



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Diseño y síntesis de nanosistemas derivatizados con péptidos y su aplicación en biomedicina

Aimee Vasconcelos Pacheco

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA

Diseño y síntesis de nanosistemas
derivatizados con péptidos y su aplicación en
biomedicina



Aimee Vasconcelos Pacheco

Barcelona, 2015



B Universitat de Barcelona

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Instituto de Química Avanzada de Cataluña

Departamento de Química Biomédica

Programa de doctorado “Investigación, desarrollo y control de medicamentos”

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE NANOSISTEMAS DERIVATIZADOS CON
PÉPTIDOS Y SU APLICACIÓN EN BIOMEDICINA**

Memoria presentada por Aimee Vasconcelos Pacheco para optar al grado de doctor
por la Universidad de Barcelona

Directora:

Dra. Isabel Haro Villar

Investigador Científico

Dept. Química Biomédica

IQAC-CSIC

Tutora:

Dra. María Luisa García López

Profesora Titular

Dept. de Fisicoquímica

Universidad de Barcelona

Doctoranda: Aimee Vasconcelos Pacheco

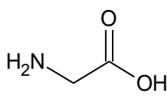
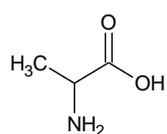
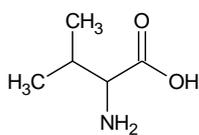
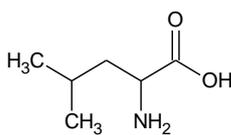
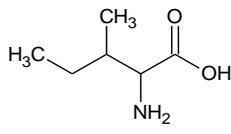
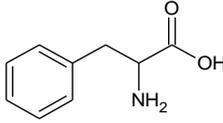
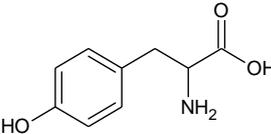
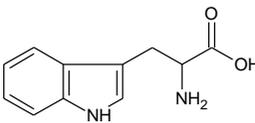
Barcelona, 2015

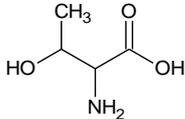
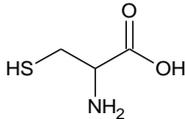
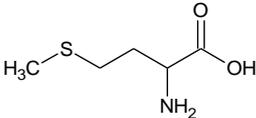
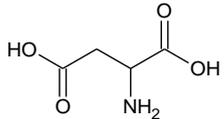
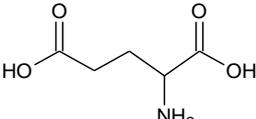
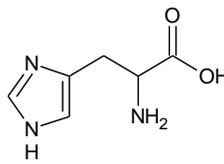
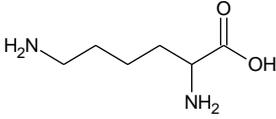
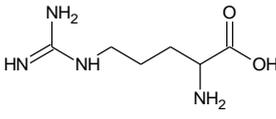
eviaturas, acrónimos y símbolos

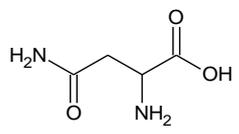
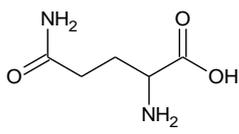
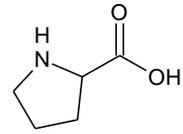
Aa	Aminoácido
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AINE	Fármaco antiinflamatorio no esteroideo
AS	Araquidonato de sodio
BME	2-mercaptoetanol
Boc	terc-butiloxicarbonilo
CAM	Membrana corioalantoidea
CLSM	Microscopía confocal de barrido
CPPs	<i>Cell penetrating peptides</i>
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DIPCDI	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
EA	Eficiencia de asociación
EDC	Hidrocloreuro 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodimida
F68	Poloxamer 188 (Lutrol® F68)
FB	Flurbiprofeno
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
FTIR	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier
GalCer	Galactosilceramida
GBV-C	GB virus C
HATU	2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexfluorofosfato
HIV-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
hp-β-cd	Hidroxipropil-β-ciclodextrina
IC50	Concentración que inhibe el 50% la fusión celular
IIO	Indice de irritación ocular
MTT	Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Mw	Peso molecular
NHS	N-hidroxisuccinimida
NPs	Nanopartículas
PAntp	Factor de transcripción homeótico antenapedia de <i>Drosophila</i>
PBS	Tampón fosfato salino

Abreviaturas, acrónimos y símbolos

PC	Fosfatidilcolina
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PEG	Polietilenglicol
PEO	Polióxido de etileno
PF	<i>Péptido de fusión</i>
PGA	Ácido glicólico
PHB	Poli- β -hidroxibutirato
PLA	Ácido láctico
PMLA	Ácido poli (β ,l-málico)
POD	<i>Peptide for Ocular Delivery</i>
PS	Fosfatidilserina
<i>PTDs</i>	<i>Protein Transduction Domain</i>
PTM	Puntuación total media
PVA	Alcohol polivinílico
Rho	5(6)-Carboxi-tetrametilrodamina
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SM	Esfingiomielina
<i>SPPS</i>	Síntesis en fase sólida
STD	Diferencia de Transferencia de Saturación
Tat	Proteína activadora de la transcripción del HIV-1
TBu	Terc-butilo
TFA	Ácido trifluoroacético
TIS	Triisopropilsilano
Ttrt	Trifenilmetil
Z_{pot}	Potencial zeta

Aminoácido	Abreviatura	Símbolo	Fórmula	Estructura química
Glicina	Gly	G	$C_2H_5NO_2$	
Alanina	Ala	A	$C_3H_7NO_2$	
Valina	Val	V	$C_5H_{11}NO_2$	
Leucina	Leu	L	$C_6H_{13}NO_2$	
Isoleucina	Ile	I	$C_6H_{13}NO_2$	
Fenilalanina	Phe	F	$C_9H_{11}NO_2$	
Tirosina	Tyr	Y	$C_9H_{11}NO_3$	
Triptófano	Trp	W	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	

Aminoácido	Abreviatura	Símbolo	Fórmula	Estructura química
Treonina	Thr	T	$C_4H_9NO_3$	
Cisteína	Cys	C	$C_4H_7NO_2S$	
Metionina	Met	M	$C_5H_{11}NO_2S$	
Ácido aspartico	Asp	D	$C_4H_7NO_4$	
Ácido glutámico	Glu	E	$C_5H_9NO_4$	
Histidina	His	H	$C_6H_9N_3O_4$	
Lisina	Lys	K	$C_6H_{14}N_2O_2$	
Arginina	Arg	R	$C_6H_{14}N_4O_2$	

Aminoácido	Abreviatura	Símbolo	Fórmula	Estructura química
Asparagina	Asn	N	$C_4H_8N_2O_3$	
Glutamina	Gln	Q	$C_5H_{10}N_2O_3$	
Prolina	Pro	P	$C_5H_9NO_2$	

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Flurbiprofeno y su aplicación en la cirugía de cataratas	5
1.2 Diseño de medicamentos para uso oftálmico basados en la nanotecnología	7
1.3 Péptidos penetradores de células (<i>CPPs</i>) y su aplicación en la terapia ocular	10
1.3.1 Peptide for Ocular Delivery (POD)	12
1.4 Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1)	14
1.5 GB virus C (GBV-C)	16
1.6 Sistemas basados en la nanotecnología para el tratamiento del SIDA20	
1.6.1 Membranas biológicas y su relación con el HIV-1	22
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1 Reactivos y disolventes	33
3.2 Instrumentación	36
3.3 Síntesis de péptidos en fase sólida	37
3.3.1 Resinas	39
3.3.2 Activación y acoplamiento	41
3.3.3 Test de detección de grupos aminos	42
3.3.4 Desprotección del grupo α -amino	44
3.4 Modificaciones químicas realizadas en la peptidil-resina	44
3.4.1 Adición de sondas fluorescentes	44
3.4.2 Síntesis de lipopéptidos	45
3.5 Secado de la peptidil resina	45
3.6 Desprotección final y liberación del péptido	46
3.7 Caracterización analítica de los péptidos	46
3.7.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a escala analítica	46
3.7.2 Cromatografía de ultrapresión adaptado a espectrometría de masas de ionización por electrospray (UPLC/ES-MS)	47
3.7.3 Espectrometría de masas MALDI-TOF	47
3.8 Purificación de los péptidos	48

3.8.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a escala semipreparativa	48
3.8.2 Extracción en fase sólida	48
3.9 Obtención de NPs poliméricas que contienen FB.....	49
3.10 Síntesis de las NPs PLGA y conjugación del péptido PF-HIV-1	50
3.10.1 Ensayo STD-RMN	50
3.11 Pegilación de las NPs y conjugación de los péptidos.....	51
3.11.1 Cuantificación de PEG: Ensayo TNBS	51
3.11.2 Cuantificación de péptidos: Ensayo de Ellman.....	52
3.12 Síntesis del PLGA-PEG y PLGA-PEG-Péptido	52
3.12.1 Síntesis del PLGA-PEG-Péptido-Rho	54
3.12.2 Conjugación de las NPs PLGA-PEG-Maleimido a los péptidos anti-HIV-1	54
3.13 Obtención de liposomas derivatizados con péptidos anti-HIV-1	55
3.13.1 Método de extrusión	56
3.13.2 Método de sonicación	56
3.14 Caracterización de las formulaciones	57
3.14.1 Morfometría	57
3.14.2 Carga superficial.....	57
3.14.3 Microscopía electrónica de barrido	58
3.14.4 Microscopía de fuerza atómica	59
3.14.5 Eficiencia de asociación de FB	59
3.14.6 Concentración de péptido total.....	60
3.14.7 Determinación cuantitativa de fosfolípido.....	60
3.15 Estudio de liberación del FB de las NPs	61
3.15.1 Estudio cinético de liberación <i>in vitro</i>	62
3.16 Espectroscopía FTIR	63
3.17 Estudio de estabilidad	63
3.18 Fuerzas mucoahesivas	63
3.19 Estudios celulares	63
3.19.1 Estudio de citotoxicidad.....	63
3.19.2 Ensayo de fusión celular	65
3.20 Ensayo de susceptibilidad del HIV-1 a los péptidos.....	67

3.21 Estudio de tolerancia ocular: HET-CAM.....	68
3.22 Estudios <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>	70
3.22.1 Estudios <i>ex-vivo</i> mediante microscopía confocal laser (CLSM).....	71
3.22.2 Estudio de tolerancia ocular: Test de Draize.....	72
3.22.3 Eficacia antiinflamatoria	75
3.23 Análisis estadístico	75
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
4.1 Diseño de NPs derivatizadas con péptidos para la administración ocular de Flurbiprofeno	79
4.1.1 Síntesis, caracterización y purificación de los péptidos POD y Tat-HIV	80
4.1.2 Obtención de la formulación PLGA-NPs-PEG-Péptido.....	83
4.1.3 Obtención de los polímeros PLGA-PEG y PLGA-PEG-Péptido.....	88
4.1.4 Caracterización fisicoquímica de las NPs que contienen FB.....	93
4.1.5 Estudios morfológicos (SEM y AFM).....	96
4.1.6 Estudio de liberación <i>in vitro</i>	98
4.1.7 Espectroscopía FTIR.....	102
4.1.8 Estudios de estabilidad	104
4.1.9 Estudio de mucoadhesión	107
4.1.10 Estudio <i>ex vivo</i> de la interacción de las PLGA-PEG-Péptido-NPs con el epitelio corneal	108
4.1.11 Citotoxicidad de las PLGA-PEG-Péptido-NPs.....	113
4.1.12 Estudio de tolerancia ocular	117
4.1.13 Estudio de eficacia antiinflamatoria	119
4.2 Diseño de nanosistemas para aumentar la actividad y biodisponibilidad de péptidos GBV-C inhibidores del HIV-1	123
4.2.1 Síntesis y caracterización de los péptido P6-2 y Pal-P6-2.....	125
4.2.2 Síntesis de PLGA-PEG-NPs-P6-2.....	129
4.2.3 Obtención de liposomas derivatizados con péptidos: P6-2 y VIR-P6-2	134
4.2.4 Estudio de la viabilidad celular y actividad de inhibición de los nanosistemas derivatizados con péptidos mediante la fusión celular	137

4.2.5 Estudio de la inhibición del virus HIV-1 inducida por los péptidos y nanosistemas derivatizados con péptidos	141
4.3 Estudio de interacción de NPs PLGA-PF-HIV-1 con los péptidos E1P8 lineal y cíclico mediante el ensayo de STD-RMN	144
4.3.1 Síntesis de las NPs PLGA-PF-HIV-1	145
4.3.2 Ensayo de STD-RMN.....	148
5. CONCLUSIONES	155
6. BIBLIOGRAFÍA	159
7. ANEXOS.....	179

1. INTRODUCCIÓN

En el año 1959, el científico Richard Feynman impartió una conferencia con el sugerente título: “*Hay suficiente espacio en el fondo*”, donde planteó por primera vez cómo fabricar y manipular objetos a escala atómica, abordando los problemas con una perspectiva diferente y abriendo un nuevo mundo de posibilidades [1]. La nanotecnología es un nuevo planteamiento centrado en la comprensión y el dominio de las propiedades de la materia a escala nanométrica. Esta nueva tecnología tiene aplicación en diversos campos como la electrónica, los materiales, la energía y la medicina siendo en esta última donde presenta las expectativas más prometedoras.

La interacción entre la nanotecnología y la medicina constituye una oportunidad para llevar a cabo nuevos tratamientos o mejorar los existentes, ofreciendo nuevas soluciones en el diagnóstico, en la medicina regenerativa y actuando o estimulando los mecanismos del cuerpo humano. La nanomedicina tiene un gran impacto en el tratamiento de enfermedades como el cáncer [2-4], la diabetes [5, 6], el Alzheimer [7], el Parkinson [8] o los problemas cardiovasculares [9], inflamatorios [10] e infecciosos [11].

Por otro lado, la introducción de la nanomedicina en el ámbito de la farmacología ha revolucionado la administración de fármacos. Con la aparición de nuevos tratamientos con mayor especificidad se aumenta el rendimiento biológico y farmacológico de diferentes principios activos y se ofrecen alternativas interesantes para formular nuevas moléculas. En este sentido, se han desarrollado diversos nanosistemas para el transporte y liberación de fármacos tales como son: nanopartículas (NPs), dendrímeros, micelas, liposomas, puntos cuánticos, nanotubos de carbono y conjugados poliméricos, entre otros. Éstos se diferencian en su composición y estructura, pero todos tienen en común los mismos objetivos; ser capaces de transportar fármacos de manera específica y controlada, evitar problemas relacionados con la solubilidad del fármaco y proporcionar alternativas a las vías de administración tradicionales. En este contexto, la presente tesis

doctoral se centrará en las NPs de tipo polimérico y en los liposomas, debido a su amplia utilización en la actualidad.

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto un creciente interés en la utilización de NPs poliméricas para la administración de diferentes moléculas con actividad terapéutica. Dentro de los polímeros sintéticos más empleados, destacan los poliésteres debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Los más utilizados son el ácido láctico (PLA), el ácido glicólico (PGA) y los copolímeros formados por unidades monoméricas de ácido láctico y glicólico (PLGA), poli- ϵ -caprolactona (PCL), poli- β -hidroxibutirato (PHB), ácido poli (β ,l-málico) (PMLA) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (hp- β -cd). Los polímeros afectan de manera importante a las propiedades y estructura de las NPs, y condicionan tanto sus posibles aplicaciones como su vía de administración. De acuerdo a su estructura, las NPs poliméricas se clasifican en nanocápsulas y nanoesferas (Figura 1).

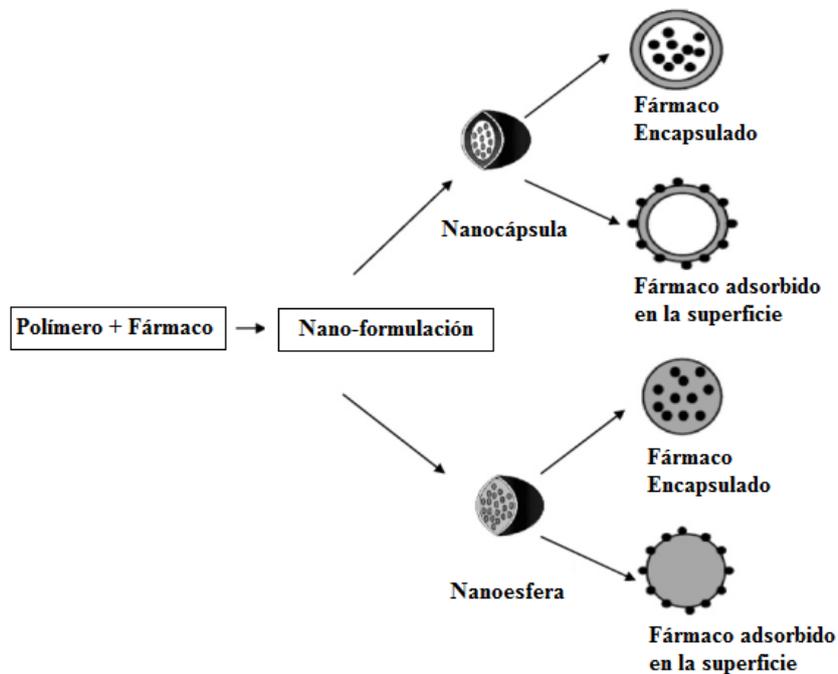


Figura 1. Representación esquemática de las nanocápsulas y nanoesferas [12]

Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que el fármaco se localiza en el interior de la partícula, generalmente disuelto en un vehículo oleoso. Las nanoesferas, en cambio, son sistemas de tipo matricial donde el fármaco se suele encontrar incorporado en el interior de la matriz. Estas últimas ofrecen una liberación controlada del fármaco alcanzándose elevados niveles terapéuticos.

