencia del drenaje linfático en estos tejidos enfermos (*Enhanced Permeability and Retention [EPR] effect*).

Ahora bien, tal como se ilustra en la figura 1, se están realizando grandes avances en la orientación activa (*active targeting*) de los nanotransportadores, mediante la utilización de fuerzas físicas específicas como fuerzas de atracción magnética o interacciones bioquímicas, como las interacciones ligando-receptor o antígeno-anticuerpo.⁷ Así pues, más recientemente se están invirtiendo importantes esfuerzos en intentar modificar racionalmente la superficie de los nanotransportadores para mejorar la selectividad de las nanomedicinas hacia dianas terapéuticas y, en algunos casos, favorecer la internalización celular. La estrategia más utilizada es la modificación de la superficie de estas nanoestructuras mediante su conjugación, por diferentes vías químicas, a ligandos (por ejemplo, anticuerpos, péptidos o moléculas pequeñas) que reconozcan y se enganchen a receptores moleculares expresados de manera más intensa en las células diana que en las cé-

lulas normales. Por ejemplo, en un modelo de cáncer de mama es necesaria una densidad mínima de 10^5 copias del receptor ErbB2 por célula para que una formulación del citotóxico doxorubicina con liposomas funcionalizados con anti-ErbB2, como ligandos directores, muestre una mayor eficiencia frente a la misma formulación liposomal sin funcionalizar.⁸

Los nanotransportadores basados en ensamblajes moleculares (liposomas, nano-

cápsulas y nanopartículas poliméricas, entre otros) pueden sufrir transformaciones estructurales al estar sometidos a pequeñas variaciones de pH, de temperatura o del potencial redox. Esta propiedad se está aprovechando para la confección de nuevas nanomedicinas capaces de liberar activos en respuesta a ciertos estímulos externos, como por ejemplo el menor pH de los tumores o zonas inflamadas en relación con los tejidos normales.⁹

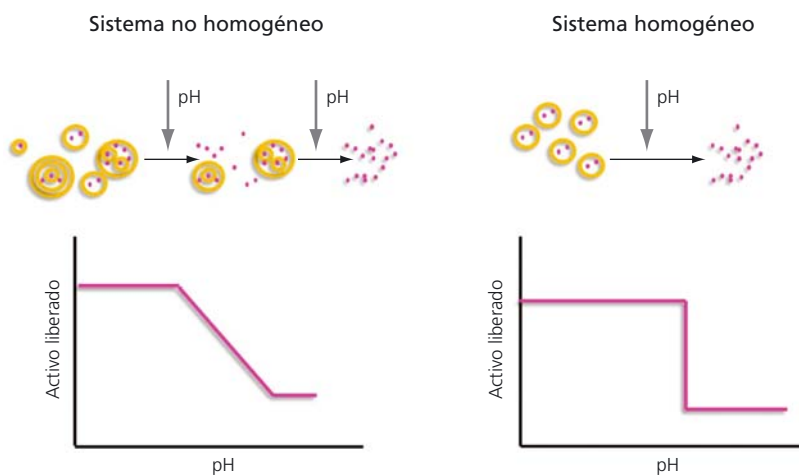


Figura 2. Comparación esquemática de la liberación de activos en sistemas vesiculares heterogéneos (izquierda) y homogéneos (derecha).

En particular, la nanotecnología está siendo utilizada para el desarrollo de nuevos fármacos en base a biomoléculas (péptidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos) con elevada actividad terapéutica, pero muy frágiles estructuralmente o con baja permeabilidad a través de membranas. En efecto, la conjugación de estas entidades moleculares a materiales nanoestructurados, para formar *bioconjugados*, despierta grandes expectativas para el desarrollo de nanomedicinas con una selectividad sin precedentes y niveles de toxicidad muy bajos.

► Importancia de la homogeneidad estructural

Para que estas nanomedicinas puedan ejercer de manera óptima su función es necesario que haya una gran homogeneidad entre las nanoestructuras que constituyen el sistema, en términos de tamaño de partícula, morfología y organización supramolecular. Por ejemplo, en el caso de nanotransportadores vesiculares, el grado de homogeneidad estructural determina su estabilidad en la suspensión coloidal, la rigidez y permeabilidad de la membrana lipídica y su precisión en la respuesta a estímulos externos. Tal como se ilustra de manera esquemática en la figura 2, la homogeneidad en tamaño y morfología entre las vesículas que constituyen un sistema vesicular es crucial para que su respuesta frente a un estímulo externo (por ejemplo, un cambio de pH) esté bien definida, permitiendo la liberación precisa de activos en dianas terapéuticas.

