

Nanocàpsules polimèriques per a l'alliberament controlat de fàrmacs

Polymeric nanocapsules for controlled drug release

Cristina Cuscó,^{1,2} Josep Rocas,¹ Jordi Garcia^{2,3,4} i Ernesto Nicolás^{2,3}

¹ Ecopol Tech, SL. Departament de Nanobiotecnologia Polimèrica

² Universitat de Barcelona. Facultat de Química. Departament de Química Orgànica

³ Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB)

⁴ CIBER Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBERobn)

Resum: El càncer és una de les malalties que causa més morts als països desenvolupats. En aquest article s'ofereix un resum dels diferents tractaments d'aquesta malaltia, els quals han anat evolucionant cap a teràpies cada vegada més dirigides. Les innovacions en quimioteràpia, i més específicament les relacionades amb els nanomaterials, tenen com a objectiu modificar les propietats dels fàrmacs per tal d'incrementar-ne l'índex terapèutic, reduir-ne els efectes secundaris i millorar la qualitat de vida del pacient. Dins d'aquest context es presenta el treball que s'està desenvolupant a l'empresa Ecopol Tech, SL, en col·laboració amb la Universitat de Barcelona, basat en la preparació de nanocàpsules polimèriques com a materials intel·ligents per a l'alliberament controlat de molècules citotòxiques.

Paraules clau: Teràpies del càncer, teràpies dirigides, nanotecnologia, nanomaterials, nanocàpsules polimèriques, alliberament controlat de fàrmacs.

Abstract: Cancer is one of the diseases causing most deaths in developed countries. In this paper, we present an historical overview of different cancer therapies which have evolved towards more targeted ones. Innovations in chemotherapy, especially those involving nanomaterials, have the aim of modifying the properties of drugs in order to increase their therapeutic index, reduce side effects and improve patient quality of life. In this context, we present our research at Ecopol Tech, SL, in collaboration with the University of Barcelona, based on the synthesis of polymeric nanocapsules as smart materials for controlled drug release.

Keywords: Cancer therapies, targeted therapies, nanotechnology, nanomaterials, polymeric nanocapsules, controlled drug release.

Introducció

Actualment, el càncer és la primera causa de mortalitat en els països desenvolupats i la segona en els països en vies de desenvolupament. Segons estudis recents duts a terme per l'Organització Mundial de la Salut (GLOBOCAN), s'estima que el 2012 es van diagnosticar més de catorze milions de casos nous de càncer i van tenir lloc més de vuit milions de defuncions provocades per aquesta malaltia. En els propers anys es preveu encara una major incidència de la malaltia, de manera que es podrien sobrepassar els vint milions de casos esperats per a l'any 2030 [1, 2] (figura 1).

Avui dia se sap que el càncer pot ser causat per factors externs (com ara el tabac, la contaminació atmosfèrica, el sedentarisme o les dietes poc equilibrades) i per factors interns, que inclouen les mutacions genètiques heretades o l'estat immunològic personal [1-3]. Independentment de quin sigui l'origen del càncer, un fet important a destacar és que l'abast mundial d'aquesta malaltia es troba en un preocupant augment a conseqüència de la major incidència d'alguns dels factors esmentats, juntament amb un creixement generalitzat de l'esperança de vida [4].

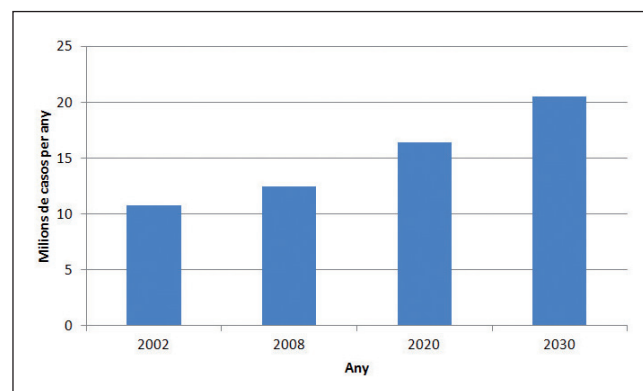


FIGURA 1. Incidència del càncer durant el primer terç del segle XXI [2].

Correspondència: Cristina Cuscó Marigó
Ecopol Tech, SL. Departament de Nanobiotecnologia Polimèrica
C. de la Indústria, 7. 43720 L'Arboç del Penedès
Tel.: +34 977 167 539. Fax: +34 977 167 539
A/e: cristina@ecopoltech.com
Universitat de Barcelona. Facultat de Química. Departament de Química Orgànica
C. de Martí i Franquès, 1-11. 08028 Barcelona
Tel.: +34 934 021 246. Fax: +34 933 397 878
A/e: crcuscom8@alumni.ub.edu

Actualment, els càncers de pulmó, mama i còlon són els més diagnosticats, mentre que els de pulmó, fetge i estómac són els causants d'un major nombre de morts [2]. El fet que cada tipus de càncer presenti unes característiques determinades i respongui a uns tractaments diferents fa que calgui considerar-lo com un conjunt complex de patologies i no pas com una única malaltia [3].

Malgrat aquest escenari poc falaguer, la col·laboració de diferents disciplines, com la medicina, la farmàcia, la biologia, la química, la física i l'enginyeria, ha permès aprofundir en els fonaments cel·lulars, moleculars i genètics de la malaltia. Gràcies a aquest coneixement, s'ha pogut perfeccionar i ampliar el rang de tècniques de diagnosi i oferir tractaments cada vegada més selectius que milloren la qualitat de vida del pacient.

El càncer des d'un punt de vista biològic

La majoria dels tipus de cèl·lules del cos humà contenen un recull complet de la informació genètica que els permet fer una gran diversitat de funcions i, a més, conservar la capacitat de créixer i dividir-se molt temps després que el desenvolupament de l'organisme s'hagi completat. Aquesta aptitud fa possible el manteniment dels teixits al llarg de la vida, així com la reparació de lesions i la renovació constant de les cèl·lules.