El PLGA es uno de los polímeros mas utilizados para la liberación de fármacos en diferentes tejidos. Este biopolímero ha sido aprobado por la FDA para la elaboración de sistemas de liberación de fármacos y otros usos biomédicos como es la fabricación de suturas biodegradables [13]. La degradación del PLGA ocurre por hidrólisis no enzimática y sus productos son metabolizados por el ciclo de Krebs (Figura 2) [14]. Estos productos podrían dar lugar a una acumulación de sus monómeros ácidos, lo que resulta en la reducción del pH local y consecuente desnaturalización de proteínas encapsuladas en este tipo de nanosistemas [15, 16]. Sin embargo, su ausencia de toxicidad y velocidad modulable de degradación hacen del PLGA el poliéster más utilizado en formulaciones nanoparticuladas de aplicación terapéutica [17-19]. Por otro lado, el peso molecular del PLGA es un parámetro que influye en la homogeneidad de la muestra. En general, con polímeros de elevado peso molecular se obtienen sistemas nanoparticulados con menor tamaño de partícula y un bajo índice de polidispersión, los cuales son degradados mas fácilmente por el organismo [20].

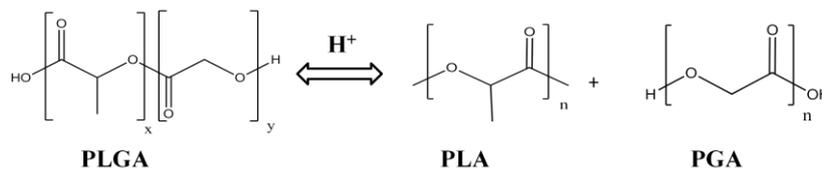


Figura 2. Hidrolisis del PLGA

Mediante la modificación de las NPs poliméricas se puede optimizar la estabilidad del fármaco encapsulado, su perfil de liberación y/o dirigir las NPs a una diana específica. En este contexto, los polímeros citados anteriormente, han sido combinados con polímeros hidrofílicos como el polietilenglicol (PEG) y el polioxido de etileno (PEO). La modificación con PEG, proceso comúnmente denominado pegilación, conlleva a importantes cambios en las propiedades físicoquímicas de las NPs. Las cadenas de PEG forman una barrera estérica en la superficie, impidiendo la opsonización y el reconocimiento por parte de los macrófagos.

Como se ha mencionado anteriormente, otro de los nanosistemas que se estudiarán son los liposomas; estructuras vesiculares submicroscópicas compuestas por moléculas anfifílicas, típicamente fosfolípidos. Al ser dispersados en agua, los fosfolípidos forman bicapas donde las cadenas hidrocarbonadas se organizan de modo que se encuentran protegidas del agua, y así el sistema es termodinámicamente favorable.

Inicialmente, estas vesículas se utilizaron como modelo de membrana biológica; Singer y Nicolson establecieron en 1972 [21] que la estructura de las mismas era la de un mosaico fluido, cohesionado por fuerzas de Van der Waals, en el cual los fosfolípidos se ordenaban en forma de bicapas. Sin embargo, este trabajo centrará su interés como sistema de transporte y liberación de fármacos. Los liposomas poseen una arquitectura molecular que les permite captar una gran variedad de agentes activos, a través de un mecanismo relativamente específico, proporcionando una vía de transporte hacia el lugar de actuación, obteniendo así una mayor respuesta terapéutica. Los liposomas se clasifican dependiendo del número de lamelas y de su tamaño (Figura 3).

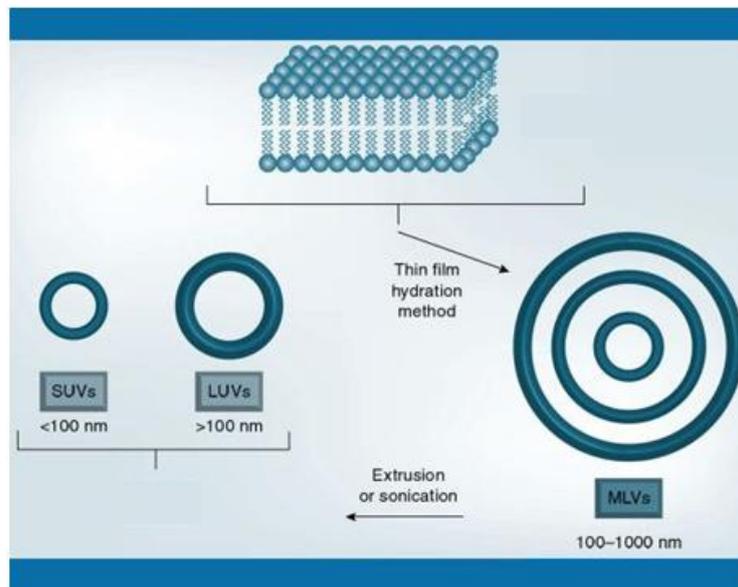


Figura 3. Estructura de los liposomas: Liposomas Multilamelares (MLVs) tienen de 7 a 10 lamelas concéntricas. Liposomas Unilamelares Grandes (LUVs) y Liposomas Unilamelares Pequeños (SUVs) presentan una sola lamela.

El presente trabajo tiene como finalidad el diseño de NPs poliméricas y liposomas para su aplicación en dos líneas de investigación diferentes: “Terapia ocular” y “Diseño de inhibidores del HIV-1”.

1.1 Flurbiprofeno y su aplicación en la cirugía de cataratas

A medida que transcurren los años, nuestro cuerpo sufre cambios que suelen limitar las actividades habituales. El sistema visual no es una excepción, existen diversas enfermedades oculares que afectan a las personas mayores, sobre todo de la tercera edad. Entre los desordenes visuales mas importantes se encuentran: el glaucoma [22], la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) [23], la retinopatía diabética [24] y las cataratas [25].

Las cataratas constituyen un importante problema de salud pública al relacionarse con la edad. Realmente no se debería clasificar como una enfermedad, sino como consecuencia del envejecimiento ocular. Consiste en la pérdida de la visión, como consecuencia de una opacidad del cristalino.

Actualmente, la cirugía es el mejor tratamiento para este tipo de patologías. La operación de cataratas se basa en la extracción de la parte del cristalino que está opacificada e implantar una lente para devolver la visión al ojo [26]. Durante la realización de la intervención quirúrgica pueden suceder posibles complicaciones tales como:

Ruptura capsular del cristalino (ruptura o rasgado de la cápsula o soporte del cristalino dificultando la colocación y estabilidad de la lente intraocular a colocar).

Luxación de masas cristalinas (tras una ruptura capsular, el contenido del cristalino cae en el interior del ojo o cavidad vítrea creando un cuadro inflamatorio y la posibilidad de complicaciones retinovítreas, como es el desprendimiento de retina).

Luxación del cristalino artificial (ante un saco capsular inestable puede luxarse la lente intraocular a cavidad vítrea).

Edema corneal (inflamación de la córnea, pérdida de transparencia corneal que provoca visión turbia y que puede ser debida a complicaciones durante la operación, mal estado de la cornea antes de la intervención o hipertensión ocular como respuesta inflamatoria más extensa).

La endoftalmitis, es la complicación más grave por la aparición de una infección intraocular (la recuperación se basa en la eliminación rápida y enérgica de la infección intraocular mediante tratamiento médico o combinado con cirugía intraocular).

El flurbiprofeno (FB) es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), de uso oftálmico, que se utiliza en la cirugía de cataratas (Figura 4) [27]. Este fármaco ayuda a prevenir la miosis intraoperatoria, reducir la inflamación postoperatoria y el riesgo de edema macular quístico [28]. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la ciclooxigenasa, impidiendo la metabolización del ácido araquidónico y, por consiguiente, la

síntesis de prostaglandinas y tromboxanos [29]. La actividad de las prostaglandinas es muy compleja, generalmente se asocia a la generación del dolor, fiebre e inflamación y por ello los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas tienen la función simultánea de analgésico, antiinflamatorio y antipirético.

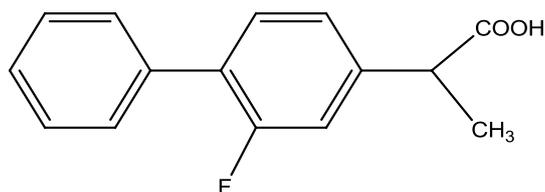


Figura 4. Estructura del Flurbiprofeno, FB (Derivado del ácido fenilalcanoico).

El Ocuferen[®] es la forma comercial del FB, que se administra tres horas antes de la cirugía para prevenir la inflamación ocular. Una de las principales desventajas de este fármaco es que no consigue altos niveles terapéuticos. Los desafíos que se presentan para este tipo de formulaciones son el aumento de la permeación del principio activo a los tejidos intraoculares y el diseño de sistemas portadores que posibiliten una liberación más sostenida y/o controlada.

1.2 Diseño de medicamentos para uso oftálmico basados en la nanotecnología

El diseño de medicamentos para uso oftálmico es un interesante desafío y un área de las ciencias farmacéuticas donde ya se vislumbran importantes resultados y un vertiginoso avance. La biodisponibilidad de los fármacos administrados en forma tópica es limitada, debido a la pérdida rápida de la formulación desde la zona precorneal en virtud del drenaje lagrimal. Sumado a esto, la córnea es una barrera altamente eficiente y esto disminuye notablemente la penetración de fármacos por esta vía.

Así, después de la instilación de una gota oftálmica, menos del 5% del fármaco aplicado atraviesa la córnea y alcanza los tejidos intraoculares, mientras que la mayor parte del mismo es absorbida sistémicamente vía conjuntiva y conducto nasolacrimal. En forma simplificada se puede afirmar que la biodisponibilidad y la farmacocinética de los fármacos aplicados en forma tópica en la superficie del ojo dependen de tres factores: la disposición del fármaco en el área precorneal, la permeabilidad del fármaco a través de la córnea y su eliminación del ojo.

Las tendencias actuales en terapia ocular sugieren la conveniencia de reemplazar las formas convencionales de administración ocular por nuevos sistemas de administración de fármacos, con propiedades biofarmacéuticas mejoradas, y con capacidad para liberar el agente terapéutico de forma más precisa en el lugar diana del ojo. Uno de los grandes avances en la nanotecnología se dirige al desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos aplicados en oftalmología (Tabla 1).

Tabla 1. Sistemas de liberación de fármacos y su aplicación en oftalmología [30].

Fármaco	Nanosistemas	Resultados	Ref
Oligonucleótidos	Liposomas	Mejor control de velocidad de liberación	[31]
Acetazolamida		Disminuye la presión intraocular	[32]
Pilocarpina		Aumenta respuesta mitótica y biodisponibilidad ocular del fármaco	[33]
Insulina		Incrementa la concentración del fármaco en tejidos oculares	[34]
Ciclopentolato		Aumento de la absorción ocular	[35]
Maleato timolol	Discomas	Mayor encapsulación respecto a los niosomas	[36]
GCV	NPs Albúmina	Incrementa la actividad viral la infección citomegalovirus humano	[37]

Fármaco	Nanosistemas	Resultados	Ref
Pilocarpina	Microemulsión	Disminuye presión intraocular (25%)	[38]
Amikacina	NPs	Mejora la liberación en la córnea y humor acuoso	[39]
Pilocarpina	NPs de Poli(butil)-cianoacrilato	Aumenta respuesta mitótica (22%) y disminuye presión intraocular	[40]
Flurbiprofeno	Nanosuspensión de acrilato	Aumenta la cantidad de fármaco en el humor acuoso e inhibe la miosis inducida por la paracentesis	[41]
Ciclosporina	NPs de Chitosan	Mejora liberación en tejidos oculares	[42]
Rodamina	NPs de PECL recubiertas de PEG y Chitosan	Mejor penetración corneal	[43]
Dexametasona	Microemulsión	Aumenta biodisponibilidad en el humor acuso	[44]
Nitrato de pilocarpina, Tropicamida	Dendrimeros	Prolonga actividad mitótica	[45]
Nitrato de pilocarpina	hp- β -cd	Aumenta la permeación corneal	[46]
Dexametasona		Mejora la solubilidad, permeabilidad y biodisponibilidad corneal	[47]

Estos sistemas permiten dirigir una amplia variedad de moléculas a distintos tejidos, liberándolos de manera sostenida en el tiempo, minimizando así la degradación del principio activo e incrementando su semivida en el interior del ojo. Dentro de los sistemas que se han utilizado ampliamente para la liberación de fármacos en tejidos oculares, destacan las NPs poliméricas. Diversos trabajos han reportado la utilización de NPs de PLGA, en forma de nanoesferas, para la liberación de FB en tejidos oculares [48-50].

1.3 Péptidos penetradores de células (CPPs) y su aplicación en la terapia ocular

La primera parte de la presente tesis doctoral está encaminada al diseño de NPs poliméricas derivatizadas con péptidos penetradores de células (*Cell penetrating peptides, CPPs*) para la administración de fármacos en tejidos oculares. Los términos de *CPPs* y “Dominio de Transducción de Proteína (*Protein Transduction Domain, PTDs*) se utilizan normalmente para referirse a una clase de péptidos catiónicos pequeños (<20 aminoácidos) que son capaces de internalizarse, de una forma no destructiva, venciendo la naturaleza impermeable de la membrana celular. Los *CPPs* han sido ampliamente utilizados para la internalización de un gran número de moléculas bioactivas como proteínas, péptidos, oligonucleótidos y NPs en diferentes modelos celulares *in vitro* e *in vivo*. La transducción de moléculas acopladas a los *CPPs* es un proceso que se caracteriza por una rápida y eficiente transferencia de material biológico al citoplasma o al núcleo, una baja citotoxicidad, una elevada eficacia frente a distintas líneas celulares y una mayor facilidad de administración del fármaco.

Uno de los retos de la química médica, es la síntesis de nuevos fármacos que sean capaces de atravesar las membranas celulares e interactuar con la diana terapéutica para la cual fueron diseñados. Se han descrito un gran número de moléculas con elevada actividad terapéutica, que han resultado ser finalmente inactivas debido a su incapacidad para alcanzar su diana molecular y producir la respuesta celular deseada [51].

Los primeros péptidos descubiertos del tipo *CPPs* fueron los derivados de la proteína Tat (Proteína activadora de la transcripción del HIV-1) [52] y el *Penetratin* abreviado como pAntp (Factor de transcripción homeótico antenapedia de *Drosophila*) [53], atribuyendo su capacidad de translocación a las propiedades de los aminoácidos básicos de sus secuencias. En ambos

casos se identificó la mínima secuencia peptídica necesaria para que ocurriera la internalización [54].

Aunque se han llevado a cabo un gran número de estudios, el mecanismo de acción por el cual los *CPPs* son capaces de atravesar las membranas celulares sigue siendo todavía un enigma. No todas las familias de péptidos siguen un mismo mecanismo de internalización, y a menudo, un mismo *CPPs* puede mostrar distintos patrones según las condiciones del experimento utilizado. No obstante, todos los mecanismos postulados se basan en una primera etapa en donde el péptido de carácter catiónico interacciona electrostáticamente con la membrana. Se han propuesto dos tipos de mecanismos: la difusión pasiva o la penetración directa y la endocitosis.

La difusión pasiva es un mecanismo energético y receptor-independiente, asociado a una desestabilización de la membrana y la posterior internalización del péptido. Este mecanismo depende de la secuencia peptídica, siendo más probable a concentraciones elevadas y más favorables para los péptidos anfipáticos [55].

La endocitosis, es un mecanismo complejo, energético y receptor-dependiente, muy importante para el funcionamiento celular, siendo el responsable de, entre otras funciones, de la internalización de nutrientes extracelulares, de la regulación de la expresión de receptores de la membrana y del mantenimiento de la polaridad de ésta [56].

Los primeros estudios de internalización se realizaron con el *CPP* Tat. La capacidad del Tat para internalizar diversas moléculas, de manera eficiente, en un gran número de células, ha sido atribuida a su composición aminoacídica. Este péptido está compuesto por un total de seis argininas y dos lisinas, en una secuencia lineal de nueve residuos aminoacídicos [57]. El grupo guanidinio de la cadena lateral de las argininas es un mediador más

potente de la internalización, en comparación con residuos aminoacídicos de igual carga neta como la lisina o histidina, sugiriendo por tanto la existencia de requerimientos estructurales adicionales. Ambos elementos, la carga y la orientación de los residuos, parecen ser importantes para la interacción electrostática inicial con las moléculas polianiónicas de glicosilaminoglicanos, fundamentalmente heparán sulfato, que se encuentran presentes en la superficie externa de la membrana celular [58].

La internalización del Tat acoplado a moléculas biológicas se produce por diferentes procesos endocíticos como macropinocitosis, endocitosis dependiente de clatrina, caveolina o independiente de ambos. La prevalencia de uno u otro mecanismo de endocitosis ha sido asociada al tipo celular, las condiciones fisiológicas del cultivo, las características de la biomolécula, o incluso la concentración del conjugado Tat-biomolécula [59]. Este conjugado puede ser internalizado simultáneamente mediante más de una vía incluso en un mismo modelo celular, evento que depende del tamaño de la biomolécula y de su concentración [60].

1.3.1 Peptide for Ocular Delivery (POD)

Como en otros sistemas de órganos, la retina y la córnea se ven obstaculizadas por la ineficiente penetración de moléculas terapéuticas a través de la membrana plasmática. En la literatura se describe el *CPP* POD (GGG (ARKKAAKA)₄) para la liberación de genes y fármacos en tejidos oculares humanos [61-63]. Su estructura es similar a la región de unión de glicosaminoglicanos de las proteínas presentes en la retina. Este péptido presenta un dominio de transducción de proteína (*Protein transduction properties, PTDs*) y puede mejorar, potencialmente, la liberación de moléculas grandes y pequeñas a través de la membrana plasmática. Penetra rápidamente en la retina neural y se localiza en el epitelio pigmentario retinal (RPE), en los fotorreceptores y en las células ganglionares. La transducción de fotorreceptores conlleva su aplicación en el tratamiento de

enfermedades tales como la retinitis pigmentosa, mientras que la transducción al RPE indicaría su aplicación para el tratamiento de la DMAE [64, 65].