El creciente número de formulaciones basadas en la conjugación de activos terapéuticos a nanotransportadores, que están actualmente bajo evaluación clínica o incluso en algunos casos que ya han alcanzado el mercado, muestra el gran potencial de este tipo de estrategias para el desarrollo de nuevos fármacos. Ahora bien, muchas nanomedicinas desarrolladas en laboratorios de investigación con prometedores resultados farmacológicos *in vitro* no llegan a alcanzar las fases clínicas e incluso las preclínicas.

Para que una nanomedicina pueda ser transferida, desde el laboratorio hasta la práctica clínica, tiene que ser biocompatible, debe ser aceptada por las agencias internacionales reguladoras, debe tener una estabilidad adecuada frente al almacenaje y su preparación a escala industrial—de gran precisión— debe ser técnica y económicamente factible mediante procesos respetuosos con el medio ambiente.

La síntesis precisa y reproducible de los nanoconjugados terapéuticos a escala industrial no es sencilla. Las distintas unidades moleculares que constituyen estos sistemas (por ejemplo, moléculas lipídicas en liposomas) están ensambladas mediante interacciones débiles, por lo que su estructuración a nivel nano y mesoscópico es extremadamente sensible al tipo de proceso de preparación.

La mayoría de procesos productivos utilizados actualmente en la industria farmacéutica permiten un control muy deficiente de la estructura de los materiales

a escala nanoscópica y son necesarias etapas adicionales para alcanzar los productos deseados. Ello comporta una baja conformidad lote a lote y dificultades en el cumplimiento de las normativas GMP (*Good Manufacturing Practices*).¹⁰ Por ejemplo, tal como ilustra la figura 3, la preparación de liposomas por el método convencional de rehidratación¹¹ conduce, generalmente, a liposomas con una gran dispersión estructural en términos de tamaño de partícula, morfología y organización supramolecular. Así pues, para alcanzar estructuras liposomales con la homogeneidad estructural requerida en nanomedicina, se requieren etapas adicionales de congelación-descongelación, extrusión y/o sonicación, con elevados riesgos de dañar biomoléculas y otros activos terapéuticos.

El enorme potencial de las nanomedicinas descritas hasta ahora puede quedar totalmente frustrado, si no se desarrollan tecnologías eficientes que permitan su preparación a escala industrial, bajo normativas GMP, con un elevado nivel de precisión y control de los parámetros estructurales como el tamaño, la morfología, la disposición de las diferentes unidades moleculares sintéticas y/o biológicas en la nanoestructura. Es importante destacar que, en el ámbito de la preparación de materiales para el sector farmacéutico, veterinario y biotec, todos los ensayos de toxicidad y eficacia que se realizan durante las fases clínicas I, II y III, para que un nuevo activo terapéutico o nanomedicina alcance el mercado, se han de preparar utilizando lotes producidos mediante estas normativas.

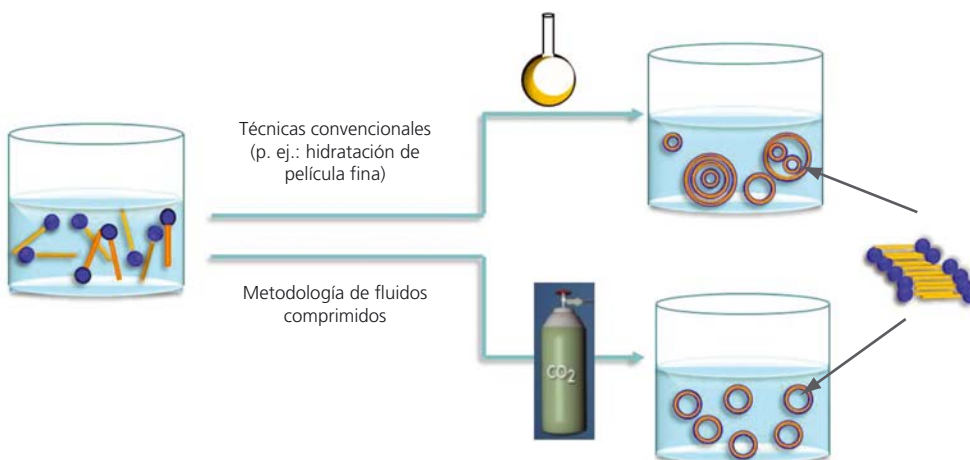


Figura 3. Impacto del método de preparación en la estructura de un sistema liposomal con la misma composición química.