Al mateix temps, aquesta versatilitat i autonomia comporta un greu perill, ja que certes cèl·lules poden assumir rols que no

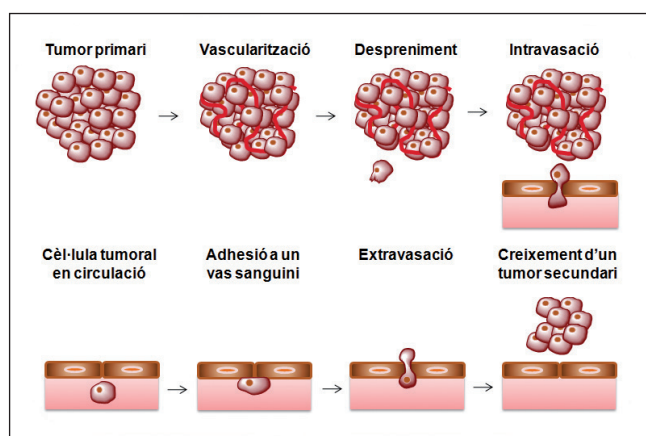


FIGURA 2. Formació d'un tumor primari i posterior metàstasi.

els pertocuen i que representen una amenaça per a un bon funcionament de l'organisme. En concret, algunes cèl·lules poden utilitzar la informació genètica per iniciar programes de proliferació cel·lular descontrolats i formar poblacions de cèl·lules que ja no obeeixen les normes de construcció i regulació dels teixits sans [5].

Aquest procés implica una competició avantatjosa de les cèl·lules canceroses enfront de les sanes pel subministrament de nutrients i oxigen del torrent sanguini. La conseqüència és que les cèl·lules canceroses acaben desplaçant les sanes i inicien un procés de formació de nous vasos sanguinis (angiogènesi) per tal de continuar dividint-se descontroladament [3, 5]. Aquesta expansió de teixits cancerosos pot acabar donant lloc a una migració a altres parts de l'organisme a través dels vasos limfàtics o del torrent sanguini, un fenomen anomenat *metàstasi* (figura 2) [5].

Evolució de les teràpies del càncer

Una de les primeres opcions terapèutiques per al tractament d'un càncer localitzat és la cirurgia, que cada vegada esdevé més selectiva. En aquests moments s'estan desenvolupant noves tècniques quirúrgiques que exploren la possibilitat d'eliminar tumors sense la necessitat d'extreure'ls; en són exemples la criocirurgia, que utilitza esprai de nitrogen líquid o una sonda específica per congelar i matar cèl·lules anormals, o bé l'ús de làsers, que poden fer incisions als teixits o vaporitzar càncers en certs òrgans de forma molt específica.

Tanmateix, un millor coneixement de les bases del càncer, i més especialment dels fenòmens de metàstasi, ha posat de manifest les limitacions de la cirurgia i ha esperonat el desenvolupament d'alternatives menys invasives, que es resumeixen breument a continuació.

Teràpia hormonal

La teràpia hormonal (anomenada també *hormonoteràpia*, *tractament hormonal* o *teràpia endocrina*) és un tractament que bloqueja la capacitat de l'organisme per produir hormones o interfereix en l'activitat hormonal per tal de retardar o aturar el creixement de tumors que hi són sensibles [6].

Les teràpies hormonals van sorgir a partir dels estudis de Thomas Beatson, que va descobrir l'efecte estimulant d'una de les hormones femenines (estrogen) en el càncer de pit, abans inclús que aquesta hormona fos caracteritzada. Més endavant, Charles Huggins va demostrar la notable regressió d'un cas de càncer de pròstata després que els testicles fossin extirpats.

Noves classes de fàrmacs, com ara certs inhibidors d'aromatasa i de l'hormona LHRH (*luteinizing hormone-releasing hormone*), han canviat la manera de tractar els càncers de pit i pròstata i han permès aprofundir en la comprensió del paper de les hormones en el creixement de tumors.

Radioteràpia

La radioteràpia té com a objectiu destruir les cèl·lules canceroses sense afectar els teixits sans per mitjà de raigs X, radiació d'alta energia o ionitzant [7].

El 1896, Röntgen va descobrir els raigs X i immediatament es van començar a aplicar en la diagnosi i el tractament del càncer. Durant el segle xx es van produir avenços significatius en física d'altres energies i en tecnologia computacional, que van permetre aplicar la radiació de manera més precisa. Tècniques modernes com la radioteràpia conformacional, que permet localitzar de manera molt precisa el càncer en les tres dimensions; la radioteràpia d'intensitat modulada; la radiocirurgia estereotàctica, o la radioteràpia estereotàctica, utilitzades en tumors molt petits o en zones molt delicades, com ara el cervell, han permès tractaments més selectius i menys agressius [8].

Quimioteràpia

La quimioteràpia és el tractament farmacològic amb molècules citotòxiques per destruir les cèl·lules canceroses afectant-ne la capacitat de créixer i dividir-se [9]. Es considera que l'ús del metotrexat, un derivat de l'aminopterina, en el tractament de la leucèmia infantil [10] va marcar l'inici de la quimioteràpia.

Al llarg dels anys, els fàrmacs quimioterapèutics han curat o bé han provocat regressions en leucèmia limfoblàstica aguda, càncer de testicles, malaltia de Hodgkin, etc. Actualment, el

repte és millorar l'activitat dels fàrmacs i reduir-ne els efectes secundaris, així com desenvolupar noves tècniques d'alliberament més selectives. També s'estan estudiant certs agents quimioprotectors per tal d'evitar la resistència als multifàrmacs i les anomenades *teràpies adjuvants*, que s'apliquen quan s'ha practicat cirurgia o radioteràpia.

Immunoteràpia i teràpies dirigides

Durant les dues darreres dècades, el paradigma de les teràpies del càncer ha evolucionat des de l'ús d'agents relativament inespecífics cap a tractaments més selectius, basats en un mecanisme cel·lular concret. La quimioteràpia més clàssica del càncer es veu limitada per un índex terapèutic molt estret, acompanyat de toxicitats significatives i, freqüentment, resistència adquirida. Una millor comprensió de la patogènesi del càncer ha donat lloc més recentment a alternatives com ara la immunoteràpia i les teràpies dirigides [11].

L'objectiu de la immunoteràpia és estimular la resposta immunològica natural per tal de disminuir el creixement de les cèl·lules tumorals o bé ajudar les cèl·lules sanes a controlar el desenvolupament del càncer. Exemples destacats són els interferons, les interleuquines i les citoquines. Una vegada identificades les dianes tumorals (antígens), es busquen anticossos selectius per a aquestes dianes. A partir d'aquesta idea, s'han sintetitzat anticossos monoclonals que són específics per interaccionar amb certs components presents a les cèl·lules canceroses. Alguns exemples són el rituximab i el trastuzumab, utilitzats per tractar limfomes i càncer de mama, o el sipuleucel-T, aprovat per la FDA (Food and Drug Administration) dels EUA el 2010, per combatre un tipus de càncer de pròstata metastàtic.