También se ha demostrado que el POD conjugado a fármacos, penetra a través del epitelio corneal, de la esclerótica, de la coroides y del nervio óptico cuando se aplica de forma tópica. Esto es particularmente útil debido a que, en la actualidad, muy poca cantidad de fármaco llega a los tejidos intraoculares mediante su aplicación tópica [66].

Por otra parte, éste péptido tiene actividad bacteriostática, sugiriendo que puede actuar como un agente terapéutico por sí solo. Las inyecciones de POD, conjugado a agentes terapéuticos, podrían proporcionar una profilaxis adicional frente a infecciones resultantes de algunos procedimientos quirúrgicos [67].

Por otro lado, se ha demostrado que el péptido POD pegilado (PEG-POD) es un buen candidato para llevar a cabo la liberación de genes en tejidos oculares. Read S.P. et al [63, 68, 69] han realizado un estudio comparativo de la transferencia de genes entre PEG-*CPPs* (*CPPs*: POD, Tat-HIV y CK30) observando que el PEG-POD es capaz de formar NPs esféricas, siendo esta formulación la más eficiente para la administración de ADN en el espacio subretiniano.

De acuerdo a los antecedentes mostrados de la importancia del péptido POD en el campo de la terapia ocular, la primera parte de este trabajo estará encaminada al diseño de NPs poliméricas derivatizadas con el péptido POD y su comparación con otras NPs que contienen el péptido Tat-HIV.

1.4 Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1)

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) constituye uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo, debido a que este virus es el agente causal del SIDA, síndrome que se ha asociado con un total de 25 millones de muertes; a la fecha se estima cerca de 33 millones de individuos infectados. La investigación en este campo ha experimentado uno de los avances más espectaculares en la medicina. Sin embargo, no se ha encontrado aún el tratamiento que pueda curar definitivamente o prevenir dicha enfermedad.

El HIV-1 es un lentivirus perteneciente a la familia *Retroviridae*; su genoma está constituido por dos copias de ARN lineal de polaridad positiva, de aproximadamente 9,8 kb. Como en todos los retrovirus, una enzima transcriptasa reversa interviene en su ciclo replicativo, la cual genera el ADN complementario del genoma viral, flanqueado por secuencias repetitivas (LTR; del inglés *long terminal repeats*), las cuales permiten su integración al genoma de la célula huésped, como también la regulación transcripcional del provirus. A partir del provirus integrado se transcriben los diferentes ARNs mensajeros que codifican nueve proteínas; tres precursoras (Gag, Pol, Env), dos proteínas reguladoras (Tat, Rev) y cuatro proteínas accesorias (Nef, Vif, Vpu, Vpr). Las proteínas de la envoltura gp120 y gp41 son producidas a partir de Env. La glicoproteína gp41 consta de un ectodominio en el extremo amino-terminal, una región transmembrana y un dominio carboxi-terminal intraviral, pequeño, que interacciona con la proteína de la matriz viral. El extremo amino-terminal es una región rica en residuos de glicina y alanina (región 1-23 aa, AVGIGALFLGFLGAAGSTMGAAS) y se conoce con el nombre de *péptido de fusión* (PF). Los péptidos de fusión se unen a la membrana celular y deshidratan la bicapa externa, consiguiendo reducir la barrera

energética al formar un intermediario lipídico más curvado (*stalk*), y finalmente, consiguen la fusión de las dos membranas.

Existen diversos péptidos sintéticos, derivados de la región C-terminal o N-terminal del ectodominio del gp41, que bloquean la formación del complejo y potencialmente inhiben la entrada del virus. T20 (FuzeonTM, Enfuvirtide, DP178) es un péptido derivado de la región C-terminal de gp41, aprobado para su uso en el tratamiento de la infección por HIV-1, en pacientes que han generado resistencia a otros antivirales. Su secuencia comprende la región entre los residuos 638 a 673 de la proteína gp41 de HIV-1. El medicamento desarrollado a partir de T20, FUZEONTM, es un inyectable producido por Hoffmann-La Roche Inc., que, debido a su carácter peptídico, presenta una baja biodisponibilidad por vía oral y una rápida degradación por proteasas, por lo que se administra por vía subcutánea. Además, a pesar de derivar de una región conservada del virus, ya han aparecido mutantes resistentes. Para evitar estas desventajas, se han desarrollado la segunda y tercera generación de péptidos inhibidores del HIV-1 que aumentan la estabilidad y la potencia del T20. Entre ellos, hay que mencionar el T-1249 o Tifuvirtide[®] y el Sifurtide (SFT). El T-1249, desarrollado por la empresa Trimeris, ha mostrado una mejor actividad anti-HIV-1 contra las resistencias, en comparación con el T20. Aunque este péptido alcanzó la fase clínica II, su desarrollo clínico se detuvo, en el año 2004, debido a su difícil formulación como fármaco. Además, aparecieron mutantes resistentes a este inhibidor. Otros derivados de la región C-terminal de gp41 como C34 (región 628-661 aa) y T651 (región 626-661 aa) presentan mayor actividad y una reducida susceptibilidad a las resistencias. Sin embargo, su uso como medicamento se ha visto limitado por su baja solubilidad en medios acuosos.

1.5 GB virus C (GBV-C)

Los virólogos han obtenido notables avances en el entendimiento de las hepatitis en los últimos 20 años; no obstante, aún continúan apareciendo misteriosos casos de enfermedad hepática, lo cual constituye un desafío para los investigadores, quienes mantienen la búsqueda de nuevos agentes infecciosos. Hasta la fecha, los científicos vinculan a la inflamación hepática, ya sea directa o indirectamente, al menos a 14 virus; 5 de los cuales son capaces de causar hepatitis aguda en el hombre [70]. Los virus de la hepatitis A, B, C, D y E están todos bien caracterizados y definidos molecularmente, y su asociación a esta enfermedad ha quedado inequívocamente establecida. Recientemente, dos equipos independientes de investigadores describieron supuestos agentes productores de hepatitis, los cuales fueron denominados virus de la hepatitis G y GB virus C (GBV-C) cuya caracterización molecular demostró que son semejantes estructuralmente y que por tanto se trata de un mismo virus [71].

La historia del GBV-C comienza en el año 1967, cuando *Deinhardt et al.* describieron por primera vez el agente GB (iniciales del paciente *GBarker*) [72]. Estos investigadores, inocularon suero de un paciente con hepatitis no A no B en monos tití gris (*Saguinus leucopus*), demostrando el desarrollo de hepatitis por el aumento de enzimas hepáticas y alteración histológica del hígado en estos animales. Posteriormente, en el año 1995, se identificaron dos virus genéticamente relacionados, en muestras de suero y de tejido hepático de esos primates inoculados: el virus GB tipo A (GBV-A) y el virus GB tipo B (GBV-B); aunque sólo el segundo fue asociado con el desarrollo de hepatitis en primates [73]. Ninguno de estos dos virus logró detectarse en muestras humanas. Estudios posteriores conllevaron a la detección en humanos de un tercer virus con alta similitud nucleotídica a los agentes GBV-A y GBV-B, por lo que fue denominado GBV-C [74].

El GBV-C fue aislado por primera vez mediante métodos de amplificación de genes, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [75], lo que permitió identificar su secuencia nucleotídica. El agente es un virus RNA que tiene aproximadamente 9,4 kilobases de longitud, con una organización genómica que lo sitúa en la familia de los Flavivirus. Debido a que tiene menos de un 25% de similitud en la secuencia de aminoácidos con el virus de la hepatitis C (HCV) y otros miembros establecidos de la familia Flavivirus, es considerado un nuevo género en esta creciente familia de virus.

El GBV-C contiene una cadena positiva de RNA. La poliproteína codificada presenta dos proteínas estructurales (E1, E2) y cuatro no estructurales (NS). De estas últimas, una helicasa RNA dependiente (NS3), una proteasa (NS4) y una polimerasa RNA dependiente (NS5) (Figura 5). En este tipo de virus, a diferencia de HCV, todavía no se ha identificado una proteína que forme el núcleo aunque algunos autores han demostrado que contiene una nucleocápside y por lo tanto, el núcleo existe [76].

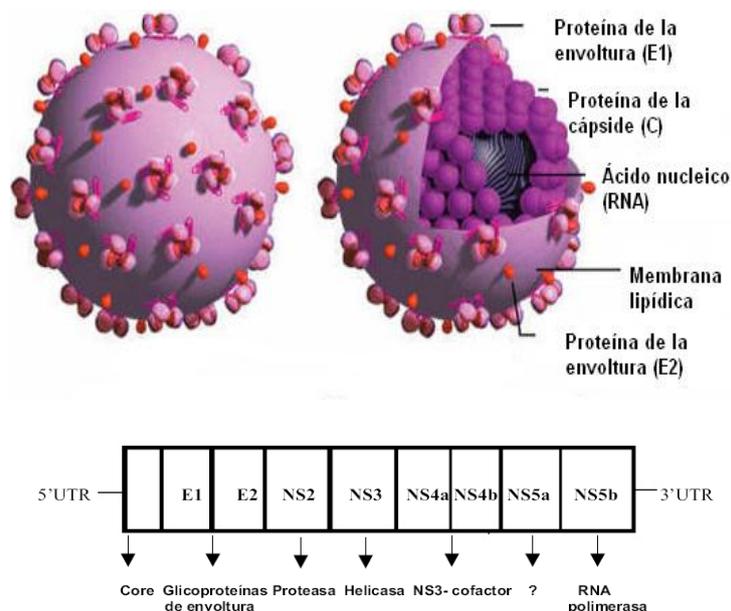


Figura 5. Organización genómica del GBV-C.

Poco se conoce sobre la transmisión, epidemiología y capacidad para inducir enfermedad de GBV-C, pues los estudios se tornan difíciles al no existir ensayos serológicos confiables; no obstante la vía de transmisión parenteral está claramente establecida [77-79]. Moaven et al [80] describen el caso de una madre con pruebas positivas para GBV-C antes y durante el parto, cuyo hijo era negativo en el momento del nacimiento, pero muestras de suero tomadas en la cuarta y sexta semanas de edad mostraron resultados positivos para el virus, lo cual sugiere la transmisión de madre a hijo.

El aspecto más confuso de la infección por GBV-C es si el virus conduce a enfermedad hepática. Hasta el momento los científicos asocian a este virus con una enfermedad que recorre la gama desde muy ligera hasta muy severa [78, 81]. Se plantea que en los pocos casos de hepatitis en los cuales GBV-C es el único agente identificado no existen evidencias bioquímicas de enfermedad hepática. La mayoría no presenta elevaciones significativas de los niveles de transaminasa glutámico pirúvica (TGP) en suero y la relación entre ésta y los niveles de RNA viral es a menudo asincrónica.

No existen datos disponibles sobre la propagación sexual del virus, pero su frecuente asociación con HCV, de comprobada transmisión sexual, no permite descartar totalmente esta posibilidad.

Diversos autores han planteado que el GBV-C inhibe la replicación del HIV-1 [82]. Al comparar poblaciones de pacientes infectados por el HIV-1, con y sin viremia detectable para el GBV-C, se han encontrado mayores recuentos de CD4⁺ y una mayor supervivencia de aquellos pacientes en los que se evidencia el genoma de GBV-C [83]. Asimismo, al comparar pacientes con replicación del GBV-C (viremia detectable) y pacientes con anti-E2 pero sin viremia detectable, se observa que aquellos con replicación activa del GBV-C son quienes presentan mejor pronóstico frente al HIV-1. Por otro lado, estudios *in vitro* muestran la inhibición de la replicación tanto

de cepas R5 como X4 por parte del GBV-C, utilizando como marcador los niveles del antígeno p24 [83].

Otros estudios más recientes sugieren la posibilidad de que péptidos derivados de la glicoproteína E2 del GBV-C tienen la capacidad de inhibir la unión al receptor y/o la fusión de HIV-1 vía interacción con la partícula viral, o incluso inhibir en pasos tempranos post-entrada [84]. Xiang et al., utilizando un modelo de expresión constitutiva de E2 en células Jurkat, han demostrado que existe una disminución en la síntesis de p24. Estos autores encontraron que la actividad inhibitoria se asociaba a un dominio de la proteína E2 (276-292). Al tratar de evaluar la actividad de E2, utilizando un péptido sintético compuesto por estos 17aa no se observó la actividad inhibitoria anti-HIV-1, siendo reestablecida sólo en presencia del dominio de transducción de la proteína viral Tat, indicando que E2 tendría un mecanismo adicional de inhibición de HIV dependiente de su ingreso a la célula (paso post-entrada) [84].

Por otra parte, se ha observado actividad neutralizante anti-HIV con anticuerpos anti-E2 del GBV-C. Así, tras incubar las células MT-2 con anticuerpos purificados a partir de sueros de individuos infectados, o derivados del suero de conejos que fueron inmunizados con péptidos truncados de la glicoproteína E2, se evidenció una reducción significativa en la producción de antígeno p24, indicando que los anticuerpos anti-E2 tenían la capacidad de inhibir la entrada del HIV-1 a la célula huésped [85]; en principio, esto también se relacionaría con la mayor supervivencia descrita en algunos individuos con infección por HIV-1 que no presentan viremia para el GBV-C pero sí anticuerpos anti-E2 del GBV-C [86].

Trabajos recientes llevados a cabo en la Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédicas de Péptidos del IQAC-CSIC en Barcelona, han demostrado que existen diferentes dominios peptídicos de las proteínas de envoltura E1 y E2 del GBV-C que tienen cierta capacidad de inhibir la entrada del virus HIV-1

a las células [87-90]. Asimismo, se ha estudiado la utilidad de péptidos derivados de estas proteínas para el diseño de sistemas de diagnóstico de la infección causada por el GBV-C en pacientes infectados por HIV-1 [91-93].

1.6 Sistemas basados en la nanotecnología para el tratamiento del SIDA

En los últimos años, ha crecido el interés en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos anti-HIV, donde se aplica la nanotecnología para mejorar el tratamiento del SIDA [94].

Las NPs poliméricas han jugado un papel importante en el tratamiento del SIDA [95], principalmente en la liberación de fármacos antirretrovirales a las células T CD4+ y a los macrófagos, asegurando que los medicamentos lleguen a los reservorios latentes [96]. Desde la década de los años 90 se vienen realizando estudios con macrófagos; éstos son bien reconocidos por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial (RES), el cual es uno de los principales responsables de la captación de NPs cargadas con fármacos. Una vez que se produce la opsonización y la endocitosis, las NPs se incorporan en el endolisosoma siendo degradadas; sin embargo, la capacidad de diversas NPs para escapar del compartimento endolisosomal permite la liberación de los fármacos incorporados al citoplasma o eventualmente al núcleo.

Schäfer et al. han demostrado que las propiedades físicoquímicas de las NPs; en particular, su composición, tamaño y características de su superficie, influyen en la captación por los macrófagos [97]. Otros resultados importantes obtenidos por este grupo, han sido la obtención de diferentes NPs formadas por polimetilmetacrilato y albúmina, cargadas de zidovudina (primer medicamento antirretroviral indicado para personas infectadas por el HIV-1), destacando el incremento de la absorción de las NPs por los macrófagos. Los resultados obtenidos en estos estudios

indicaron una mejora del perfil farmacocinético intracelular de los fármacos antirretrovirales, aumentando potencialmente sus ventajas terapéuticas [98].

Shah y Amiji obtuvieron NPs de PEO-PCL cargado con saquinavir (antirretroviral de la familia de los inhibidores de la proteasa) y evaluaron su absorción por los monocitos/macrófagos *in vitro* (línea celular humana THP-1). La presencia de PEO confiere propiedades hidrofílicas a las NPs de PCL. En este caso, la presencia del PEO podría afectar la fagocitosis por impedimento estérico, sin embargo los resultados obtenidos por estos autores sugieren que las NPs de PEO-PCL pueden dirigirse a los macrófagos, sin comprometer la liberación prolongada del fármaco [119].

Resultados similares fueron obtenidos por Mainardes et al empleando NPs de PEG-PLA que contienen zidovudina, demostrando que la pegilación reduce la absorción de las NPs por los leucocitos polimorfonucleares de manera dependiente de la concentración [99]. El mecanismo del aumento de la captación celular de las NPs aún no se conoce, pero parece estar relacionado con su tamaño y su carga. Estos resultados parecen confirmar que estos nanosistemas permiten una liberación sostenida y una orientación celular hacia reservorios latentes del virus, siendo de gran utilidad en el tratamiento del SIDA.

Además de las NPs poliméricas, los liposomas representan también un enfoque conveniente para mejorar el suministro de agentes anti-HIV a las células infectadas, aumentando la eficacia de los medicamentos y disminuyendo sus efectos secundarios.

Las primeras investigaciones que involucran a los liposomas en el tratamiento del SIDA, están relacionadas con su habilidad de incrementar la liberación de diferentes fármacos antirretrovirales: zalcitabina, zidovudina, didanosina, estavudina y saquinavir [100, 101].

1.6.1 Membranas biológicas y su relación con el HIV-1

La membrana celular o citoplasmática es una estructura laminar formada principalmente por lípidos y proteínas que recubren a las células. Los lípidos se encuentran dispuestos en forma de bicapa, mientras que las proteínas se disponen en forma irregular y asimétrica entre los mismos.

Las membranas celulares de todos los mamíferos contienen tres tipos de lípidos: fosfoglicerolípidos, esfingolípidos y colesterol [102-105].

Los fosfoglicerolípidos (pertenecen al grupo de los fosfolípidos) pueden definirse como lípidos anfipáticos formados por ésteres de acilglicerol con fosfato y otro compuesto hidroxilado. La estructura de la molécula es un ácido fosfatídico que está compuesto por dos ácidos grasos, uno saturado y otro, generalmente, insaturado. El ácido fosfatídico puede estar esterificado a un segundo alcohol, originando distintos tipos de fosfolípidos. Cuando el alcohol se sustituye por un glicerol, se obtiene el fosfatidilglicerol (PG). Cuando el alcohol es nitrogenado como la colina, la etanolamina o el aminoácido serina se obtienen la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE) y la fosfatidilserina (PS). El alcohol también puede ser un polialcohol cíclico, como el inositol, con lo que se origina un fosfoinosítido o fosfatidilinositol (PI).