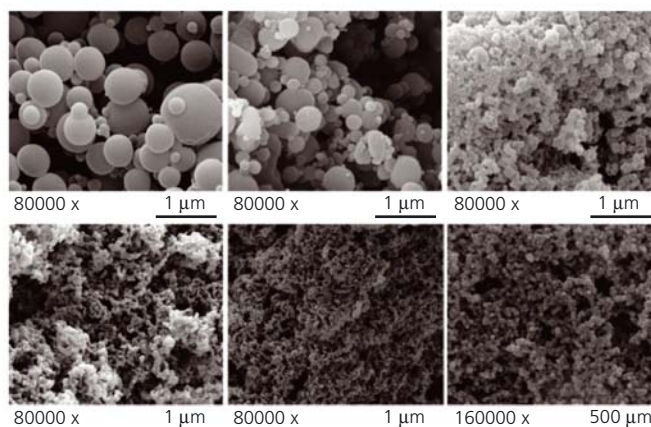
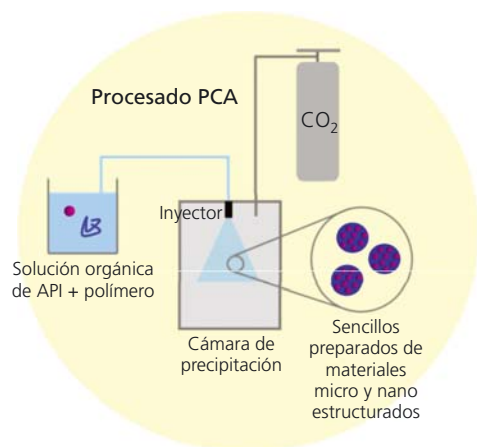


Figura 4. Procesado de matrices poliméricas microparticuladas cargadas de activos mediante CO₂ supercrítico. A la derecha, imágenes de microscopía SEM de dispersiones sólidas gentamicina/Gantrez: mediante la variación de parámetros de operación se puede modular el tamaño de las partículas obtenidas.¹⁶

► Procesado de nanomedicinas con fluidos comprimidos

La utilización de *fluidos comprimidos* (FC) y *fluidos supercríticos* (FSC) despierta, desde los inicios de la década de los noventa, un gran interés en todo el mundo para el desarrollo de procesos ecoeficientes de preparación y caracterización de materiales micro y nanoestructurados de interés industrial.¹²

Un *fluido comprimido* o *gas denso* es una sustancia que se encuentra cerca o por encima de su temperatura y presión críticas y que, en condiciones normales, es un gas. En la región supercrítica, o cerca de las condiciones supercríticas, el fluido comprimido existe como una fase única, con propiedades intermedias entre las del gas y las del líquido. El FC más utilizado es el CO₂, clasificado como disolvente verde, ya que no es tóxico, no es inflamable, es fácil de eliminar, no deja residuos en las partículas, es barato y es fácil de recuperar. En contraste con los disolventes líquidos convencionales, el poder de solvatación de los FC puede ser modificado por cambios de presión, los cuales se propagan de forma muy homogénea. De esta manera, utilizando FC como medio, a menudo, se pueden obtener materiales con características fisicoquímicas únicas (tamaño, porosidad, naturaleza polimórfica, morfología, etc.), inalcanzables por procedimientos que utilizan disolventes líquidos convencionales.