D'altra banda, les teràpies dirigides actuen sobre les vies moleculars relacionades amb la divisió, el creixement, el manteniment i la migració de cèl·lules canceroses, així com els senyals que porten a la mort natural (apoptosi). Aquestes teràpies abasten diferents àmbits. Així, els inhibidors dels factors de creixement permeten el control de les formes anormals o la sobreexpressió d'aquests factors; els inhibidors d'angiogènesi aturen la formació de nous vasos sanguinis que proveeixen el tumor d'oxigen i nutrients i els fàrmacs d'inducció d'apoptosi actuen específicament sobre els mecanismes que controlen la supervivència o la mort cel·lular. A continua-

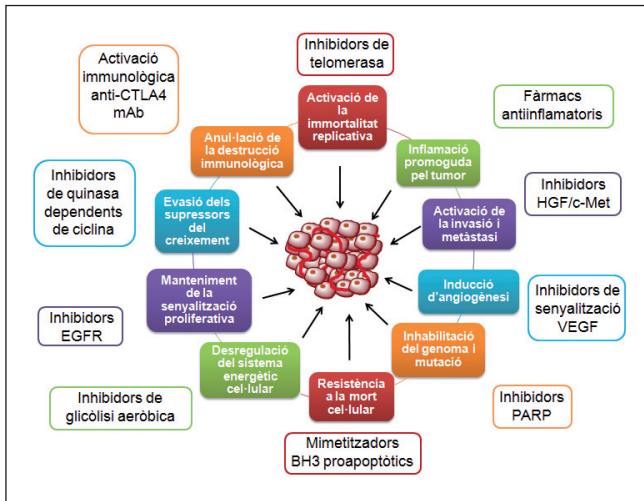


FIGURA 3. Diferents línies que comprenen les teràpies dirigides.

ció es presenta un esquema general amb l'abast de les teràpies dirigides (figura 3).

Nanotecnologia

La nanotecnologia és un camp multidisciplinari emergent que abasta tant el disseny com la caracterització, producció i aplicació d'estructures, dispositius i sistemes a escala nanomètrica (figura 4). En les tres darreres dècades, la nanotecnologia s'ha focalitzat a comprendre la correlació entre les propietats òptiques, elèctriques i magnètiques dels nanomaterials amb relació a la mida, la forma i la química de les superfícies. Tots aquests estudis han donat lloc a una fonamentació sòlida en el camp de l'enginyeria de dispositius electrònics, computacionals i biomèdics [12-15].

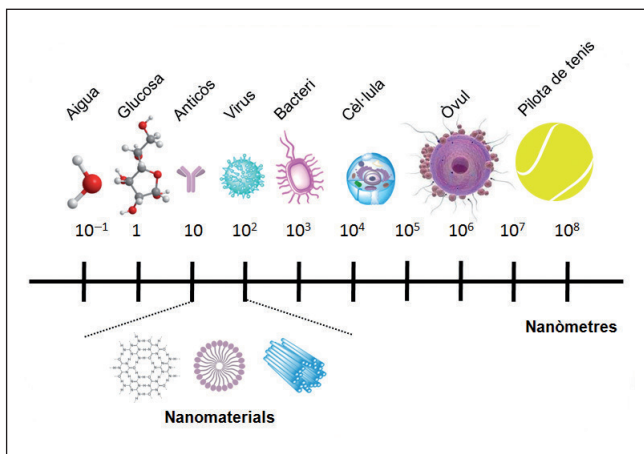


FIGURA 4. Comparació de diferents entitats dins l'escala nanomètrica.

Més específicament, la nanotecnologia aplicada al càncer busca caracteritzar la interacció de nanodispositius amb les estructures cel·lulars i moleculars que es relacionen amb la teràpia i el diagnòstic d'aquesta malaltia [14]. Els materials nanomètrics presenten certs avantatges potencials respecte dels fàrmacs tradicionals. En primer lloc, tenen la capacitat de dirigir-se més selectivament cap als teixits tumorals a través d'uns perfils farmacocinètics i farmacodinàmics millorats [16]. En segon lloc, són capaços de creuar les barreres biològiques més eficientment a conseqüència d'una mida i unes propietats fisicoquímiques peculiars [17]. Finalment, protegeixen la molècula activa de processos de degradació o inactivació durant el transport [18]. El conjunt d'aquestes tres característiques es pot traduir en un increment de l'índex terapèutic, una reducció dels efectes secundaris sistèmics i, per tant, una millora en la qualitat de vida del pacient.

Durant els darrers vint anys s'ha desenvolupat una gran varietat de vehicles nanomètrics per a ús terapèutic, com ara liposomes, micelles [14], *quantum dots*, *nanoshells*, partícules d'or, partícules paramagnètiques i nanotubs de carboni [13]. A la taula 1 es presenten algunes aplicacions d'aquests nanomaterials dins de l'àmbit del càncer.

TAULA 1. Llista d'alguns nanomaterials i les seves aplicacions [14]

Tipus	Aplicació
Liposomes	Tècniques d'imatge Alliberament de fàrmacs
<i>Quantum dots</i>	Tècniques d'imatge
<i>Nanoshells</i>	Tècniques d'imatge Ablació fototèrmica Alliberament de fàrmacs
Partícules d'or	Tècniques d'imatge Ablació fototèrmica Sensibilitzador de radiació Alliberament de fàrmacs
Partícules paramagnètiques	Tècniques d'imatge Adreçament de fàrmacs per camp magnètic
Nanotubs de carboni	Tècniques d'imatge Ablació fototèrmica Alliberament de fàrmacs

Les nanocàpsules en el marc de les teràpies dirigides

Els fàrmacs que hem escollit, administrats intravenosament dins de les nanocàpsules, han de circular en sang intentant

evitar el sistema del reticle endotelial (RES), creuar una o diverses barreres biològiques (mucoses, epiteli, endoteli...) abans de difondre's a través de la membrana plasmàtica i, finalment, accedir a l'òrganul on han de fer la seva funció terapèutica [19]. La comprensió de les interaccions biològiques que s'estableixen al llarg d'aquest camí és indispensable per desenvolupar un sistema que tingui les propietats adequades per maximitzar-ne el potencial terapèutic [15].

És per aquest motiu que hi ha un ventall força ampli de factors que desenvolupen un paper important. Els més destacats són l'elecció del material polimèric transportador, que és el que està en contacte directe amb l'organisme i el sistema immunitari, i les propietats estructurals i fisicoquímiques de la nanocàpsula, que dicten les interaccions que s'estableixen amb els sistemes biològics i el seu temps de retenció a l'organisme [20].

Els polímers més utilitzats són aquells dels quals s'ha demostrat la biocompatibilitat, una circulació prolongada en sang i una certa capacitat de modificació química per optimitzar-ne les propietats. Alguns exemples són estructures de poli(lactida-co-glicolida), poli(etilenglicol), àcid polilàctic i poliuretà [21, 22].