Los esfingolípidos están formados por ceramida, la que está constituida por un ácido graso y una esfingosina. Dependiendo de la molécula que se enlace con la ceramida se obtienen los fosfoesfingolípidos (Esfingomiélinea, SM) o glucoesfingolípidos (glucosilceramida (GlcCer) y galactosilceramida (GalCer).

El colesterol es un esteroide que se encuentra en los tejidos corporales, que existe naturalmente en todas las partes del cuerpo, es una sustancia cerosa de tipo grasosa. La estructura de la membrana va muy relacionada con la función de fluidez que esta aporta, es decir la facilidad con la que las

moléculas lipídicas que la constituyen se desplazan en el plano de la bicapa. Los esteroides y esfingolípidos se sintetizan en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, respectivamente. Están presentes en niveles bajos en la mayoría membranas internas pero son más abundantes en la membrana plasmática y en la membrana endosomal [106, 107].

En estudios previos se ha demostrado que las membranas biológicas presentan un modelo de mosaico fluido en el cual la estructura de la membrana celular es uniforme y homogénea [21]. En contraste con la hipótesis clásica de este modelo, se ha descubierto que las membranas biológicas presentan microdominios heterogéneos con una composición específica de lípidos y proteínas. Estos microdominios de membrana se denominan balsas lipídicas o "*lipid raft*" [108, 109].

Las balsas lipídicas (Figura 6) son dominios pequeños (10-200 nm), heterogéneos y muy dinámicos enriquecidos en esfingolípidos y esteroides. Estas pequeñas balsas tienden a estabilizarse y forman estructuras más grandes mediante interacciones proteína-proteína y proteína-lípido.

Los esfingolípidos que abundan en las balsas lipídicas son los ácidos grasos saturados que se empaquetan estrechamente con el colesterol haciendo que esta zona sea más ordenada y menos fluida que otras zonas de la membrana en las que haya más glicerofosfolípidos. El elevado empaquetamiento de las cadenas aciladas es esencial para la organización de la balsa lipídica, pues hace que estas regiones, ricas en esfingolípidos, formen una fase líquida ordenada rodeada por dominios ricos en glicerofosfolípidos que constituyen una estructura líquida desordenada [110, 111].

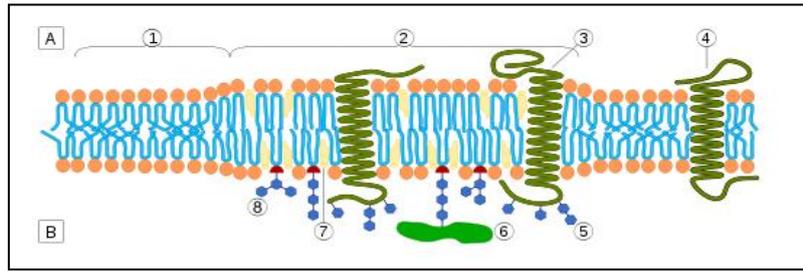


Figura 6. Estructura de la balsa lipídica en la membrana biológica: Espacio intracelular o citosol (A), espacio extracelular, luz del Golgi o de vesícula (B), membrana sin balsa lipídica (1), balsa de membrana (2), proteína transmembrana asociada a la balsa lipídica (3), proteína fuera de la balsa de membrana (4), restos glucídicos en glicoproteínas o glicolípidos (5), proteína con anclaje GPI (6), colesterol (7) y glicolípido (8).

Por otra parte, se ha descubierto que los lípidos de la envoltura de algunos virus juegan un papel importante en la morfogénesis viral y en la infectividad. El Sindbis es un ejemplo de virus con una envoltura que se une a las balsas lipídicas [112, 113]. Estudios previos con modelos de membrana liposomal que contiene PC, PE, SM y colesterol han demostrado que la interacción del virus Sindbis con liposomas puede emular algunas interacciones del virus con las células [114]. Los liposomas que contienen tales lípidos pueden razonablemente considerarse un modelo de balsas lipídicas estables. Las balsas lipídicas tienen un especial interés debido a que están implicadas en muchos procesos celulares, fundamentalmente en la dinámica de membranas y en la señalización celular; también son sitios de entrada para virus y toxinas, y puntos de ensamblaje y salida para ciertos virus incluyendo el HIV-1 [115-117].

El virus HIV-1 presenta una estructura esférica que se fusiona con la membrana plasmática e inserta su ARN genómico. La envoltura de este virus contiene una bicapa lipídica que está asociada con dos glicoproteínas, la gp120 y la gp41. Estas proteínas se crean por escisión de la glicoproteína gp160. En la matriz denominada p17 se anclan las proteínas de la superficie

de la envoltura. La proteína gp41 sirve unión entre p17 y gp120, que aparecen como pequeñas protuberancias de la envoltura [118, 119] (Figura 7A). Como en la gran mayoría de los virus, la composición lipídica del virus HIV-1 es un reflejo de la composición de las balsas lipídicas presentes en la membrana plasmática de la célula huésped [120].

La región C-terminal de la gp41 (péptido de fusión) se une electrostáticamente a los lípidos PS o PG formando un poro lipídico que conduce a la permeabilidad celular, citopatología, apoptosis con el movimiento de PS desde el interior de la bicapa lipídica hacia el exterior hasta la muerte celular [121, 122]. Posteriormente, la resultante bicapa lipídica viral se asemeja a la de la célula apoptótica [123]

Por otro lado, se ha demostrado que el motivo altamente conservado LWYIK de la proteína gp160 (residuos 679–683) se une específicamente al colesterol [124]. La SM junto con el colesterol promueven la agregación de LWYIK provocando la fusión de las membranas virales y celulares mediada por la gp41 [125]. Varios glicerolípidos en la membrana celular se han reportado como receptores alternativos del HIV-1: galactosilceramida (GalCer) [126] y galactosil ceramida-3-sulfato (SGalCer) [127]. Estos glicerolípidos mejoran el sitio de unión en la superficie celular y pueden promover la agrupación de CD4⁺ y correceptores y regular su movilidad en la membrana de la célula diana. Estos receptores y correceptores celulares se encuentran localizados en los dominios lipídicos de la membrana plasmática.

La unión y fusión del virus HIV-1 a la célula viene dada por la interacción del dominio transmembrana de Env gp (120) y el antígeno CD4⁺, que posee un dominio de alta afinidad por gp120 [128, 129]. Esta unión causa un cambio conformacional en el complejo gp120/CD4⁺ que lleva a la interacción de gp120 con el correceptor apropiado (generalmente CCR5 o CXCR4). Tras la interacción gp120/correceptor se produce un cambio

conformacional en la gp41, concretamente en el péptido de fusión, generando la unión y fusión de la membrana del virión y de la célula (Figura 7B).

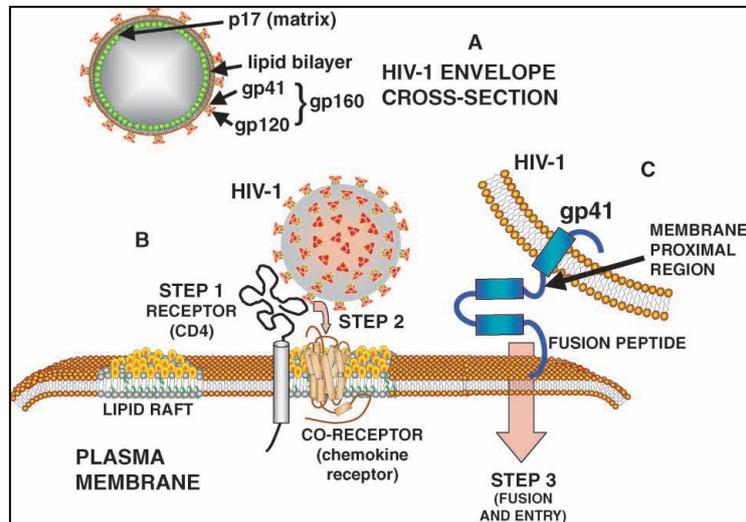


Figura 7. Estructura del virus HIV-1 (A) e interacción de las proteínas de envoltura con los lípidos de la membrana plasmática durante los pasos de unión y fusión con la célula diana (B) [130].

Teniendo en cuenta los antecedentes mostrados, el diseño de liposomas compuestos por dominios lipídicos reconocidos por el virus HIV-1, que a su vez contengan péptidos inhibidores provenientes del GBV-C, podrían resultar una estrategia útil para aumentar la actividad y biodisponibilidad de estos péptidos e inhibir la infección viral causada por el HIV-1.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es el diseño de nanosistemas derivatizados con péptidos para su aplicación en Biomedicina.

- La primera parte de este estudio se centra en el diseño de nanopartículas (NPs) poliméricas, que contienen péptidos de direccionamiento, para la administración ocular de fármacos.
- La segunda parte se plantea en dos vertientes: El diseño y síntesis de NPs poliméricas y liposomas para aumentar la actividad y biodisponibilidad de péptidos inhibidores del HIV-1; y el diseño de NPs poliméricas que sirvan como plataforma para realizar estudios de interacción de péptidos inhibidores con el péptido de fusión del HIV-1 (PF-HIV-1).

Objetivos específicos

Referidos a la aplicación de nanosistemas peptídicos en la terapia ocular:

- ❖ Sintetizar los péptidos *CPPs* (POD y Tat-HIV), siguiendo metodologías de síntesis de péptidos en fase sólida (*SPPS*).
- ❖ Obtener NPs derivatizadas con los *CPPs* (PLGA-NPs-PEG-Péptido y PLGA-PEG-Péptido-NPs) para la liberación de flurbiprofeno (FB) en tejidos oculares.
- ❖ Realizar estudio comparativo de todas las formulaciones obtenidas en cuanto a los parámetros físico-químicos, eficiencia de encapsulación y liberación *in vitro*.
- ❖ Evaluar las formulaciones óptimas mediante diferentes estudios *in vitro* (citotoxicidad y tolerancia ocular), *ex vivo* (interacción con el epitelio corneal) e *in vivo* (tolerancia ocular y eficacia

antiinflamatoria) que permitan dilucidar cual será la más idónea para la administración de fármacos en tejidos oculares.

Referidos a la aplicación de nanosistemas peptídicos en la inhibición del virus HIV-1:

- ❖ Sintetizar el péptido P6-2 derivado de la proteína de envoltura E2 del GBV-C siguiendo metodologías de *SPPS*.
- ❖ Sintetizar diversas formas de presentación peptídica: lipopéptidos (Pal-P6-2), P6-2 encapsulado en liposomas y NPs del tipo PLGA-PEG-NPs-P6-2.
- ❖ Estudiar la interacción de PLGA-NPs-PF-HIV-1 con un péptido derivado de la proteína de envoltura del GB virus C (E1) mediante el ensayo de Diferencia de Transeferencia de Saturación (STD-RMN¹H).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos y disolventes

Relación entre los reactivos, disolventes, instrumentos y equipos empleados en el trabajo y las casas comerciales donde fueron adquiridos (Tabla 2 y Tabla 3).

Tabla 2. Reactivos y disolventes.

Síntesis y caracterización de péptidos

Casa comercial	Reactivos y disolventes
Novabiochem	Aminoácidos Resinas (NovaSyn® TGR y NovaSyn® TGA) 4-dimetilaminopiridina (DMAP)
Fluka	N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) N,N-diisopropiletilamina (DIEA) Piridina tolueno ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) Metanol Cloroformo ácido fórmico (HCOOH)
Scharlau	N,N-Dimetilformamida (DMF) Ácido acético (CH ₃ COOH) Ácido trifluoroacético (TFA)
Sigma	1,8-diazabicyclo-[5,4,0]-7-undeceno (DBU) Piperidina 2-mercaptoetanol (BME) ácido palmítico Triisopropilsilano (TIS)
Genscript	Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridin-1-il-metil]-N-metilmetanaminio (HATU)

Casa comercial	Reactivos y disolventes
J.J Barker	Fenol
Carlo Erba	etanol absoluto cloranilo (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona)
BRUKER	ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB)
Merck	Diclorometano (DCM) Éter dietílico Acetonitrilo Ninhidrina Resina Amberlite MB-3 Dimetilsulfóxido (DMSO) Cianuro de potasio (KCN) 5(6)-Carboxi-tetrametilrodamina (Rho)

Obtención y caracterización de NPs

Casa comercial	Reactivos y disolventes
BASF	Poloxamer 188 (Lutrol® F68) Alcohol polivinílico (PVA) DTNB (5,5 ditiobis (2- nitrobenzoico))
Jenkem technology	Maleimido-PEG-NH ₂ (2000 Da)
Boehringer Ingelheim	PLGA Resomer® RG 503H, 34 kDa PLGA-PEG Resomer® RGP type d5055
Fluka	hidrocloruro 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodimida (EDC)
Carlo Erba	Acetona
Sigma	Flurbiprofeno (FB) Metoxi-PEG-NH ₂ (2000 Da) N-hidroxisuccinimida (NHS) cloroformo deuterado (CDCl ₃) dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d ₆) Metanol

Casa comercial	Reactivos y disolventes
Sigma	agua deuterada (D ₂ O)

Obtención de liposomas

Casa comercial	Reactivos y disolventes
Avanti Polar Lipids	L- α -fosfatidilcolina (PC) Colesterol (Chol) Esfingomielina (SM) C16 β -D-Galactosilceramida (GalCer)
Merck	Ácido perclórico 70 % (HClO ₄) Di-hidrógeno fosfato de sodio monohidratado (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)
Fluka	heptamolibdato de amonio [(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O] ácido ascórbico

Ensayos celulares

Casa comercial	Reactivos y disolventes
Sigma	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido
PAA	penicilina estreptomina FBS inactivado (<i>Fetal Bovine Serum</i> , 10270106, Invitrogen) Penicilina-Estreptomina (P11- 010, PAA) DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , D5796, Sigma)

Estudios *in vivo* y *ex vivo*

Casa comercial	Reactivos y disolventes
Novabiochem	Glucosa Xilacina Ketamina pentobarbital sódico formaldehido colorantes de membrana (WGA) y de núcleo (Hoescht) araquidonato sódico (AS)

3.2 Instrumentación

Tabla 3. Instrumentación y marca comercial.

Marca	Instrumento
Agilent 1260 Infinity	HPLC
Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics)	Espectrómetro de masas MALDI TOF
Biopipette (Labnet)	Pipetas
CytoViva, Inc.	Microcopio de fluorescencia
Crison micropH	pH-metro
Eyela	Rotavapor
Fiske M-210	Osmómetro
Hitachi S43000	Microscopio electrónico de barrido
IR Nicolet 360 FT-IR	Espectrofotómetro IR
LCT Premier XE (Micromass Waters)	Detector líquido-masas de tiempo de vuelo
Leika TCS SP2	Microscopio confocal
Lioalfa, Telstar	Liofilizadora
Lipex TM Extruder	Extruder
Magellan	Espectrofotómetro

Marca	Instrumento
Milipore	Equipo de agua miliQ
Multimode_ Scanning Probe Microscope	Microscopio de fuerza atómica
PTI QM4CW	Fluorímetro
RMN Varian (Agilent) Inova 500 Hz	RMN
Sartorius Analytic A200S	Balanza
	Estufa
	Baño María
Selecta	Placa calefactora
	Baño de ultrasonidos
UPLC ACQUITY (Waters)	Detector ultravioleta acoplado a LC-TOF
Z sizer Nano ZS	Medidor del tamaño y carga de las partículas

3.3 Síntesis de péptidos en fase sólida

La síntesis de los péptidos *CPPs* (POD y Tat-HIV) y el péptido inhibidor del HIV (P6-2) se llevó a cabo en la Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédicas de Péptidos, IQAC-CSIC. Los péptidos fueron sintetizados mediante la síntesis manual en fase sólida descrita inicialmente por Merrifield [131] [132]. En este tipo de síntesis el aminoácido C-terminal permanece unido a una resina unida por su grupo carboxilo mientras se sintetiza el péptido alargando la cadena por el extremo N-terminal. La incorporación del número deseado de aminoácidos se realiza con una serie de pasos de acoplamiento y desprotección. Finalmente, el péptido es desanclado del soporte sólido o resina. La Figura 8 y la Tabla 4 muestran el esquema general y el protocolo de la síntesis de péptidos en fase sólida.

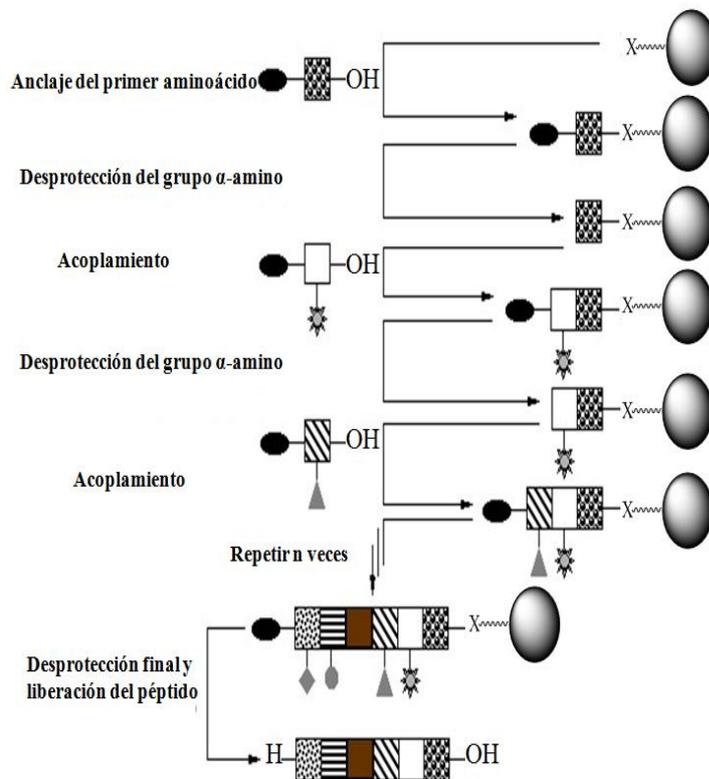


Figura 8. Esquema general de la síntesis de péptidos en fase sólida.