Durante las dos últimas décadas se han desarrollado diferentes tecnologías basa-

das en el uso de fluidos comprimidos para la obtención, en una sola etapa, de materiales micro y nanoparticulados con elevada homogeneidad y gran consistencia lote a lote. Así, mediante la utilización de FSC se han preparado matrices poliméricas microparticuladas para la liberación controlada de activos. Las bajas temperaturas y las condiciones anhidridas ofrecen claras ventajas para el procesado de moléculas sensibles al calor, la presencia de agua o disolventes.¹³ También se han utilizado métodos de precipitación con fluidos comprimidos para preparar proteínas y genes microparticulados para inhalación.¹⁴

Investigadores de NANOMOL, centro de Innovación Tecnológica de la red TECNIO de la Generalitat de Catalunya, perteneciente al Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona (ICMAB) del CSIC, y adscrito a CIBER-BBN,¹⁵ trabajamos desde hace más de una década, en el desarrollo y aplicación de tecnologías con FC para la preparación de nanomedicinas difíciles de alcanzar por procesado convencional. Por ejemplo, hemos establecido un nuevo proceso para la obtención de matrices homogéneas micro y nanoestructuradas del copolímero biodegradable y bioadhesivo poli (metilviniléter-anhídrido maleico) (Gantrez),

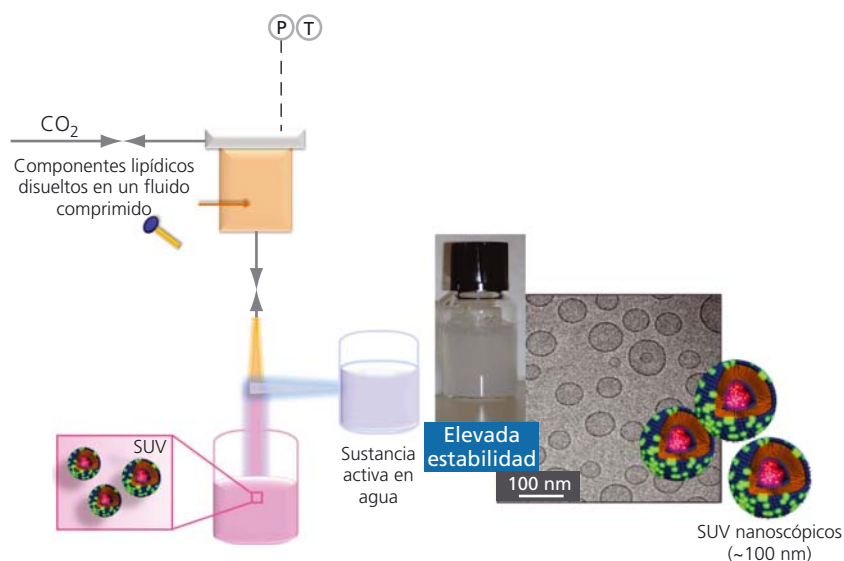


Figura 5. Esquema ilustrativo de la preparación, mediante CO₂ comprimido, de liposomas de dimensiones nanoscópicas con activos integrados.

SUV: pequeñas vesículas unilamelares, de *small unillamelar vesicles*.

con gran potencial para el suministro oral de activos. Mediante este proceso, se han preparado micropartículas nanoestructuradas de Gantrez cargadas de gentamicina, con proporciones polímero/antibiótico muy superiores a las alcanzadas mediante tecnologías convencionales, y de diferentes tamaños de partícula (fig. 4).

Más recientemente y en el marco de diferentes proyectos colaborativos, como por ejemplo el proyecto FABRY, financiado por la Fundació Marató de TV3, estamos aplicando esta plataforma tecnológica para integrar, en una sola etapa de proceso, moléculas sencillas y biomoléculas activas en liposomas de dimensiones nanoscópicas y morfología muy homogénea (*small unilamellar vesicles* o SUV) (fig. 5).¹⁷

La utilización de tecnologías con fluidos comprimidos para la preparación de nanomedicinas puede resultar efectiva en muchos casos gracias a las condiciones suaves que se emplean, a su desarrollo en atmósferas libres de oxígeno, a su precisión en el control de la estructura a escala nanoscópica y a la facilidad de su escalado bajo normativas GMP.

► Conclusiones

Para que puedan cumplirse totalmente las expectativas que está despertando la aplicación de la nanotecnología a la biomedicina, son necesarias mejoras significativas en las infraestructuras científicas y tecnológicas. Por ejemplo, para favorecer una traslación efectiva y rápida de las nuevas nanomedicinas, desarrolladas en ámbitos de investigación universitaria, y de nuevas plataformas tecnológicas para su producción, se requiere disponer de instalaciones que permitan su fabricación y desarrollo sometidos a normativas GMP. También son necesarias infraestructuras para poder realizar ensayos clínicos no convencionales basados en las nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas que van emergiendo en el campo de la nanomedicina. Las agencias regulatorias deben construir sus propias infraestructuras internas para realizar la evaluación de las innovaciones en nano-

medicina, de manera rápida, eficiente y segura.