D'altra banda, la mida de la nanocàpsula té una influència molt marcada en la distribució, el temps de circulació i la retenció en tumors a causa de l'efecte EPR (*enhanced permeation retention*). Aquest efecte es basa en el fet que la zona tumoral resulta molt més permeable i heterogènia a conseqüència dels processos accelerats d'angiogènesi. Aquesta ràpida formació de vasos sanguinis genera espais buits, de fins a 700 nm en zones d'inflamació [23], a través dels quals les nanocàpsules es poden difondre [24]. Molts investigadors han aprofitat aquest fet per sintetitzar nanocàpsules que tinguin uns diàmetres adaptats a aquests requeriments. Aquest fenomen d'adreçament passiu (*passive targeting*) permet l'acumulació de les nanocàpsules en zones patològiques.

No obstant això, un recent treball de Cabral i col·laboradors demostra que no tot l'interval de mides és adequat per aconseguir una resposta biològica favorable. L'estudi dut a terme per a un ventall de nanocàpsules de diferents diàmetres (30-100 nm) i del mateix material confirma que només les més petites tenen la capacitat de penetrar i acumular-se en tumors de pàncrees de difícil permeabilització [25].

Un altre paràmetre rellevant és la propietat superficial de la nanocàpsula. Les nanocàpsules tenen una relació superfície-volum molt alta en comparació de partícules més grans, factor que esdevé crític i que cal controlar [16].

És ben coneguda la importància de la càrrega superficial en el procés d'internalització cel·lular. Els resultats apunten que les càpsules neutres i les aniòniques tenen una menor entrada a les cèl·lules tumorals que les catiòniques. Això es deu al fet que les espècies catiòniques presenten una alta afinitat per les glicoproteïnes (carregades negativament) presents a la superfície de la majoria de les cèl·lules, tot i que poden arribar a ser tòxiques. D'altra banda, la càrrega negativa de l'interior dels vasos sanguinis deguda a l'abundància de components aniònics que s'hi troben [26] repel·leix les nanocàpsules carregades negativament, de manera que n'allarga la vida en sang [16]. En resum, no sembla existir una càrrega òptima superficial per a la nanocàpsula, sinó que depèn de les condicions biològiques en les quals es troba (en circulació o en teixit).

Un altre requisit és que la nanocàpsula es mantingui dispersada en el medi biològic, principalment en el medi sanguini o limfàtic. Les proteïnes o cèl·lules del sistema immunològic poden agregar-se ràpidament al voltant de les nanocàpsules i fer que siguin transportades a diversos òrgans perquè siguin eliminades ràpidament. Per evitar-ho, la seva superfície es pot funcionalitzar amb una capa polimèrica hidròfila que redueixi les forces de Van der Waals entre partícules i repel·leixi les proteïnes del plasma. Això afavoreix la circulació en sang i retarda la captura per les cèl·lules fagocítiques [27, 28]. Els polímers no iònics hidròfils, com ara el poli(òxid d'etilè), el poli(etilenglicol) i el poli(alcohol vinílic), compleixen aquests requisits [26].

Una altra forma de millorar la selectivitat de les nanocàpsules envers les cèl·lules tumorals és enllaçant a la seva superfície un lligand específic. D'aquesta manera es pot aconseguir un punt d'ancoratge a un tipus de cèl·lules que expressin un determinat receptor i, en conseqüència, incrementar-ne l'acumulació. Malgrat que sembli una proposta molt atractiva, alguns estudis han demostrat que aquesta estratègia d'adreçament actiu (*active targeting*) provoca, efectivament, un increment de l'acumulació en el tumor, però, al mateix temps, una alta concentració al fetge [15, 18]. La relació entre l'anomenat *active targeting* i el *passive targeting* es resumeix a la figura 5.

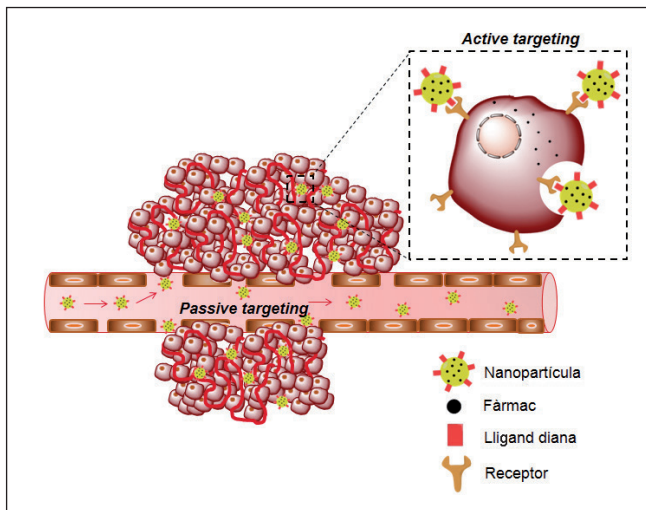


FIGURA 5. Diferents estratègies d'interacció entre les nanopartícules i les cèl·lules tumorals.

Evolució dels nanomaterials

La primera generació de nanomaterials es basava en el desenvolupament de nous materials biocompatibles i de baixa toxicitat, els quals es funcionalitzaven amb molècules senzilles. Tot i que aquests primers nanomaterials no eren gaire estables en el medi de cultiu cel·lular i eren eliminats de l'organisme molt ràpidament, van representar un primer pas molt important.

La segona generació de nanomaterials va millorar la primera en dos aspectes significatius: se'n va allargar la circulació (utilitzant polímers com el PEG) per tal d'assegurar un alliberament del fàrmac de manera continuada i es va explotar l'*active targeting* amb diferents lligands amb l'objectiu d'incrementar l'acumulació de les nanocàpsules al tumor. Malgrat els avenços en el camp de la segona generació de nanomaterials, es va fer palès que existia una dependència excessiva en l'efecte EPR i que els avantatges de l'*active targeting* es contrarestaven amb el fet que les nanocàpsules tendien a interaccionar de forma poc selectiva amb diversos receptors, la

qual cosa feia que només una petita concentració pogués arribar a la diana desitjada.

Tenint en compte els avantatges i els inconvenients de les generacions anteriors, ha sorgit un nou tipus de gènere que rep el nom de *materials intel·ligents* (*smart materials*).

Aquests materials presenten un comportament dinàmic que respon a estímuls biològics, físics o químics, en lloc de fonamentar-se en la retenció passiva o en els lligands endògens tumorals. El senyal desencadena un canvi en el nanomaterial que provoca l'alliberament del fàrmac. Hi ha diferents estímuls que poden induir una resposta d'aquest tipus, com, per exemple, el fet que els tumors presenten un pH lleugerament més àcid, una menor concentració d'oxigen (hipòxia), una activitat metabòlica més accelerada que els teixits sans o un entorn reductor (figura 6).