Tabla 4. Protocolo de la síntesis de péptidos en fase sólida.

Pasos	Ciclos	Ciclos x tiempo (min)
1	Hinchar la resina con DMF	1x180
2	Acoplamiento (aa/ HATU / DIEA)(3/3/6)	1x20
3	Lavados con DMF	4x1
4	Test de Ninhidrina/Cloranilo/TNBS	1x3
5	Desprotección con piperidina al 20% en DMF	2 x10
6	Lavados con DMF	4x1
Repetir todos los ciclos (2-6) hasta completar la secuencia del péptido		

3.3.1 Resinas

3.3.1.1 Resina NovaSyn® TGR

Para la obtención de péptidos con el extremo C-terminal en forma de carboxamida se utilizaron 0,5 g de la resina comercial NovaSyn® TGR (Figura 9) con funcionalidad inicial de 0,23 mmol/g. Esta resina no contiene grupos aminos terminales protegidos, por lo que no es necesario realizar los dos ciclos iniciales con piperidina al 20% en N,N-Dimetilformamida (DMF).

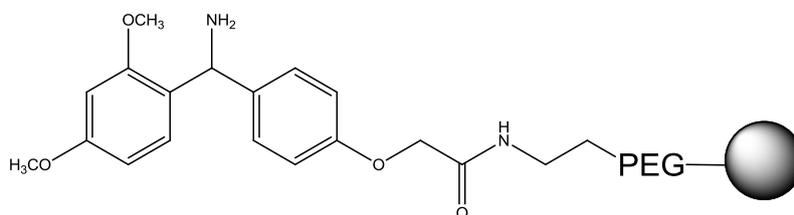


Figura 9. Estructura de la resina NovaSyn® TGR.

3.3.1.2 Resina NovaSyn® TGA

La NovaSyn® TGA es una resina tentagel derivatizada con el ácido hidroximetilfenoxiacético que permite la obtención de péptidos en forma de ácidos carboxílicos debido a la formación de un enlace éster entre el grupo carboxilo del primer aminoácido y la resina (Figura 10).

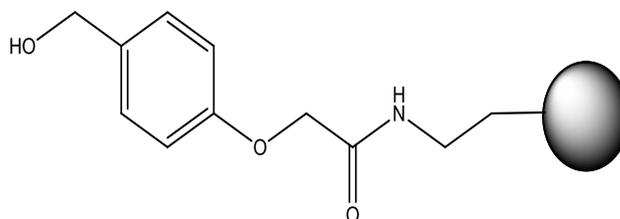


Figura 10. Estructura de la resina NovaSyn® TGA.

La incorporación del primer residuo C-terminal a esta resina hidroxilo implica la formación de un enlace éster, un proceso que si se lleva a cabo en condiciones no controladas puede dar lugar a racemizaciones o formación de dipéptidos.

Se efectuó la esterificación de la resina mediante la formación del anhídrido simétrico del aminoácido (protegido en su extremo α -amino y cadena lateral) en presencia de 4-dimetilaminopiridina (DMAP).

Para la formación del anhídrido simétrico se disolvió el aminoácido (10 equivalentes respecto a la funcionalidad de la resina) en diclorometano (DCM) con posterior adición de DMF, gota a gota, hasta completar la disolución. Se adicionaron 5 equivalentes de N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) respecto a la funcionalidad de la resina. Se dejó reaccionar la mezcla durante 20 minutos a 0°C en un ambiente seco que se consiguió tapando el balón con un tubo relleno de CaCl₂. Después, se evaporó el DCM en un rotavapor a una temperatura de 25°C. El residuo seco obtenido se disolvió en la mínima cantidad de DMF y se adicionó a la resina. Seguidamente, se adicionaron 0,1 equivalentes de DMAP disuelto en DMF. Después de una hora de reacción a temperatura ambiente, se eliminaron los excesos de reactivo realizando cuatro lavados de DMF. Posteriormente se repitieron todos los pasos, para garantizar un mayor acoplamiento del primer aminoácido a la resina.

Se determinó la nueva funcionalidad de la resina y el grado de incorporación del primer aminoácido. Para llevar a cabo el ensayo se pesó la Fmoc-aminoácido-resina seca (5 μ mol con respecto al grupo Fmoc). Se le adicionaron 2 ml de una disolución de 1,8-diazabicyclo-[5,4,0]-7-undeceno (DBU) al 2% en DMF y se agitó durante 30 minutos. La solución anterior se enrasó hasta 10 ml con acetonitrilo (ACN). De esta solución se tomaron 2 ml y se enrasó hasta 25 ml con ACN. Este ensayo se realizó por duplicado y se utilizó como blanco la disolución sin Fmoc-aminoácido-resina. Se

midieron las absorbancias de la muestra y el blanco en cubetas de cuarzo a la longitud de onda de 304 nm. Se calculó la nueva funcionalidad de la resina aplicando la siguiente fórmula (Ecuación 1):

$$F_{moc} (\text{mmol g}^{-1}) = \frac{(\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{referencia}}) \times 16,4}{(\text{mg resina})}$$

Ecuación 1

3.3.2 Activación y acoplamiento

La etapa crucial en la síntesis de péptidos es la reacción bimolecular que ocurre entre los componentes carboxilo y amino. Para llevar a cabo la reacción de acoplamiento es necesario activar el grupo carboxilo. Los reactivos de acoplamiento se utilizan para activar el grupo α -carboxilo del aminoácido protegido y permiten obtener altos rendimientos en la reacción de la formación del enlace amida. Además, éstos minimizan las reacciones secundarias, como la racemización, que se pueden producir durante la síntesis.

En este trabajo se realizaron las reacciones de acoplamiento utilizando principalmente la mezcla de activadores N,N-diisopropiletilamina/ Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridin-1-il-metilil]-N-metilmetanaminio (DIEA/HATU). Para ello, se pesaron 3 equivalentes de aa y 3 equivalentes de HATU. Luego se disolvieron en la mínima cantidad de DMF, y se adicionaron 6 equivalentes de DIEA por cada equivalente de resina. Todos los reactivos se emplearon en un exceso de 3 veces respecto a la cantidad necesaria para completar la reacción. Con la adición de excesos de reactivos se pueden obtener rendimientos prácticamente cuantitativos.

La síntesis se llevó a cabo de forma manual (Figura 11) utilizando como reactor una jeringuilla de 20 ml que contiene un filtro de polietileno, el cual retiene a la resina y permite evacuar los restos de reactivos y los solventes

empleados hacia el reservorio o balón de residuos con la ayuda del vacío. Para lograr una alta eficiencia en los acoplamientos todos los pasos de la síntesis se realizaron con una adecuada agitación, utilizando en este caso una varilla de teflón.

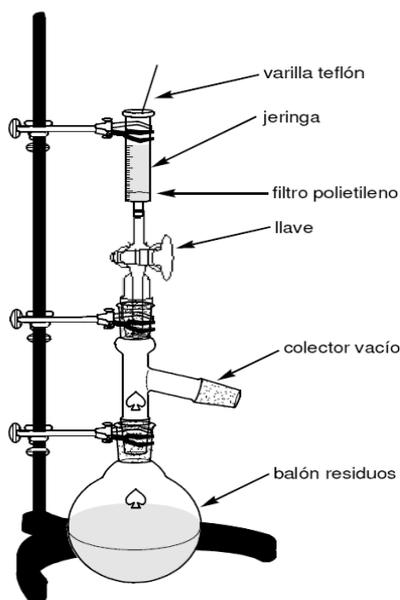


Figura 11. Diseño del sistema utilizado para la síntesis manual de péptidos en fase sólida.

3.3.3 Test de detección de grupos aminos

3.3.3.1 Test de ninhidrina o Kaiser

El ensayo de la ninhidrina o test de Kaiser [133] es un método para detectar de forma cualitativa la presencia de grupos aminos primarios. La ninhidrina reacciona con los grupos aminos primarios obteniéndose una coloración azul púrpura, lo que indica que el último aminoácido incorporado en la secuencia peptídica se encuentra desprotegido (test positivo). Para preparar este test se emplearon los siguientes reactivos.

Reactivo A

Solución 1: 20g de fenol se disuelven en 5 ml de etanol absoluto calentando poco a poco bajo campana de extracción. Adicionar 4g de resina Amberlite. Se deja reaccionar durante 3 horas bajo agitación.

Solución 2: 6.5mg de KCN se disuelven en 10 ml de agua milliQ. De esta solución se toma 1ml y se enrasa con 50 ml de piridina. Se adiciona 4g de resina Amberlite y se deja reaccionar durante 3 horas bajo agitación.

Filtrar ambas soluciones y mezclar.

Reactivo B

2,5g de ninhidrina en 50 ml de etanol absoluto.

Para realizar el test se adiciona una pequeña porción de la peptidil resina en tubo de vidrio, luego se añaden 3 gotas del reactivo A y 3 gotas del reactivo B. Simultáneamente se realiza esta misma operación utilizando un tubo que no contiene peptidil resina, el cual nos servirá de control. Se agitan ambos tubos y se colocan en una estufa a 110°C. La aparición de perlas amarillas indica que NO hay grupos aminos libres (test negativo), a lo que atribuimos que el proceso de acoplamiento ha sido efectivo.

3.3.3.2 Test del cloranilo

Este método se utiliza para detectar aminas secundarias libres como la prolina [134], permitiendo evaluar los acoplamientos en que interviene este aminoácido. El reactivo empleado es una solución saturada de 0,75g de cloranilo en 25 ml de tolueno.

El test se realiza de forma similar al test de ninhidrina. Se adiciona una pequeña porción de peptidil-resina en un tubo de vidrio, y se añaden 4 gotas de acetona y 1 gota de solución saturada de cloranilo, a temperatura ambiente. Una coloración azul-verdosa señala la presencia de aminas

secundarias libres, y por lo tanto indica un resultado positivo del test. Este método no es tan sensible como el test de Kaiser.

3.3.3.3 Test del TNBS

Este ensayo permite la detección de aminas primarias y secundarias [135]. EL TNBS (ácido trinitrobenceno sulfónico) reacciona con los grupos aminos, obteniéndose una coloración naranja. Para realizar el test se procede de forma similar a los anteriores. Se adiciona una alícuota de peptidil-resina a un tubo de vidrio, se añaden 3 gotas de DIEA al 10 % en DMF y 3 gotas de TNBS al 1 % en DMF. La aparición de perlas naranjas indica que hay grupos aminos libres.

3.3.4 Desprotección del grupo α -amino

El grupo protector α -amino (Fmoc) del último aminoácido de la cadena se elimina antes de la unión del siguiente aminoácido. Este grupo es lábil frente a bases orgánicas, principalmente aminas secundarias, pero también puede eliminarse con aminas primarias y terciarias. En este trabajo se utilizó una disolución de piperidina al 20% en DMF. Posteriormente, se realizaron lavados con DMF para eliminar los restos de piperidina.

3.4 Modificaciones químicas realizadas en la peptidil-resina

3.4.1 Adición de sondas fluorescentes

Una vez acabada la síntesis de péptidos y previamente al proceso de desanclaje, algunos péptidos fueron marcados con sondas fluorescentes como la Rho. Tras la desprotección del último aminoácido añadido a la peptidil-resina, se incorporó la Rho. Para ello, se utilizaron como activadores del grupo α -carboxilo la N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). Tanto los reactivos de acoplamiento como las sondas fluorescentes se emplearon con un exceso de tres veces respecto a la funcionalidad de la resina. La Rho y el HOBt se

disolvieron en la mínima cantidad de DMF y seguidamente se añadió la DIPCDI. La mezcla de activación se dejó en reposo aproximadamente 10 minutos para garantizar la formación del éster activo, el cual posteriormente se adicionó a la peptidil-resina. Después de un tiempo de reacción de 24 h realizó el test de ninhidrina.

3.4.2 Síntesis de lipopéptidos

Para obtener los lipopéptidos, se añadió ácido palmítico (3 equivalentes) al extremo N-terminal del péptido. La derivatización lipofílica se llevó a cabo con el péptido unido a la resina y con las cadenas laterales de los aminoácidos protegidas. Se utilizaron como activadores DIPCDI/HOBt (3 equivalentes) en medio de DMF. Una vez incorporado el ácido palmítico a la peptidil-resina, se chequeó la reacción utilizando el test de ninhidrina.

3.5 Secado de la peptidil resina

Una vez terminada la síntesis, se procedió al secado de la peptidil resina con diferentes reactivos según se muestra a continuación (Tabla 5). Finalmente, la peptidil resina se colocó en una descadora bajo vacío para eliminar los restos de disolventes.

Tabla 5. Procedimiento de secado de la peptidil resina.

Pasos	Lavados	Ciclos x tiempo (min)
1	Ácido acético	2x1
2	Diclorometano	2x1
3	Metanol	2x1
4	Éter	4x1

3.6 Desprotección final y liberación del péptido

La desprotección final y liberación del péptido de la resina se llevó a cabo mediante un mecanismo de acidólisis, para ello se utilizó el Ácido trifluoroacético (TFA). Este proceso se realizó en función de los residuos de aminoácidos presentes, grupos protectores de las cadenas laterales y del tipo de espaciador unido a la resina.

Para desanclar el péptido de la resina y desproteger las cadenas laterales se preparó un cóctel que contiene TFA/BME/H₂O/TIS (94:2,5:2,5:1). La cantidad correspondiente de peptidil resina se puso a reaccionar con el cóctel de desanclaje (10 mg de resina/ml cóctel) durante 3 h a temperatura ambiente bajo agitación. A continuación, se evaporó el TFA bajo corriente de N₂ (g) y se realizaron 10 lavados con éter frío para garantizar una mayor precipitación del péptido. Tras cada lavado, se centrifugó a 3000 rpm (centrífuga Digicen 20-R), durante 4 min a 10°C. Posteriormente, se liofilizó el péptido en una solución de ácido acético al 30% y se almacenó en un congelador a -20°C.

3.7 Caracterización analítica de los péptidos

3.7.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a escala analítica

La caracterización de los péptidos se llevó a cabo por HPLC. Se utilizaron las columnas de fase reversa Kromasil (Teknokroma) C₈ (4,6 x 250 mm y 5 µm de tamaño de partícula) y la columna *Eclipse Plus* C₁₈ (4,6 x 100 mm, y 3,5 µm de tamaño de partícula). Los péptidos se eluyeron a un flujo de 1 ml/min y un gradiente lineal de los disolventes A y B (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA). La detección se realizó a 220 y 280 nm.

3.7.2 Cromatografía de ultrapresión adaptado a espectrometría de masas de ionización por electrospray (UPLC/ES-MS)

Los pesos moleculares de los péptidos fueron analizados mediante un espectrómetro de masas por ionización por electrospray acoplado al cromatógrafo UPLC ACQUITY (Waters). La medida de masas por electrospray (ES-MS) consiste en la generación de un spray de iones de la muestra a una determinada energía en la cámara de ionización. Estos iones pasan al analizador mediante una serie de lentes con un voltaje determinado. Para ello, se utilizó un detector líquido-masas de tiempo de vuelo (LC-TOF) LCT Premier XE (Micromass Waters) con una interfase electrospray positiva (ES^+) o negativa (ES^-), en función de la molécula a analizar. Se empleó una columna en fase reversa ACQUITY UPLC BEH C_{18} 2,1 x 100 mm y tamaño de partícula 1,7 μm (Waters). Los péptidos se eluyeron a un flujo 0,3 ml/min y un gradiente lineal de los disolventes A (H_2O con 20 mM HCOOH) y B (ACN con 20 mM HCOOH). La detección se realizó a 220 y 280 nm.

3.7.3 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Los pesos moleculares de los péptidos sintetizados fueron analizados mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF. Esta técnica utiliza el láser como fuente de ionización y consiste en bombardear directamente la muestra cristalizada constituida por una mezcla del péptido y una matriz.

La preparación de la muestra se realizó disolviendo el péptido (1-2 $\mu g/\mu l$) en ACN/ H_2O al 30% con 0,1% TFA. Seguidamente 1 μl del péptido disuelto se mezcló con 1 μl de la matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB). Finalmente, 1 μl de esta mezcla se colocó en la placa de MALDI-TOF y se dejó secar a temperatura ambiente.

Las muestras se depositaron en una placa MTB 384 *polished steel* (Bruker). Se utilizó como método de adquisición el método lineal con un voltaje de

polaridad positiva con un laser de nitrogeno de 200 nm y 500 *shots* para cada uno de los espectros. Para confirmar los resultados obtenidos por MALDI-TOF, las secuencias peptídicas se introdujeron en un programa de cálculo (EXPasy tool) para determinar el peso molecular teórico.

3.8 Purificación de los péptidos

3.8.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a escala semipreparativa

Las moléculas peptídicas sintetizadas se purificaron por HPLC a escala semipreparativa con las columnas Bridge (Agilent) de fase reversa C8 y C18, 22 X 250 mm y un tamaño de partícula de 5 µm. Se utilizó un flujo de elución de 3 ml/min con un gradiente lineal de los disolventes A (H₂O con 0,05% de TFA) y B (ACN con 0,05% de TFA). La detección se realizó a 220 nm. Las fracciones recogidas durante la purificación de los diferentes péptidos, se caracterizaron mediante HPLC analítico y espectrometría de masas (UPLC/ES-MS y/o MALDI-TOF).

3.8.2 Extracción en fase sólida

Los crudos peptídicos obtenidos con una pureza mayor del 95% fueron purificados en columnas Oasis HLB Plus cartridge 225 mg/60 µg de Waters, por extracción en fase sólida. En primer lugar se acondicionó la columna con 5 ml de metanol y posteriormente 5ml de H₂O. A continuación, se añadió 1 mg/ml de péptido disuelto en H₂O/ACN y se adicionó 5 ml H₂O con 0,1% TFA para eluir las sales del crudo peptídico. Posteriormente, se eluyó el péptido con 5 ml de H₂O/ACN (80:20). Por último se añadieron 5 ml de ACN para recoger parte del péptido que podía haber quedado retenido en la columna. Cada fracción de filtrado fue colectada en tubos diferentes. Los filtrados recogidos, se caracterizaron por HPLC analítico y espectrometría de masas (UPLC/ES-MS y/o MALDI-TOF).