Instituciones como el Centro de Investigación Biomédica en Red-Bioingeniería Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), que conforman grupos de investigación de diferentes disciplinas dentro de la medicina, las ciencias experimentales y la ingeniería, han demostrado ser efectivos para hacer frente a problemas complejos dentro de este campo. La comunicación fluida entre investigadores de centros académicos, médicos y profesionales de empresas farmacéuticas y biotecnológicas es imprescindible para que las nanomedicinas puedan alcanzar el sector productivo.

Finalmente, para que los grandes avances en nanomedicina puedan alcanzar el mercado son absolutamente necesarios métodos de fabricación de nanomateriales de alta calidad a escala industrial, precisos y reproducibles.¹⁸ #

.....
Nora Ventosa

INVESTIGADORA CIENTÍFICA

NANOMOL

INSTITUTO DE CIENCIA DE MATERIALES DE BARCELONA (ICMAB-CSIC)

► Bibliografía

- Nel A.E., Madler L., Velegol D., Xia T., Hoek E.M.V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. «Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface». *Nature Materials* 2009; 8: 543-57.
- Langer R. «Drug delivery and targeting». *Nature* 1998; 392: 5-10.
- Torchilin V.P. «Multifunctional nanocarriers». *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006; 58: 1532-55.
- Soussan E., Cassel S., Blanzat M., Rico Lattes I. «Drug delivery by soft matter: Matrix and vesicular carriers». *Angewandte Chemie (International Edition)* 2009; 48: 274-88.
- Gregoriadis G., Wills E.J., Swain C.P., Tavill A.S. «Drug carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy». *Lancet* 1974; 1: 1313-6.
- Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R. «Nanocarriers as an emerging platform for

cancer therapy». *Nature Nanotechnology* 2007; 2: 751-60.

- Byrne J.D., Betancourt T., Brannon Peppas L. «Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics». *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 1615-26.
- Park J.W. et al. «Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery». *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1172-81.
- Sawant R.R., Torchilin V.P. «Liposomes as 'smart' pharmaceutical nanocarriers». *Soft Matter* 2010; 6: 4026-44.
- Conjunto de normas y procedimientos que aseguran la calidad y la trazabilidad de los productos producidos y la seguridad de los procesos productivos utilizados. El cumplimiento de normativas GMP asegura que los productos se obtienen de forma reproducible, controlada, registrada y cumpliendo con todos los requerimientos analíticos. Más información disponible en: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm
- Olson F., Hunt C.A., Szoka F.C., Vail W.J., Papahadjopoulos D. «Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes». *Biochimica et Biophysica Acta* 1979; 557: 9-23.
- Eckert C.A., Knutson B.L., Debenedetti P.G. «Supercritical Fluids as solvents for chemical and materials processing». *Nature* 1996; 383: 313-8.
- Howdle S.M. et al. «Applications of supercritical CO₂ in the fabrication of polymer systems for drug delivery and tissue engineering». *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 373-87.
- Okamoto H., Danjo K. «Application of supercritical fluid to preparation of powders of high-molecular weight drugs for inhalation». *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 433-46.
- Véase <http://www.ciber-bbn.es/>
- Elizondo E., Santiago S., Imbuluzqueta E., González D., Blanco-Prieto M., Gamazo C., Ventosa N., Veciana J. «Compressed fluid processing of nanostructured PVM/MA based drug carriers. The particular case of gentamicin». *Pharmaceutical Research* 2011; 28: 309-21.
- Cano-Sarabia M., Ventosa N., Sala S., Patiño C., Arranz R., Veciana J. «Preparation of uniform rich cholesterol unilamellar nanovesicles using CO₂ expanded solvents». *Langmuir* 2008; 24: 2433.
- Mirkin C.A., Nel A., Thaxton C.S. *NSF/WTEC Nanotechnology Report on Nanobiosystems, Medicine and Health*. Berlín, Boston: Springer, 2010.