Disseny i preparació de nanocàpsules adequades per a l'administració de fàrmacs

A Ecopol Tech, SL s'està treballant en la nanoencapsulació de diferents ingredients bioactius a partir de polímers reactius biocompatibles, degradables en presència de L-glutatió i amb propietats fisicoquímiques modulables. La finalitat de la nanoencapsulació no és cap altra que millorar la biodisponibilitat, la biodistribució i la farmacocinètica del fàrmac per tal de maximitzar l'índex terapèutic i reduir els efectes secundaris sistèmics.

En el nostre projecte, estem preparant nanocàpsules polimèriques a les quals demanem que compleixin diferents requisits. En primer lloc, cal que tinguin una mida controlada amb l'objectiu d'assegurar que no quedin retingudes en els filtres biològics (fetge, pulmó, melsa, etc.) i que es puguin difondre passivament a través de la zona neovascularitzada del tumor

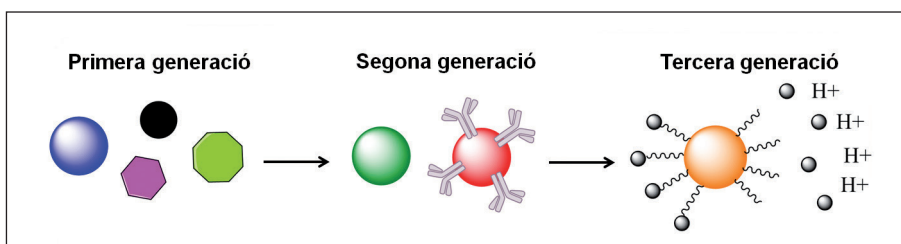
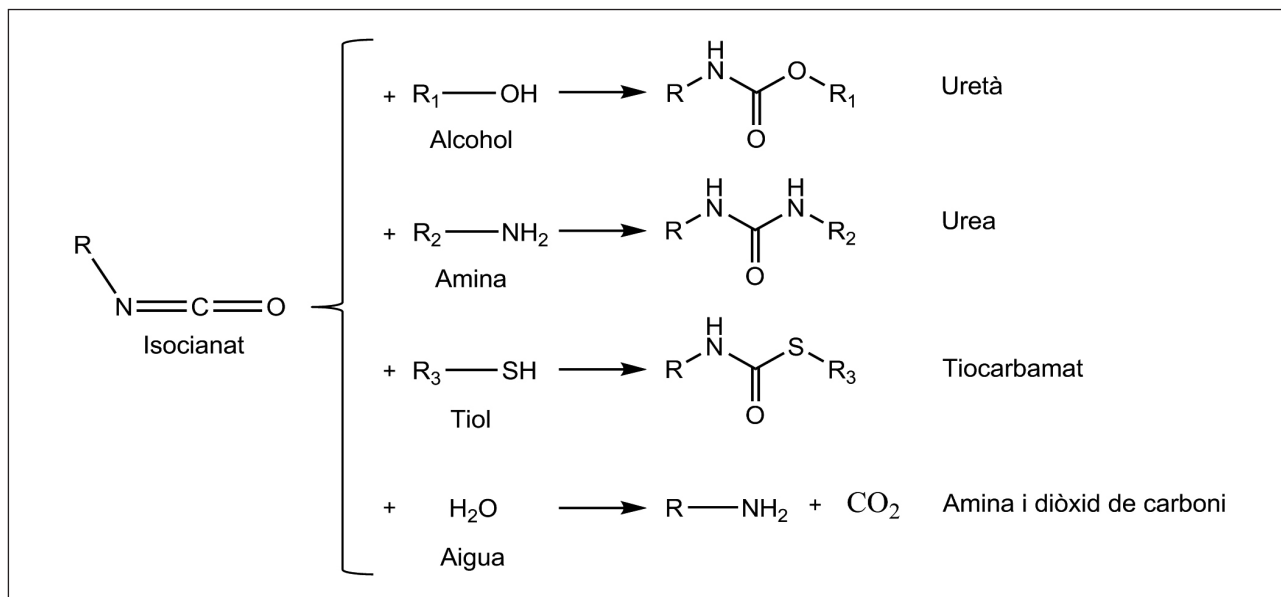


FIGURA 6. Esquema de l'evolució dels nanomaterials.



ESQUEMA 1. Derivats d'isocianat d'alquil.

(efecte EPR). També és important un ajust del diàmetre de les nanocàpsules per tal que no siguin tan fàcilment reconegudes pels elements del RES.

En segon lloc, la paret de les nanocàpsules ha de contenir cadenes hidròfiles per tal que puguin envoltar la nanocàpsula i crear un entorn adequat per evitar la interacció amb proteïnes del plasma o elements del RES.

En tercer lloc, el sistema ha de presentar un comportament dinàmic en el qual es modulin les característiques superficials de les nanocàpsules en funció de les condicions biològiques on es trobin. En aquest sentit, estem treballant per aconseguir la composició polimèrica òptima que afavoreixi una vida prolongada en sang i, a la vegada, una fàcil internalització dins les cèl·lules tumorals.

Finalment, la paret de les nanocàpsules ha d'incloure un element làbil que les faci degradables sota unes determinades condicions biològiques. En el nostre cas, el mecanisme d'alliberament del fàrmac és mitjançant la ruptura dels ponts disulfur per l'acció del L-glutatió, un oligopèptid que és més abundant a l'interior de les cèl·lules tumorals que en les sanes.

És important que la paret de la nanocàpsula sigui robusta, fet que es pot aconseguir si el prepolímer conté els grups funcionals adequats per poder formar una xarxa sòlida (*cross-*

linking). Aquesta característica és el que diferencia els liposomes, amb una capa exterior constituïda per lípids, de les nanocàpsules, on la paret és més robusta i consistent.

El punt clau per aconseguir sistemes que compleixin aquests requeriments és el disseny adequat del que s'anomena *prepolímer reactiu*. El mètode que hem desenvolupat és molt versàtil, empra condicions de reacció suaus i no són necessaris processos de purificació. La síntesi del prepolímer i de les nanocàpsules es basa en la química dels poliuretans i les poliurees, els quals són els productes de la reacció de poliaddició d'isocianats amb polialcohols i poliamines, respectivament (esquema 1).