3.9 Obtención de NPs poliméricas que contienen FB

Las NPs que contienen FB se prepararon mediante la técnica de desplazamiento del disolvente descrito por Fessi et al. [136]. Esta técnica se basa en la precipitación de un polímero en solución tras su incorporación a una solución acuosa. En este procedimiento, el polímero debe ser insoluble en la fase acuosa mientras que su disolvente tiene que ser miscible en dicha fase. La difusión de la fase orgánica (conteniendo el fármaco y el polímero disueltos) en una solución acuosa de un tensioactivo, manteniendo una agitación constante, provoca la precipitación instantánea del polímero y la formación de estructuras matriciales en forma de nanoesferas.

En este estudio se preparó una fase orgánica de 90 mg de polímero PLGA-503H (50:50) y 10 mg de FB disueltos en 5 ml de acetona. La fase acuosa contiene 100 mg (1% w/w) de Poloxámer 188 (Lutrol[®] F68) en 10 ml de agua destilada con posterior ajuste del pH a 3,5. A continuación, se vierte la fase orgánica, gota a gota, sobre la fase acuosa manteniendo una agitación moderada durante 5 minutos. Las NPs se forman instantáneamente por una rápida difusión del disolvente al medio acuoso. Posteriormente, el solvente orgánico se elimina de la suspensión sometiéndola a presión reducida, lo que permite concentrar la suspensión hasta el volumen deseado (10 ml). En la Figura 12 se muestra la obtención de las NPs, mediante el método desplazamiento del disolvente.

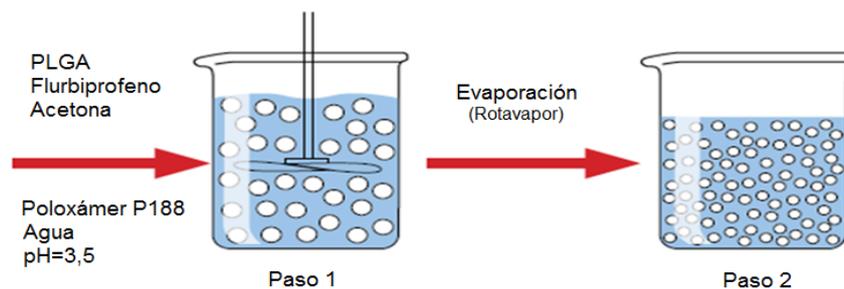


Figura 12. Elaboración de NPs en forma de nanoesferas mediante el método del desplazamiento del disolvente.

3.10 Síntesis de las NPs PLGA y conjugación del péptido PF-HIV-1

Las NPs PLGA se prepararon mediante la técnica del desplazamiento del disolvente, pero utilizando el tensioactivo polivinil alcohol (PVA, 1% w/w). Las NPs fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 30 min a 4°C y posteriormente se resuspendieron en agua Milli Q y fueron lavadas 3 veces en las mismas condiciones. Posteriormente, 5 ml de NPs (9 mg/ml) fueron incubados con 2,4 mg (21,1 µmol) de NHS y 4,4 mg (21,1 µmol) de EDC. Transcurridas 2 horas, las NPs PLGA-NHS se unieron covalentemente con los grupos amino terminales del péptido PF-HIV-1 (3,6 mg, 1,7 µmol), durante 20 horas. Las NPs PLGA-PF-HIV-1 fueron centrifugadas y lavadas como se explicó anteriormente. Por último se determinó el tamaño de partícula y el Z_{pot} .

Las NPs PLGA-PF-HIV-1 fueron dializadas durante 24 horas utilizando membranas de celulosa (Mw cut-off 12000 D, Iberlabo, Spain). La cantidad de péptido libre fue cuantificado mediante HPLC de fase reversa, utilizando una columna C8, flujo 1ml/min a un gradiente de 95-5% (H₂O/ACN). La eficiencia de conjugación (EC) del péptido PF-HIV-1 se determinó mediante el porcentaje de péptido conjugado en la superficie de las NPs de PLGA, según la (Ecuación 2):

$$EC (\%) = \frac{\text{Cantidad de péptido en la superficie de NPs}}{\text{Cantidad total de péptido}} \times 100\%$$

(Ecuación 2)

3.10.1 Ensayo STD-RMN

Previamente al ensayo, las NPs liofilizadas PLGA-PF-HIV-1 (4 mg) se resuspendieron en 90%/10% H₂O/D₂O y posteriormente en DMSO-d₆.

Para estudiar la influencia de las señales, se utilizó como control NPs PLGA (8 mg) disueltas en DMSO-d₆.

Para llevar a cabo el ensayo de STD, 1,3 mg de NPs PLGA-PF-HIV-1 se pusieron a reaccionar con una solución que contenía 0,75 mM del péptido E1P8 cíclico disuelto PBS (10% D₂O), pH=7,4. Posteriormente, se analizaron los espectros STD a diferentes relaciones molares de E1P8 cíclico: NPs PLGA-PF-HIV-1(12:1 y 40:1).

Por otra parte se ensayaron los péptidos controles VIR576 (positivo) y E1P32 (negativo) en medio PBS (10% D₂O), a una relación molar (12:1).

Este estudio se llevó a cabo utilizando el equipo de RMN Varian 500 Hz procedente de la Unidad de Resonancia Magnética Nuclear del IQAC-CSIC.

3.11 Pegilación de las NPs y conjugación de los péptidos

Las NPs pegiladas se prepararon a partir de la suspensión PLGA-503H (50:50) (9 mg/ml en agua destilada). Las mismas se incubaron con 2,4 mg (21,1 μmol) NHS y 4,4 mg (21,1 μmol) de EDC, durante 24 horas a temperatura ambiente y pH a 3,5. Las NPs PLGA-NHS activadas se adicionaron 5,2 mg (2,6 μmol) de Maleimido-PEG-NH₂ (2000 Da), durante 24 horas a temperatura ambiente. Las NPs PLGA-PEG-Maleimido se unieron covalentemente con 2,6 μmol de los péptidos (9,4 mg POD ó 5mg Tat-HIV), durante toda la noche a temperatura ambiente. La conjugación del PEG con los péptidos se siguió mediante espectrometría de masas (EM-MALDI-TOF). La cantidad de PEG y péptido libre fueron separados de las NPs mediante centrifugación a 14,000 rpm, 4 °C durante 30 minutos. Posteriormente fueron cuantificados utilizando métodos colorimétricos.

3.11.1 Cuantificación de PEG: Ensayo TNBS

En tubos de ensayo separados se mezclaron 100 μl de solución acuosa que contiene PEG libre o tampón borato, pH 8,0 (para el blanco); 900 μl de tampón borato 0,1 M (pH 9,3) y 40 μl de 0,03 M de TNBS. La solución fue

incubada a temperatura ambiente durante 30 min. La absorción se midió a 420 nm en un espectrómetro UV/Visible. La cantidad de PEG se calculó restando la cantidad total añadida en la reacción [137].

3.11.2 Cuantificación de péptidos: Ensayo de Ellman

El péptido libre fue diluido en tampón fosfato de sodio (0,1 M y pH=8), conteniendo 0,1-0,2 μ moles de péptido. 100 μ l de DTNB se añadieron a la solución del péptido y dejaron reaccionar durante 15 minutos. El DTNB disuelto en el tampón se utilizó como solución de referencia. La absorbancia fue determinada a 410 nm en un espectrómetro UV/Visible. La concentración de grupos sulfhidrilo se calculó utilizando la (Ecuación 3) [138]:

$$[\text{SH}] = \frac{[A_{410} (\text{muestra}) - A_{410} (\text{referencia})]}{13650}$$

(Ecuación 3)

3.12 Síntesis del PLGA-PEG y PLGA-PEG-Péptido

Se disolvió 1 gramo (32,3 μ mol) de Ácido Poliláctico-co-glicólico (PLGA 50:50 @ RG 503H) con viscosidad inherente de 0,32-0,44 dl / g en 2 ml de cloroformo. Posteriormente se adicionaron 45 mg (234,7 μ mol) de EDC y 27 mg (234,6 μ mol) de NHS y se dejó reaccionar toda la noche, bajo agitación en vial herméticamente cerrado. El PLGA-NHS preactivado se precipitó con 8 ml de éter dietílico y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El proceso de disolución-precipitación se repitió tres veces. El PLGA-NHS obtenido se secó al vacío y se almacenó a -20 °C. A continuación, se disolvieron 500 mg (16,2 μ mol) de PLGA-NHS en 1 ml de cloroformo, y posteriormente se adicionaron 35 mg (17,5 μ mol) de PEG (NH₂-PEG-Maleimido ó NH₂-PEG-m) y 20 μ l (117,15 μ mol) de DIEA, y se dejó reaccionar en vial cerrado herméticamente, bajo agitación

durante toda la noche. El producto se precipitó con 8 ml de éter: metanol (80:20) frío y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Después se desechó el sobrenadante, el producto se volvió a disolver en 2 ml de cloroformo y el ciclo de lavado se repitió dos veces. El polímero PLGA-PEG fue secado bajo vacío y el almacenado a -20 °C.

El rendimiento se calculó mediante la (Ecuación 4):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{m(\text{PLGA} - \text{PEG})}{m(\text{PLGA} - \text{NHS}) + \text{PEG} - \text{NH}_2} \cdot 100\%$$

(Ecuación 4)

Para la conjugación de los péptidos al polímero PLGA-PEG-Maleimido, 2,7 μmol de los péptidos (9,8 mg POD ó 5,2 mg Tat-HIV) se disolvieron en 250 μl de acetonitrilo/DMF; posteriormente fueron adicionados a una solución que contenía 100 mg de PLGA-PEG-Maleimido disueltos en 1ml de cloroformo. La mezcla se dejó reaccionar, en vial bien cerrado, bajo agitación durante toda la noche. El producto se precipitó con 3 ml de éter: metanol (80:20) frío y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Seguidamente se descartó el sobrenadante y el producto se volvió a disolver en 2 ml de cloroformo. Este ciclo se repitió dos veces y el PLGA-PEG-Péptido se secó al vacío. La técnica de RMN- ^1H se utilizó para determinar la unión del polímero a los péptidos. El polímero PLGA-PEG fue disuelto en CDCl_3 y PLGA-PEG-Péptido en DMSO-d_6 . Los polímeros fueron analizados en un espectrómetro RMN Varian (Agilent) Inova 500 MHz procedente de la Unidad de Resonancia Magnética Nuclear del IQAC-CSIC.

Por último, las NPs PLGA-PEG-m y PLGA-PEG-Péptido que contienen FB fueron preparadas según el procedimiento general descrito en el apartado 3.9.

3.12.1 Síntesis del PLGA-PEG-Péptido-Rho

Los péptidos POD y Tat-HIV fueron previamente marcados con Rho y se unieron al polímero PLGA-PEG-Maleimido. Finalmente se prepararon las NPs utilizando el método del desplazamiento del disolvente y se determinaron los parámetros de las NPs marcadas (tamaño, polidispersión y Z_{pot}). La cantidad de Rho se determinó mediante espectroscopía de fluorescencia a longitudes de onda de excitación 555nm y emisión 580nm.

Posteriormente, las NPs PLGA-PEG-Péptido-Rho se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Se utilizó un Microscopio Óptico de Alta Resolución y Análisis Espectral proveniente del Grupo QCI-CSIC. Este equipo incorpora un módulo para estudiar los elementos fluorescentes de la muestra. Las NPs se excitaron con un láser a una longitud de onda de 572 nm con una emisión en un rango entre 570 nm y 590 nm.

3.12.2 Conjugación de las NPs PLGA-PEG-Maleimido a los péptidos anti-HIV-1

Para la obtención de las NPs, se partió del polímero PLGA-PEG-Maleimido. Posteriormente se procedió a la preparación de las NPs mediante el método del desplazamiento del disolvente utilizando como tensioactivo en este caso el PVA (1% w/w).

Con el fin de estudiar la influencia del PEG en la composición estructural las NPs PLGA-PEG-Maleimido, las mismas fueron analizadas mediante RMN-¹H. Previamente las NPs fueron lavadas y centrifugadas 3 veces a 14000 rpm durante 30 min, y seguidamente fueron liofilizadas durante 24 horas. Posteriormente 10 mg de NPs se resuspendieron en 700µl de CDCl₃ y D₂O; y los espectros de RMN-¹H fueron obtenidos en espectrómetro RMN Varian (Agilent) Inova 500 MHz.

La conjugación del péptido P6-2 a las NPs PLGA-PEG-Maleimido se llevó a cabo coicubando 3 ml de NPs (9 mg/ml) con 3 mg de péptido. Después de

24 horas las NPs fueron dializadas utilizando membranas de celulosa (Mw cut-off 12000 Da, Iberlabo, Spain). Finalmente se determinó el tamaño, polidispersión, Z_{pot} y EC. Los resultados fueron comparados con los obtenidos mediante RMN- 1H .

3.13 Obtención de liposomas derivatizados con péptidos anti-HIV-1

Se prepararon liposomas del tipo LUVs que contenían los péptidos P6-2 y VIR576-GGGS-P6-2. Los liposomas se formularon a partir de PC, PC-Chol, PC-Chol-SM, PC-Chol-GalCer y PC-Chol-SM-GalCer a diferentes relaciones molares:

- PC. Se pesaron 9,24 mg de PC (12 μ mol)
- PC:Chol. Se pesaron 9,24 mg de PC (12 μ mol) y 4,64 mg de Chol (12 μ mol).
- PC:Chol:SM. Se pesaron 9,24 mg de PC (12 μ mol), 4,64 mg de Chol (12 μ mol) y 4,26 mg de SM (6 μ mol).
- PC:Chol:GalCer. Se pesaron 9,24 mg de PC (12 μ mol), 4,64 mg de Chol (12 μ mol) y 4,20 mg de SM (6 μ mol).
- PC:Chol:SM:GalCer. Se pesaron 9,24 mg de PC (12 μ mol) , 4,64 mg de Chol (12 μ mol) y 2,13 mg de SM (3 μ mol) y 2,10 mg de GalCer (3 μ mol).

Se procedió a disolver las diferentes composiciones de lípidos en una mezcla de cloroformo: metanol (2:1). Posteriormente se evaporó la fase orgánica en un evaporador rotatorio. La evaporación es un proceso endotérmico que provoca el enfriamiento del balón, por lo que en ocasiones se calentó dicho balón para favorecer el proceso. Cuando se formó una película fina en el fondo del balón, se dejó la muestra en la liofilizadora durante una hora para eliminar las posibles trazas de disolventes orgánicos.

La película lipídica se resuspendió en 2 ml de tampón HBS (10mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl y 3,4 mM EDTA). En el caso de los LUVs

cargados con los péptidos, los mismos se disolvieron previamente en el tampón HBS, cuestión de obtener una concentración de 1 mg/ml. La mezcla se agitó hasta que la película desapareciera del fondo del balón, obteniéndose una dispersión de apariencia blanca y homogénea. Esta dispersión está formada por liposomas MLV de la composición deseada.

Se desestabilizaron las lamelas concéntricas sometiendo a los MLV a una serie de ciclos de congelación y descongelación, pasando las muestras desde un baño de nieve carbónica a un baño de agua caliente a una temperatura 80°C. Se repitió el proceso 10 veces, obteniéndose unas vesículas unilamelares alargadas denominadas FTMLV (*Freeze and Thaw Multilamellar Vesicles*).

3.13.1 Método de extrusión

Para conferir a los LUVs el tamaño y la morfología deseada se empleó el método de extrusión a través de membranas de policarbonato descrito por Hope et al [139]. Este método permite variar el tamaño de las vesículas dependiendo del diámetro del poro de las membranas utilizadas. Las membranas consisten en una delgada lámina de policarbonato en las que se han practicado poros de un diámetro exacto por medio de un láser. Para la realización del trabajo se emplearon membranas de 200 nm y 400 nm de diámetro de marca *Nucleopore*, con la finalidad de obtener poblaciones más homogéneas. Los liposomas se pasaron a través de un extruder (*LIPEX™ Extruder*) sometidos a una corriente de nitrógeno gaseoso a una presión de 200 psi. La velocidad de paso de la suspensión a través de las membranas dependió del tamaño y de la concentración de los liposomas originales.

3.13.2 Método de sonicación

Para homogenizar el tamaño de los liposomas se utilizó también el método de sonicación. Los liposomas se sonicaron durante 2 minutos, dejando 5

minutos de incubación a 55 °C entre cada ciclo de sonicación, hasta completar un total de 10 ciclos.

3.14 Caracterización de las formulaciones

3.14.1 Morfometría

La determinación de la morfometría (tamaño de partícula y polidispersión) se ha realizado por espectroscopia de correlación fotónica, mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz [140] que permite efectuar las determinaciones con un amplio margen de tamaños (0,6 nm-4 μm), en un tiempo de análisis corto y sin necesidad de dilución previa de la muestra, de la que no es necesario conocer su concentración.