Aquests derivats d'isocianat (poliurees i poliuretans funcionalitzats) són presents a la paret de les nanocàpsules i permeten introduir elements que allarguen el temps de circulació, una selectivitat envers el tumor, una bona internalització cel·lular i un alliberament controlat *in vivo*. Atès que tots els paràmetres poden interaccionar entre si i que modificant-ne un es pot afectar negativament un altre, les nanocàpsules han de treballar adequadament i de forma intel·ligent per tal que aquestes funcionalitats actuïn en el moment precís i en el lloc desitjat. A més, cal que la síntesi d'aquests nanomaterials polifuncionals pugui ser fàcilment aplicable a l'àmbit industrial. Un tipus de material que compleix aquests requisits és el poliuretà, que ha estat utilitzat com a biomaterial en implants des de l'any 1967 [19].

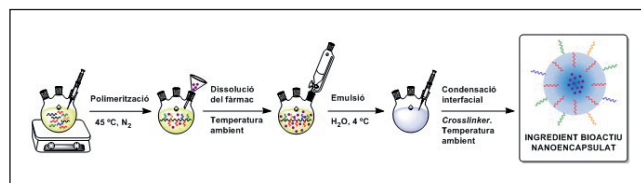
A la pràctica, el procés d'encapsulació comença amb la polimerització dels monòmers que formen el prepolímer i que tenen les funcionalitats comentades anteriorment.

El pas següent del procés és la dispersió de la molècula lipòfila (el fàrmac) en el sistema polimèric prèviament sintetitzat. Gràcies a un ajust òptim dels grups hidròfils i hidròfobs del prepolímer, és possible dispersar fàcilment una gran varietat de substàncies insolubles sense la necessitat d'emulsionants externs ni agitacions vigoroses. És aquí on es posa de manifest la importància de la versatilitat sintètica d'aquest prepolímer.

Aquest balanç d'hidrofòbia/hidrofília és també clau en el pas següent, en el qual la mescla polimèrica ha d'esdevenir una nanoemulsió aquosa i, per tant, es fa necessària la presència de grups hidròfils estabilitzadors.

Posteriorment a la inversió de fase, s'addiciona el reactiu d'entrecreuament (*crosslinker*) per tal d'unir covalentment tots els punts reactius del prepolímer i completar la formació de la paret, amb la qual cosa es dona lloc a un polímer acabat. El resultat d'aquest procés és una dispersió aquosa de nanocàpsules polimèriques carregades amb un principi actiu lipòfil (esquema 2).

La versatilitat d'aquest mètode fa que pugui ser aplicable a diversos tipus d'ingredients bioactius, sempre que siguin lipòfils i no presentin grups molt reactius (nucleòfils) que puguin quedar modificats irreversiblement per l'acció dels iso-



ESQUEMA 2. Procés de la nanoencapsulació.

cianats. La molècula utilitzada inicialment en el nostre grup de treball ha estat un anticancerós d'origen marí anomenat *plitidepsina* [29-33]. Actualment, estem aplicant el sistema a diversos fàrmacs, com el paclitaxel (a), la curcumina (b), l'HL3 [34] (c) i l'HL4 [34] (d), compostos que es mostren a la figura 7.

La nanoencapsulació d'aquests quatre ingredients bioactius ha estat reproduïble pel que fa a morfologia de les nanocàpsules, mida mitjana de partícula i degradació per L-glutatió *in vitro*. Dels quatre compostos esmentats, hem avançat més en la nanoencapsulació i la programació de proves biològiques amb el paclitaxel. Hem escollit aquest fàrmac perquè s'utilitza actualment en clínica humana, està acceptat per la FDA i se'n coneix el mecanisme d'acció.

Tècniques per a l'estudi i la caracterització de les nanocàpsules

Per estudiar la morfologia de les nanocàpsules, s'ha utilitzat microscòpia TEM (*transmission electron microscopy*), mitjançant tinció negativa de les nanocàpsules amb acetat d'uranil.

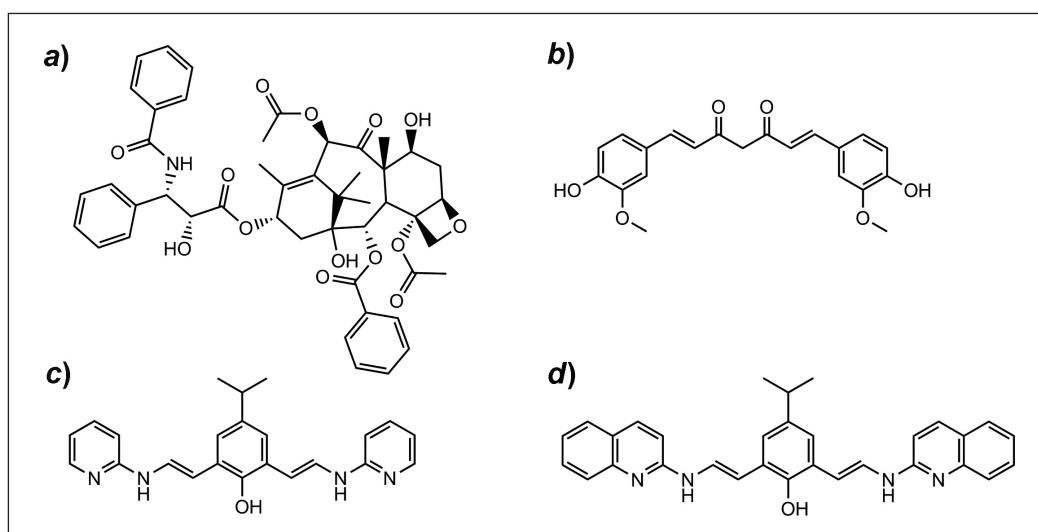


FIGURA 7. Ingredients bioactius emprats en la nanoencapsulació.

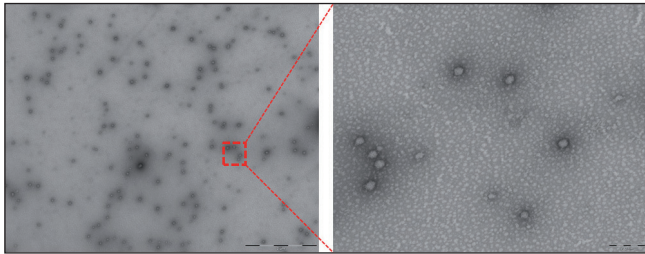


FIGURA 8. Micrografies TEM de nanocàpsules. A l'esquerra es mostra una visió panoràmica de la mostra; a la dreta, un zoom de la zona.

Les micrografies TEM mostren una morfologia homogènia i esfèrica (figura 8).

D'altra banda, l'estudi de la distribució de la mida de partícula per mitjà de la tècnica DLS (*dynamic light scattering*) demostra que el diàmetre mitjà de les nanocàpsules està al voltant dels 20 nm, i que no existeixen poblacions significatives per sobre dels 50 nm (figura 9).

Finalment, s'ha volgut comprovar mitjançant microscòpia TEM que les nanocàpsules són degradables quan s'hi aplica una concentració de 10 mM de L-glutatió a 37 °C durant diferents intervals de temps. La reacció d'aquest compost amb els ponts disulfur presents en les nanocàpsules fa que, una vegada aquests s'han trencat, les propietats de la paret canviïn de manera que els polímers que la formen es desestabilitzen i formen els agregats observats a les imatges.

A la figura 10 es mostra una imatge de les nanocàpsules abans (a) i després d'afegir L-glutatió al cap de 4 (b), 12 (c) i 24 (d) hores.

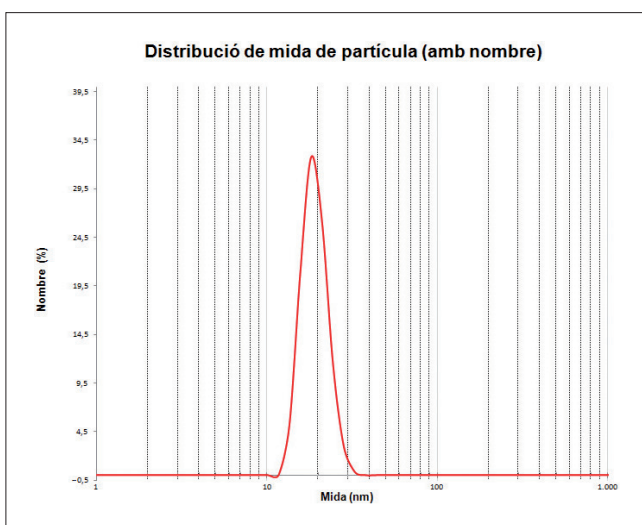


FIGURA 9. Distribució de la mida de partícula de les nanocàpsules.

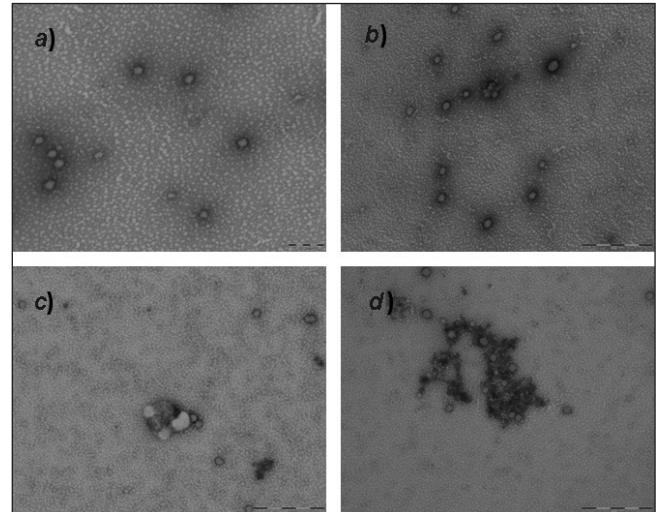


FIGURA 10. Efecte de L-glutatió (10 mM) a 37 °C sobre nanocàpsules.

En aquests moments, estem treballant en l'optimització de la síntesi del prepolímer per tal d'aconseguir que les nanocàpsules resultants responguin a canvis d'acidesa del medi. Més específicament, estem sintetitzant diferents variants del prepolímer amb l'objectiu que les nanocàpsules tinguin una circulació prolongada en sang i que, en condicions lleugerament àcides (entorn tumoral), canviïn les seves propietats superficials per afavorir la internalització cel·lular.

Conclusions

L'ús de nanocàpsules polimèriques sintetitzades mitjançant el nostre mètode s'ha mostrat versàtil i fàcilment aplicable industrialment. Sembla, per tant, una bona eina per aconseguir sistemes nanomètrics «a mida» i que responguin a diferents requeriments.

En la preparació, les nanocàpsules presenten una morfologia controlada uniforme i esfèrica, segons estudis duts a terme per TEM i DLS. A més, s'ha comprovat que el polímer utilitzat per a la construcció de les nanocàpsules és degradat per l'acció *in vitro* de L-glutatió.

Finalment, el mètode és potencialment aplicable a altres tipus d'ingredients bioactius lipòfils i se n'ha demostrat la reproductibilitat pel que fa a mida, morfologia i capacitat de degradació *in vitro* quan s'utilitza com a principi actiu la curcumi-na, l'HL3 i l'HL4.

Agraïments

Els autors agraïeixen a l'AGAUR (Generalitat de Catalunya) l'ajuda per al doctorat industrial de Cristina Cuscó Marigó. També a Pau Rocas el fet d'haver iniciat aquesta línia de recerca. Finalment, cal agrair al professor Patrick Gámez (ICREA) i a Rosa F. Brissos la cessió generosa dels lligands HL3 i HL4.

Referències i altres fonts

- [1] JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. «Global cancer statistics». *CA-Cancer J. Clin.*, núm. 61 (2011), p. 69-90.
- [2] FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; MAXWELL PARKIN, D.; FORMAN, D.; BRAY, F. «Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012». *Int. J. Cancer*, núm. 136 (2014), p. E359-E386.
- [3] American Cancer Society: <http://www.cancer.org/cancer/basics> [Consulta: 3 març 2015].
- [4] BRAY, F.; JEMAL, A.; GREY, N.; FERLAY, J.; FORMAN, D. «Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030)». *Lancet Oncol.*, núm. 13 (2012), p. 790-801.
- [5] WEINBERG, R. A. *The biology of cancer*. 2a ed. Nova York: Garland Science; Taylor & Francis, 2014, p. 31-32.
- [6] National Cancer Institute: <http://www.cancer.gov> [Consulta: 8 març 2015].
- [7] *Cancer.net*: <http://www.cancer.net> [Consulta: 9 març 2015].
- [8] American Cancer Society: <http://www.cancer.org/treatment> [Consulta: 9 març 2015].
- [9] AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer facts & figures 2015*. Atlanta: American Cancer Society, 2015.
- [10] DeVITA JR., V. T.; CHU, E. «A history of cancer chemotherapy». *Cancer Res.*, núm. 68 (2008), p. 8643-8653.
- [11] VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. «Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment». *Nat. Rev. Cancer*, núm. 12 (2012), p. 237-251.
- [12] McNEIL, S. E. «Unique benefits of nanotechnology to drug delivery and diagnostics». *Methods Mol. Biol.*, núm. 697 (2011), p. 3-8.
- [13] BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. «Nanomedicine, nanotechnology in medicine». *C. R. Phys.*, núm. 12 (2011), p. 620-636.
- [14] CUENCA, A. G.; JIANG, H.; HOCHWALD, S. N.; DELANO, M.; CANCE, W. G.; GROBMYER, S. R. «Emerging implication of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics». *Cancer*, núm. 107 (2006), p. 459-466.
- [15] ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. W. «The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems». *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, núm. 14 (2012), p. 1-16.
- [16] DAVIS, M. E.; CHEN, Z. G.; SHIN, D. M. «Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer». *Nat. Rev. Drug Discov.*, núm. 7 (2008), p. 771-781.
- [17] FERRARI, M. «Cancer nanotechnology: opportunities and challenges». *Nat. Rev. Cancer*, núm. 5 (2005), p. 161-171.
- [18] BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. «Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, núm. 64 (2012), p. 24-36.
- [19] AKINC, A.; BATTAGLIA, G. «Exploiting endocytosis for nanomedicines». *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, núm. 5 (2013), p. 1-24.
- [20] GOETHALS, E. C.; ELBAZ, A.; LOPATA, A. L.; BHARGAVA, S. K.; BANSAL, V. «Decoupling the effects of the size, wall thickness, and porosity of curcumin-loaded chitosan nanocapsules on their anticancer efficacy: size is the winner». *Langmuir*, núm. 29 (2013), p. 658-666.
- [21] GIAMONA, G.; FIORICA, C.; STEFANO, M. di; PALUMBO, F. S.; PITARRESI, G. «Biocompatible polymers and processing techniques in drug delivery and tissue engineering». *J. Pharm. Drug Dev.*, núm. 1 (2013), p. 1-3.
- [22] MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C. «Capture of stealth nanoparticles by the body's defences». *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, núm. 18 (2001), p. 527-550.
- [23] MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, C. «Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice». *Pharmacol. Rev.*, núm. 53 (2001), p. 283-318.
- [24] DING, M.; SONG, N.; HE, X.; LI, J.; SHOU, L.; TAN, H.; FU, Q.; GU, Q. «Toward the next-generation nanomedicines: design of multifunctional multiblock polyurethanes for effective cancer treatment». *ACS Nano*, núm. 7 (2013), p. 1918-1928.
- [25] CABRAL, H.; MATSUMOTO, Y.; MIZUNO, K.; CHEN, W.; MURAKAMI, M.; KIMURA, M.; TERADA, Y.; KANO, M. R.; MIYAZONO, K.; UESAKA, M.; NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K. «Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size». *Nat. Nanotech.*, núm. 6 (2011), p. 815-823.
- [26] WANG, M.; MILLER, A. D.; THANOU, M. «Effect of surface charge and ligand organization on the specific cell-uptake of uPAR-targeted nanoparticles». *J. Drug Target.*, núm. 21 (2013), p. 684-692.
- [27] MOGHIMI, S. M.; SZEBENI, J. «Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics,

opsonisation and protein-binding properties». *Prog. Lipid Res.*, núm. 42 (2003), p. 463-478.

[28] BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. «Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, núm. 64 (2012), p. 206-212.

[29] ROCAS, J.; ROCAS-ALONSO, P. «Method for the production of a microencapsulate, and corresponding reactive amphiphilic compound, microencapsulate and composition».

WO2014114838A2, 2014.

[30] ROCAS, J.; ROCAS-ALONSO, P.; ALBERICIO, F. «Highly tunable amphiphilic nanocapsules for cancer treatment». Pòster 1.036, presentat a *Frontiers in polymer science*, 21-23 de maig de 2013, Sitges, Espanya.

[31] ROCAS, J.; SOLÉ, B.; ROCAS-ALONSO, P. «Biocompatible and biodegradable polyurea-polurethane nano-microcapsules formed via interfacial polymerization with high antioxidative properties». Pòster 2.34, presentat a *Frontiers in polymer science*, 21-23 de maig de 2013, Sitges, Espanya.

[32] ROCAS-ALONSO, P.; FERNÁNDEZ, Y.; SCHWARTZ JR., S.; ABRASOLO, I.; ALBERICIO, F.; ROCAS, J. «Self-stratified polyurethane-polyurea crosslinked nanocapsules for specific drug delivery». Pòster presentat al 10th International Symposium on Polymer Therapeutics: *From laboratory to clinical practice*, 19-21 de maig de 2014, València, Espanya.

[33] ROCAS-ALONSO, P.; HOYOS-NOGUÉS, M.; ROCAS, J.; ALBERICIO, F.; MANERO, J. M.; GIL, J.; MAS-MORUNO, C. «Installing multifunctionality on titanium with RGD-decorated polymeric nanocapsules: towards new osteointegrative therapies». Pòster 117, presentat a la 26th Annual Conference of the European Society for Biomaterials, 31 d'agost-3 de setembre de 2014, Liverpool, Regne Unit.

[34] BRISSOS, R. F.; TORRENTS, E.; DOS SANTOS MELLO, F. M.; PIRES, W. C.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; CABALLERO, A. B.; CAUBET, A.; MASSERA, C.; ROUBEAU, O.; TEAT, S. J.; GÁMEZ, P. «Highly cytotoxic DNA-interacting copper(II) coordination compounds». *Metallomics*, núm. 6 (2014), p. 1863-1868.



C. Cuscó



J. Rocas



J. Garcia



E. Nicolás

Cristina Cuscó és llicenciada en química per la Universitat de Barcelona (UB), on també va cursar un màster en biotecnologia molecular. Actualment, està fent el doctorat industrial a l'empresa Ecol Tech, SL, juntament amb la UB, en l'àmbit de les nanocàpsules polimèriques per a l'alliberament selectiu i controlat de diferents molècules per al tractament del càncer.

Josep Rocas és creador i director de l'empresa Ecol Tech, SL i responsable tecnològic i cotutor del projecte de recerca del doctorat industrial de Cristina Cuscó. És doctor en química orgànica per l'Institut Químic de Sarrià, amb experiència en R+D en diversos sectors industrials químics i farmacèutics, especialment en polímers nanoestructurats en base aquosa.

Jordi Garcia és catedràtic de química orgànica del Departament de Química Orgànica de la Universitat de Barcelona (UB), coordinador del grup SMBioCom i membre de l'Institut de Biomedicina de la UB (IBUB) i del CIBERobn.

Ernesto Nicolás és professor titular de química orgànica del Departament de Química Orgànica de la Universitat de Barcelona (UB), membre del grup SMBioCom i de l'Institut de Biomedicina de la UB (IBUB).