Esta técnica espectroscópica se basa en la medida de las variaciones de la intensidad de la luz dispersada, debidas al movimiento browniano de las partículas de la muestra. Estas fluctuaciones no son constantes, de forma que la cantidad de luz dispersada por la solución oscila con el tiempo. La información que se obtiene mediante la luz dispersada, se puede relacionar con el coeficiente de difusión que, a su vez, permite obtener información del tamaño y forma de las partículas. Una de las maneras de analizar con precisión las fluctuaciones de la intensidad es operar con la llamada función de autocorrelación $F(\gamma)$ [141, 142]. Las condiciones de trabajo prefijadas fueron en este caso: índice de refracción del solvente (1,330), viscosidad (0,886 Poises) y temperatura (25°C). Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.14.2 Carga superficial

La carga superficial de las partículas, que es un parámetro indirecto de agregación de las mismas, se determinó mediante el análisis del potencial zeta (Z_{pot}) de las muestras en el nano zetasizer. El Z_{pot} se determinó en base a la movilidad electroforética (μ_E) de las partículas cargadas sometidas a un campo eléctrico, aplicando la ecuación de Henry [49] (Ecuación 5).

$$\mu_E = \frac{\varepsilon Z_{\text{pot}} f(K\alpha)}{6\pi\eta}$$

(Ecuación 5)

Donde: μ_E es la movilidad electroforética, ε es la constante dieléctrica del medio, η es la viscosidad del medio, K es el parámetro de Debye-Hückel, y $f(K\alpha)$ es un factor de corrección que tiene en cuenta el espesor de la doble capa y diámetro de la partícula. La unidad de K es una longitud recíproca $1/K$ se describe como el espesor de la doble capa eléctrica. Esta técnica permite trabajar a concentraciones elevadas de hasta un 60% en volumen, sin necesidad de dilución previa de la muestra. No obstante, en la determinación del Z_{pot} , si la formulación presenta agregados, en muchos casos conviene diluir la muestra hasta obtener un valor constante.

La morfometría y la carga superficial de las NPs que contienen FB se analizaron mediante un Zetasizer Nano ZS. Los ensayos se realizaron por triplicado expresando el resultado como la media aritmética de dichas determinaciones.

3.14.3 Microscopía electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido o SEM (*Scanning Electron Microscope*), es un instrumento que emplea el bombardeo de un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. También produce imágenes de alta resolución, de forma que las características más ínfimas de la muestra pueden ser examinadas con gran amplificación [143].

La preparación de las muestras es relativamente fácil ya que la mayoría de los SEM sólo requieren que estas sean conductoras. De esta forma, la muestra generalmente es recubierta con una capa de carbono o una capa delgada de un metal para conferirle carácter conductor. En este caso, las

NPs fueron centrifugadas previamente a 15000 rpm durante 40 min, se descartó el sobrenadante y el sólido se secó bajo vacío. La muestra sólida se depositó en un soporte metálico para el posterior recubrimiento de cromo mediante la pulverización catódica. Posteriormente las NPs se observaron en el SEM.

3.14.4 Microscopía de fuerza atómica

El microscopio de fuerza atómica o AFM (*Atomic Force Microscope*) es un instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los nanonewtons. Al rastrear una muestra, es capaz de registrar continuamente su topografía por diferencia en la fuerza atómica (atracción y repulsión) mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica. La sonda va acoplada a un listón o palanca microscópica muy flexible de sólo unos 200 μm [144].

En este caso, 20 μl de las NPs se depositaron en una placa de mica y se dejaron secar durante toda la noche. Las mediciones del tamaño y la altura de las secciones transversales se determinaron mediante el programa de procesamiento de imágenes Gwyddion 2.0.

3.14.5 Eficiencia de asociación de FB

La concentración de FB en las NPs se determinó mediante RP-HPLC [145]. La cantidad de FB libre se separó por la técnica de filtración / centrifugación utilizando filtros de centrifugas Ultracel YM-100 (Millipore Amicon1 Corporation, Bedford, MA) a 3000 rpm durante 30 min, previa dilución de las muestras (1:10) en agua destilada antes de la inyección. Se utilizó una columna de fase reversa Kromasil C-18 de 25 x 0,46 cm con un tamaño de partícula de 5 μm a un flujo de 1 ml / min. La señal de la muestra se detectó a 254 nm. La fase móvil consistió en ACN / agua (65/35) con ácido fosfórico (pH 2,5). La eficiencia de asociación (EA) se determinó mediante la (Ecuación 6):

$$EA (\%) = \frac{\text{Cantidad total de FB} - \text{FB libre}}{\text{Cantidad total de FB}}$$

(Ecuación 6)

3.14.6 Concentración de péptido total

El cálculo de la cantidad de péptido incorporado en los liposomas se llevó a cabo mediante HPLC, teniendo a escala analítica utilizando como eluyentes H₂O (0,05 % de TFA) y ACN (0,05 % de TFA). Se realizó una inyección directa de los liposomas cargados con los péptidos, los cuales se rompen automáticamente al ponerse en contacto con la fase móvil que contiene ACN. El contenido peptídico se calculó por comparación de las áreas entre la muestra liposómica problema y una solución patrón de concentración conocida.

3.14.7 Determinación cuantitativa de fosfolípido

Una de las variantes más empleadas para llevar a cabo la cuantificación de la concentración de fosfolípido presente en una suspensión se utilizó el método de McClare [146]. En este método, el fósforo, presente en forma de fosfolípido en la muestra, se hidroliza a fosfato inorgánico. Mediante la adición de heptamolibdato de amonio el fosfato se transforma en ácido fosfomolibdénico de color azul. La intensidad de este color azul se mide espectrofotométricamente y se compara con un patrón de calibrado, para conocer cuál es la concentración de fósforo.

Se preparó una disolución de 1 mM de NaH₂PO₄ x H₂O de la que se tomaron alícuotas para confeccionar la recta patrón. Para establecer el rango de la recta patrón se tuvo en cuenta la concentración aproximada de fosfolípido esperada.

El ensayo se divide en tres partes:

- a) Digestión: se añadió 0,4 ml de HClO_4 70% a cada uno de los tubos y se incubaron durante 1 hora a 180-190 °C.
- b) Reacción colorimétrica: se adicionaron a cada uno de los tubos 4 ml de heptamolibdato de amonio y 0,5 ml de ácido ascórbico; luego se agitaron las muestras con ayuda de un vortex. Los tubos se incubaron posteriormente en baño María durante 15 minutos a 100 °C.
- c) Lectura: La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 812 nm.

3.15 Estudio de liberación del FB de las NPs

El perfil de liberación "*in vitro*" de un principio activo a partir de una matriz polimérica es una característica de interés, ya que al determinar la cantidad de fármaco liberada en función del tiempo es posible ajustar la dosis administrada.

Uno de los métodos más utilizados para la caracterización de la liberación del principio activo a partir de sistemas coloidales es la técnica de la diálisis [147]. Esta técnica fue propuesta por Levy et al [148], basada en la dispersión directa de la suspensión coloidal en un medio de liberación, en el que se cumplen las condiciones Sink.

En este proceso el sistema coloidal se encuentra separado del medio de liberación por la membrana de diálisis. El principio activo liberado difundirá del interior del saco de diálisis al medio a favor de gradiente estableciéndose un rápido equilibrio.

El medio de liberación utilizado en este trabajo, se compone de tampón fosfato salino (PBS 0,1 M). El FB en solución de PBS se convierte a su forma de sal de sodio. El experimento se llevó a cabo en baño de agua a una temperatura de 32°C (temperatura de la película lagrimal). Las muestras (5ml) se colocaron en sacos de diálisis (membrana de celulosa Mw de corte

12.000 Da, Iberlabo, España). Cada saco se introdujo en 150 ml de PBS con agitación continua. En intervalos de tiempo específicos se tomaron 1 ml del medio y se sustituyeron inmediatamente con 1 ml de tampón fresco (PBS). La cantidad de FB liberado se determinó periódicamente por HPLC durante 8 horas.

3.15.1 Estudio cinético de liberación *in vitro*

Entre los modelos matemáticos más utilizados para analizar y describir el mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de liberación de un fármaco, se encuentra el modelo de Korsmeyer y Peppas en 1983 [149], el cual cumple con la Ley de Fick y se representa de la siguiente forma para tiempos pequeños (Ecuación 7):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K \times t^n$$

(Ecuación 7)

Donde M_t/M_∞ es la fracción de soluto que se ha liberado en un tiempo t , k es la constante de velocidad de liberación que incorpora características estructurales y geométricas del sistema de liberación y n es el exponente que indica el mecanismo mediante el cual ocurre la liberación del fármaco. Para evaluar el mecanismo de liberación, los datos para el primer 60% de la liberación del fármaco se representaron gráficamente en la ecuación Korsmeyer-Peppas como logaritmo del porcentaje acumulativo de FB liberado frente al logaritmo del tiempo de registro, y el exponente n se calculó a través de la pendiente de la línea recta. El mecanismo de difusión de fármacos a partir de matrices esféricas se clasifica en:

- Caso I (difusión de Fick) donde $n \leq 0,43$
- Transporte anómalo (difusión no Fickiana) donde $0,43 < n < 0,85$
- Caso II (orden cero) donde $n \geq 0,85$

3.16 Espectroscopía FTIR

La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se utilizó para estudiar la interacción de las NPs (PLGA, PLGA-PEG, PLGA-PEG-POD y PLGA-PEG-Tat-HIV) que contienen. Para ello, las muestras sólidas se depositaron directamente en un diamante. Los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro IR Nicolet 360 FT-IR con accesorio smart iTR, en modo transmisión, con una resolución de 4 cm^{-1} y 64 scans.

3.17 Estudio de estabilidad

El estudio de estabilidad acelerada se realizó mediante el procedimiento clásico. Las formulaciones se almacenaron a diferentes temperaturas (4°C y 25°C) y posteriormente se analizaron la morfometría, carga superficial y eficiencia de asociación del fármaco en intervalos de tiempo regulares. El estudio se realizó durante un mes, que es el tiempo de validez de las soluciones oftálmicas.

3.18 Fuerzas mucoadhesivas

Con el fin de evaluar las fuerzas mucoadhesivas de las NPs que contienen FB, se realizó el ensayo de interacción con la mucina midiendo los cambios en el Z_{pot} [150]. Cada una de la formulaciones (PLGA-PEG-NPs, PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs que contienen FB) se incubaron con igual volumen de una solución de mucina (0,1 w/v) bajo agitación moderada. Se determinó el Z_{pot} de las NPs durante la incubación a diferentes intervalos de tiempo (0, 30, 60, 120 min).

3.19 Estudios celulares

3.19.1 Estudio de citotoxicidad

La citotoxicidad de las NPs se evaluó en dos líneas celulares diferentes: HeLa y HepG2. Las dos líneas celulares se cultivaron usando DMEM suplementado con 10% de FBS inactivado y 1% de Penicilina-

Estreptomicina (P11- 010, PAA), como medio de cultivo y se incubaron a 37 °C en atmósfera 5% CO₂.

Se cultivaron células HeLa y HepG2 en cuatro placas de 96 pocillos (dos placas por cada línea celular: una para los controles y otra para las NPs) adicionando 100 µl de una suspensión de 100.000 células/ml, de modo que la densidad total fue 10.000 células/pocillo, e incubandolas durante 24 horas.

Posteriormente se eliminó el medio de cultivo y se reemplazó por 150 µl de medio que contiene las NPs en un rango de concentración 25 mg/ml a 0,1 mg/ml. Las placas se incubaron durante 24 horas.

Seguidamente, se eliminó el medio de cultivo de los pocillos para evitar interferencias y se reemplazó por 100 µl de reactivo MTT (5mg/ml en PBS 1x, dilución 1:5 en medio de cultivo fresco). Las placas se incubaron de nuevo durante 3 horas en las mismas condiciones.

Transcurrido este tiempo se aspiró de nuevo el medio de cultivo y se reemplazó por 100 µl de DMSO para solubilizar los cristales de formazán formados en la etapa anterior. La placa se dejó durante 2 horas a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Por último se realizaron lecturas de absorbancia a una longitud de 570 nm.

Con los datos obtenidos de densidad óptica (DO) se calculó el porcentaje de viabilidad y de citotoxicidad del cultivo celular en presencia de la formulación mediante las ecuaciones 8 y 9, así como la IC50 (valores de concentración donde la viabilidad celular corresponde al 50%). El cálculo de la IC50 se realizó mediante regresión no lineal con el programa GraphPad® (V5, Prism).

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{DO_{\text{células tratadas}}}{DO_{\text{células control}}} \times 100$$

(Ecuación 8)

$\% \text{ Citotoxicidad} = 100 - \% \text{ viabilidad}$

(Ecuación 9)

Donde:

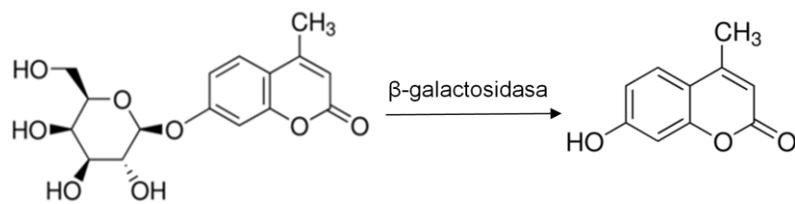
DO es la absorbancia del fomasán a 570 nm.

3.19.2 Ensayo de fusión celular

Los ensayos de fusión celular realizados en esta tesis se llevaron a cabo, empleando la línea celular HeLa-env (donada por el Dr. Julià Blanco de la Fundación IRSICaixa), que expresa las proteínas de la envoltura del HIV-1 (gp41 y gp120) e integra en su genoma el promotor LTR (*Long Terminal Repeats*) de éste y la línea celular TZM-bl, (AIDS Reagents Cat. No 8129), que expresa el receptor de membrana de los linfocitos CD4 y los correceptores CCR5 y CXCR4 e integra en su genoma el gen de la β -galactosidasa. Se llevaron a cabo en el Servicio de cultivos celulares del IQAC-CSIC de Barcelona.

En el ensayo de fusión celular se mimetiza la entrada del HIV-1 en la célula. Este modelo está bastante extendido [151-156], ya que permite seleccionar de forma rápida potenciales inhibidores de la fusión del HIV-1 sin necesidad de manipular el virus.

Cuando se produce la fusión celular de HeLa-env y TZM-bl se sobreexpresa el enzima β -galactosidasa, que cataliza la reacción de hidrólisis del sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido liberando 4-metilumbeliferona entre otros compuestos (Figura 13), el cual es monitorizado por fluorescencia, de modo que existe una relación inversa entre las unidades de fluorescencia y la actividad de inhibición de fusión del péptido.



4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido

4-metilumbeliferona

Figura 13. Hidrólisis del sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido en presencia de la enzima β -galactosidasa, liberando 4-metilumbeliferona.

Las líneas celulares se cultivaron en DMEM con 10% de FBS, 100 μ g/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Los cultivos celulares fueron mantenidos en un frasco de cultivo a 37°C y 5% de CO₂.

El ensayo se realizó en placas blancas de fondo transparente de 96 pocillos, con un volumen final por pocillo de 100 μ l.

En primer lugar, se cultivó HeLa-env (2500 células/pocillo) en presencia de concentraciones crecientes de péptidos (5-200 μ M), por triplicado, a 37°C y 5% CO₂ durante una hora. A continuación, se añadieron las células TZM-bl (25000 células/pocillo) y se incubó la placa durante 24 horas. Como control positivo de la fusión celular se empleó un inhibidor conocido de la fusión del HIV-1 (péptido C34) a una concentración de 1 μ M. Transcurridas 24 horas, se añadió a cada pocillo 5 μ l de una solución de detergente Igepal al 20% en tampón fosfato (100 mM, pH 7,2, 0,1 mM MgCl₂).

A continuación se descartaron 50 μ l de medio de cada pocillo, se añadieron 50 μ l de una solución de tampón fosfato (100 mM, pH 7,2, 0,1 mM MgCl₂) con 1 mM de metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido y se incubó para 30 min a 37 °C. Finalmente, se adicionó 150 μ l de tampón de glycine-NaOH (100 mM, pH 10,6) y se llevó a cabo la lectura de la placa en un espectrofluorimetro (SpectraMax), utilizando una longitud de onda de excitación de 355 nm y de emisión de 460 nm.

Con los resultados obtenidos se calcularon los porcentajes de fusión celular (Ecuación 10) y de inhibición de la fusión (Ecuación 11), así como la IC50 (concentración que inhibe el 50% la fusión celular) de cada péptido. Se ajustaron los datos obtenidos a una curva sigmoideal dosis-respuesta mediante el software GraphPad® (V5, Prism) y se calculó a partir de la curva sigmoideal la IC50 de cada péptido.

$$\% \text{ Fusión} = \left(\frac{F_f - F_0}{F_{100} - F_0} \right) \times 100$$

(Ecuación 10)

Siendo F_f el valor de la intensidad de la luminiscencia tras incubar las células con los péptidos, F_0 la intensidad de luminiscencia inicial de una de las líneas celulares y F_{100} la intensidad de luminiscencia del control de fusión celular.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \% \text{ fusión}$$

(Ecuación 11)

3.20 Ensayo de susceptibilidad del HIV-1 a los péptidos

El HIV-1 realiza de forma natural su ciclo biológico en las células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs) que contienen el receptor CD4 y los correceptores CXCR4 o CCR5. Aunque inicialmente los ensayos de susceptibilidad a los antivirales se realizaban mediante la infección de PBMCs con el HIV-1 en presencia de concentraciones crecientes de antivirales [157, 158], a medida que han transcurrido los años se han desarrollado nuevos métodos basados en la infección de líneas celulares [159-161] que permiten un análisis rápido y consistente. Los ensayos de susceptibilidad del HIV-1 a los péptidos se realizaron, en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico del Barcelona, bajo la dirección de la Dra. Eloisa Yuste.

El virus del HIV-1 se cultivó mediante la transfección de células 293T utilizando el método del fosfato de calcio de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ProFection mammalian transfection system; Promega, Madison, WI, USA).

Para llevar a cabo el ensayo se utilizó una placa de 96 pocillos. Se incubó el virus, un volumen de 75 μ l/pocillo y por triplicado, en presencia de concentraciones crecientes (5-500 μ M) de los péptidos a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 horas. Por último, se añadieron 10⁴ células TZMbl/pocillo y se incubó la placa a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas (periodo de tiempo durante el cual el virus es capaz de realizar un ciclo de replicación).

Como control positivo de máxima infección se reservaron pocillos con TZM-bl infectadas en ausencia de péptido y como control negativo se reservaron pocillos sólo con células.

Las células TZM-bl, como se ha descrito anteriormente, expresan el receptor de membrana de los linfocitos CD4 y los correceptores CXCR4 y CCR5, por lo que son susceptibles de ser infectadas por el HIV-1. Además, integran en su genoma el gen de la luciferasa, lo que permite medir la infección de los cultivos tras 72 horas de incubación, siendo la dosis infecciosa proporcional a la cantidad de compuesto producido.

Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el sobrenadante y se leyó la luminiscencia mediante un luminómetro utilizando un kit de la luciferasa.

Con los resultados obtenidos se calculó la IC₅₀ (concentración necesaria para inhibir el 50% la infección viral) de cada péptido; para ello se ajustaron los datos obtenidos a una curva sigmoïdal dosis-respuesta mediante el software GraphPad® (V5, Prism).

3.21 Estudio de tolerancia ocular: HET-CAM

Se realizó el ensayo de HET-CAM utilizando huevos fecundados de gallina procedentes de la Granja Bellavista (Lliçà d'Amunt, Barcelona). Estos

huevos se mantienen al abrigo de la luz y a una temperatura de $12 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un mínimo de 24 horas antes de colocarlos en la incubadora con temperatura y humedad controladas (temperatura óptima: $37,8^\circ\text{C}$, humedad comprendida entre 50 y 60%), durante 10 días.

El huevo se colocó verticalmente sobre un soporte con la parte ancha hacia arriba que es la zona donde se encuentra la cámara de aire. Se recortó la cáscara, en forma circular, a nivel de la cámara de aire teniendo cuidado de no lesionar la CAM (Figura 14A). Con unas pinzas de bordes romos se retiró la cáscara y la primera membrana blanquecina, previa humectación de la misma con una solución isotónica de cloruro de sodio, hasta dejar al descubierto la CAM (Figura 14B). Para evaluar el efecto irritante, se aplicaron 300 μl de las NPs en 6 huevos (Figura 14C). Previamente se adicionó el control positivo (NaOH 0,1 M) en 2 huevos para detectar los cambios que ocurren en la membrana (vasoconstricción, hemorragia y coagulación) (Figura 14D).

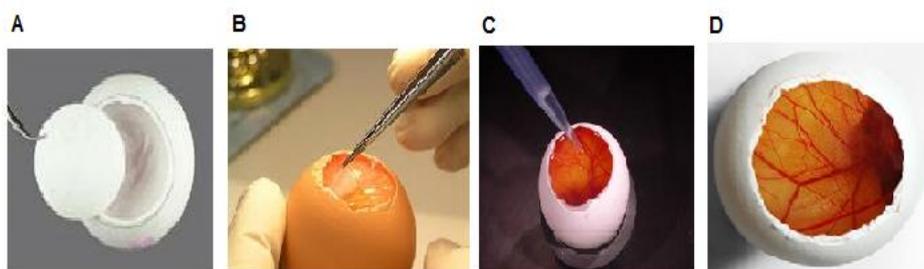


Figura 14. Los huevos fecundados de gallina incubados durante 10 días, se recortó la cáscara, en forma circular (A) y se elimina una primera membrana blanquecina (B) para exponer la CAM. Posteriormente se aplican las formulaciones (C) y se valoran los fenómenos de forma visual (D).

La intensidad de las reacciones se evaluó semi-cuantitativamente en una escala de 0 (ninguna reacción) a 3 (fuerte reacción). El tiempo de aparición y la intensidad de las reacciones se evaluaron durante 5 minutos.

El índice de irritación ocular (IIO) se calculó mediante la expresión siguiente (Ecuación 12):

$$OII = \frac{(301 - h) \times 5}{300} + \frac{(301 - l) \times 7}{300} + \frac{(301 - c) \times 9}{300}$$

(Ecuación 12)

Donde: h es el tiempo (en segundos) del inicio de la hemorragia, l de lisis y C de la coagulación. La clasificación de las muestras se realizaron en base a la siguiente escala: La $OII \leq 0,9$: ligeramente irritante; $0,9 < OII \leq 4,9$: moderadamente irritante; $4,9 < OII \leq 8,9$: irritante; $8,9 < OII \leq 21$: gravemente irritante. Según el valor de este índice, las formulaciones se clasificaron según la Tabla 6.

Tabla 6. Clasificación de los productos según el índice de irritación ocular (IIO) del método HET-CAM.

IIO	CLASIFICACIÓN
0 - 0,9	Prácticamente no irritante
1 - 4,9	Débilmente irritante
5 - 8,9	Moderadamente irritante
9 - 21	Irritante

3.22 Estudios *ex vivo* e *in vivo*

Los ensayos *ex vivo* e *in vivo* se han realizado con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona, con arreglo a las regulaciones actuales para el uso y la manipulación de animales de experimentación (Decreto 214/97, Generalitat de Catalunya).

Para estos estudios se utilizaron conejos machos albinos de Nueva Zelanda con un peso de 1,8 kg a 2,2 kg que no presentaban signos de anomalías o inflamación ocular. Los conejos fueron suministrados por la Granja San Bernado (Navarra). Se utilizaron 3 conejos para cada uno de los ensayos, de acuerdo con los principios de Reducción, Refinamiento y Reemplazo animal (3R) [162, 163] . Durante el tiempo de experimentación los conejos se mantuvieron en el estabulario de la Facultad de Farmacia (Universidad de Barcelona) en condiciones estandarizadas de temperatura (26-28°C) y humedad relativa (40-60%), con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

La irritación asociada a la instilación de suspensiones hipo e hipertónicas puede causar parpadeo o lagrimeo, por esta razón se ajustó la osmolaridad (alrededor de 310 mOsm/Kg) a cada una de las formulaciones con 5% (w/v) de glucosa. El pH del fluido lagrimal es uno de los aspectos importantes a tener en cuenta en la preparación de fármacos oculares. En este sentido, se ajustó el pH (7,4) a todas las formulaciones testadas con NaOH 0,1N.

3.22.1 Estudios *ex-vivo* mediante microscopía confocal laser (CLSM)

Un volumen de 50 µl de cada una de las formulaciones fue administrada en el saco conjuntival del conejo vivo. Después de 2 horas de la instilación, el conejo fue sacrificado. Primero fue anestesiado con xilacina (5mg/kg de conejo) y ketamina (35mg/kg de conejo). Posteriormente se inyectó una sobredosis de pentobarbital sódico (5ml) via vena marginal de la oreja. Se instiló en el ojo del conejo 50µl de una solución de 4% de formaldehido en PBS para fijar la cornea. Una vez extraídas las corneas se lavaron 3 veces con suero fisiológico. Finalmente se adicionaron 50µl de los colorantes de membrana (WGA) y de núcleo (Hoescht).

Las imágenes se tomaron en un microscopio confocal láser de barrido (CLSM). El CLSM utilizado procede de los Serveis Científicotècnics de la

Universidad de Barcelona, España. Este microscopio es modelo Leika TCS SP2, láser AOTF, con un aumento de 40x/1,25. Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas mediante la excitación de un láser a diferentes longitudes de onda: 364 nm, 488nm y 561nm.

3.22.2 Estudio de tolerancia ocular: Test de Draize

El estudio de irritación ocular primaria se ha llevado a cabo utilizando una modificación del test de Draize (Kay y Calandra, 1962) [164].

Para realizar este ensayo se aplicaron 50 µl de NPs en el ojo derecho del conejo. El ojo contralateral se utilizó como control sin tratar. Tras 1 h de exposición, se realizó la observación de los ojos para valorar las posibles lesiones en la córnea, la conjuntiva y el iris y posteriormente se realizaron lecturas al cabo de 24 y 48 h. Una modificación del test de Draize prolonga el período de evaluación a 72 h (3 días), 96 h (4 días) y 168 h (7 días). Se efectuaron exámenes (por observación directa) del segmento anterior del ojo, constatando las posibles lesiones de la conjuntiva (quemosis, inflamación, exudación, enrojecimiento), del iris y de la córnea (grado de opacidad y superficie afectada). Las lesiones que afectan a cada estructura ocular se evalúan en función del índice de irritación ocular (IO) según un baremo establecido (Tabla 7 y Tabla 8).

Tabla 7. Clasificación de los productos según el índice de irritación ocular máximo (IOMáx).

IOMáx	CLASIFICACIÓN
0	No Irritante
0-15	Ligeramente irritante
> 15-30	Medianamente iritante
> 30-50	Irritante
> 50	Muy Irritante

Tabla 8. Escala de puntuaciones para evaluar del grado de irritación ocular.

ESTRUCTURA	LESIÓN	EVALUACIÓN	PUNNTUACIÓN
CÓRNEA	A) <u>GRADO DE TURBIDEZ U OPACIDAD</u>		
	• Ausencia de ulceración u opacidad	0	<u>Puntuación corneal:</u> (Ax5)
	• Areas difusas de opacidad dispersa	1	
	• Areas traslúcidas	2	
	• Areas opalescentes	3	
	• Completa opacidad	4	
	B) <u>SUPERFICIE AFECTADA</u>		<u>Puntuación máxima:</u> (80)
	• Ninguna	0	
	• Un cuarto o menos sin llegar a cero	1	
	• Más de un cuarto pero menos de medio	2	
• Más de medio pero menos de tres cuartos	3		
• Más de tres cuartos hasta un plano entero	4		
IRIS	• Normal	0	<u>Puntuación iridial:</u>
	• Pliegues profundos, congestión, inflamación e inyección circuncorneal moderada	1	Ax5 <u>Puntuación máxima:</u> 10
	• No existe reacción a la luz, hemorragia, gran destrucción.	2	

ESTRUCTURA	LESIÓN	EVALUACIÓN	PUNNTUACIÓN
CONJUNTIVA	A) <u>ENROJECIMIENTO</u>		
	• Vasos normales	0	
	• Algunos vasos claramente inyectados	1	
	• Enrojecimiento difuso	2	
	• Gran enrojecimiento difuso	3	<u>Puntuación</u>
	B) <u>QUEMOSIS O INFLAMACIÓN</u>	0	<u>conjuntival:</u>
	• Ninguna	1	(A+B+C) x 2
	• Alguna	2	
	• Marcada con trastorno parcial de los párpados	3	
	• Párpados más o menos cerrados	4	<u>Puntuación</u>
	• Párpados semicerrados		<u>máxima:</u>
	C) <u>EXUDACIÓN</u>		(20)
	• Ninguna	0	
• Cualquier cantidad anómala	1		
• Humectación parpebral y pelos	2		
• Humectación periocular	3		

La puntuación del test de Draize se determinó a partir de la observación visual de los cambios que aparecen en las estructuras oculares. La puntuación total media (PTM) se calculó según la siguiente (Ecuación 13):

$$PTM = \Sigma x_1(n)/5 + \Sigma x_2(n)/2 + \Sigma x_3(n)/5$$

(Ecuación 13)

Donde: x1 (n), x2 (n), and x3 (n) son las puntuaciones de la córnea, conjuntiva e iris, y n es el número de conejos utilizados en el ensayo de tolerancia ocular.

3.22.3 Eficacia antiinflamatoria

Con el propósito de estudiar las NPs en el tratamiento o prevención de la inflamación ocular producida en la cirugía de cataratas, se indujo la inflamación mediante la aplicación tópica de 0,5% (w/v) de araquidonato sódico (AS) (50 μ l) disuelto en PBS (pH 7,4). El protocolo del tratamiento consistió en instilar 50 μ l de cada muestra en el saco conjuntival del ojo derecho 30 min después de inducir la inflamación ocular, mientras que el ojo contralateral se utilizó como control sin tratar. En el caso de la prevención, 50 μ l de cada muestra se instilaron 30 min antes de inducir la inflamación. La PTM de la inflamación ocular se calculó en un intervalo de tiempo desde 60 hasta 210 min (Ecuación 13). La suma de la puntuación de la conjuntiva y el iris se expresaron mediante media \pm SD.

3.23 Análisis estadístico

Todos los datos se presentaron como media \pm SD. La comparación específica entre los grupos se realizó mediante la prueba t-Student para datos independientes (dos colas). Para la comparación de varios grupos, se realizó la prueba de Anova para analizar las diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos, seguido de un análisis post-hoc de Tukey después de haber confirmado la normalidad y la igualdad de varianza por el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov. El programa SPSS para Windows IBM21 se utilizó para el procesamiento de todos los resultados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diseño de NPs derivatizadas con péptidos para la administración ocular de Flurbiprofeno

Este proyecto se realizó en conjunto con el Departamento de Físico-Química de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, bajo la supervisión de la Dra Maria Luisa García. Estudios previos realizados en este laboratorio han optimizado diferentes formulaciones basadas en NPs de PLGA que contienen FB utilizando el método del desplazamiento del disolvente. Para ello, se realizó un diseño factorial de 2^3 utilizando como variables independientes: el pH de la fase acuosa, la concentración inicial del agente estabilizador Poloxamer 188 (Lutrol® F68) y la cantidad de FB. Se estudió la influencia de cada uno de estos factores sobre las propiedades físico-químicas de las NPs (tamaño de partícula y potencial zeta) y la eficiencia de asociación del fármaco), obteniendo mejores resultados las formulaciones de concentración de 1 mg / ml de FB y 10 mg / ml de Lutrol® F68 a un pH 3,5 [48]. Por otra parte, se pudo comprobar la forma esférica de las NPs mediante las técnicas AFM y TEM. Los estudios de Difractometría de rayos X, Espectroscopía de IR, Calorimetría diferencial de barrido y Termomicroscopía, demostraron que la dispersión del FB en el sistema polimérico incrementa su solubilidad, observándose un efecto plástico del FB sobre el polímero [49].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este capítulo se expondrán los resultados obtenidos en diferentes NPs derivatizadas con los péptidos *CPPs* (POD y Tat-HIV) como posibles candidatos en la liberación de FB en tejidos oculares.

Para la obtención de las NPs derivatizadas con los péptidos se realizaron dos tipos de estrategias; la primera se basó en la obtención de NPs de PLGA y la conjugación de PEG y péptidos en su superficie (PLGA-NPs-PEG-Péptido) y la segunda se basó en la obtención de polímeros PLGA-PEG y

PLGA-PEG-Péptido con posterior preparación de las NPs (PLGA-PEG-Péptido-NPs).

4.1.1 Síntesis, caracterización y purificación de los péptidos POD y Tat-HIV

Los péptidos POD y Tat-HIV se sintetizaron mediante la síntesis manual de péptidos en fase sólida. La resina comercial NovaSyn® TGR se hinchó durante 3 horas en DMF a temperatura ambiente, para garantizar una mayor exposición de los grupos aminos que contiene la resina, facilitando el acoplamiento de los aminoácidos que componen la secuencia peptídica. Se seleccionó esta resina de baja funcionalidad para evitar los problemas de agregación que presentan las secuencias hidrofóbicas; además permite el desanclaje de los péptidos mediante un tratamiento ácido utilizando el TFA.

Durante la síntesis del péptido Tat-HIV, se logró una fácil incorporación de los aminoácidos con un tiempo de acoplamiento que osciló entre 20 y 30 minutos. En el caso del péptido POD, al inicio se utilizó la mezcla de activadores DIEA/HATU; pero a partir de la tercera secuencia de (ARKKAAKA), se dificultó la síntesis debido a la posible agregación de las cadenas de aminoácidos. En este caso se procedió a la incorporación de los aminoácidos utilizando los activadores DIPCDI/HOBt, requiriendo largos tiempos de acoplamientos, de 6 a 24 horas.

Al finalizar la síntesis se procedió al secado de la peptidil resina. Se utilizó el ácido acético para neutralizar mientras que el diclorometano, metanol y éter se emplearon para eliminar en su totalidad los restos de DMF y piperidina que quedaban ocluidos.

El desanclaje se llevó a cabo tras el tratamiento de la peptidil resina con TFA. Este reactivo da lugar a especies catiónicas altamente reactivas en el medio de reacción que provienen de la desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos. Así, son eliminados los grupos protectores

terbutilo de la treonina, el ácido aspártico y la tirosina, el grupo protector Boc del triptófano y el grupo Tirt de la glutamina. Estas especies reactivas, que se forman en la desprotección, pueden reaccionar y modificar los aminoácidos que contienen grupos funcionales ricos en electrones como son la tirosina, el triptófano y la cisteína. Por esta razón, se añadieron junto al TFA reactivos nucleófilos para secuestrar estas especies catiónicas. Los capturadores de carbocationes utilizados en este trabajo fueron: BME, TIS y agua. El agua actúa como agente quelante de los cationes tBu, mientras que BME y el TIS intervienen en la eliminación del grupo trifenilmetil de los residuos de histidina y glutamina.

Los péptidos crudos se purificaron, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a escala semipreparativa, obteniéndose una pureza superior a 95%. El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando una columna analítica C18 y los eluyentes fueron H₂O (0,05% TFA) y ACN (0,05 % TFA). Se realizó un gradiente de 95 % a 5 % de H₂O en 30 minutos, con un flujo de 1 ml/min y la detección a 220 nm.

Finalmente, los pesos moleculares (Mw) de los péptidos se analizaron mediante la técnica de espectrometría de masas por electrospray (ES-MS). En la Figura 15 se muestran los resultados de la caracterización del péptido POD, donde se aprecian diferentes Mw que corresponden a la ionización de este péptido a diferentes relaciones masa/carga (m/z). De acuerdo a los resultados de los fragmentos de los iones, se determinó el Mw experimental de la secuencia peptídica el cual coincidió con el valor teórico calculado mediante el programa de cálculo ExPASy (Figura 15, Tabla 9). También se obtuvieron resultados satisfactorios para el péptido Tat-HIV (Figura 16, Tabla 9). La masa experimental obtenida mediante ES-MS coincide con la masa teórica calculada, por lo que la secuencia peptídica se corresponde con la deseada.

Tabla 9. Caracterización de las secuencias peptídicas sintetizadas.

Péptidos	Secuencias	$[M+H]^+$ Teor ^a	$[M+H]^+$ Exp ^b
POD	CGGG(ARKKAACA) ₄	3592,41	3591,12
Tat-HIV	CGGGGYGRKKRRQRRR	1891,19	1889,59

^aMasa teórica obtenida por el programa de cálculo ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/>).

^bMasa experimental obtenida por espectrometría de masas electrospray (ES-MS).

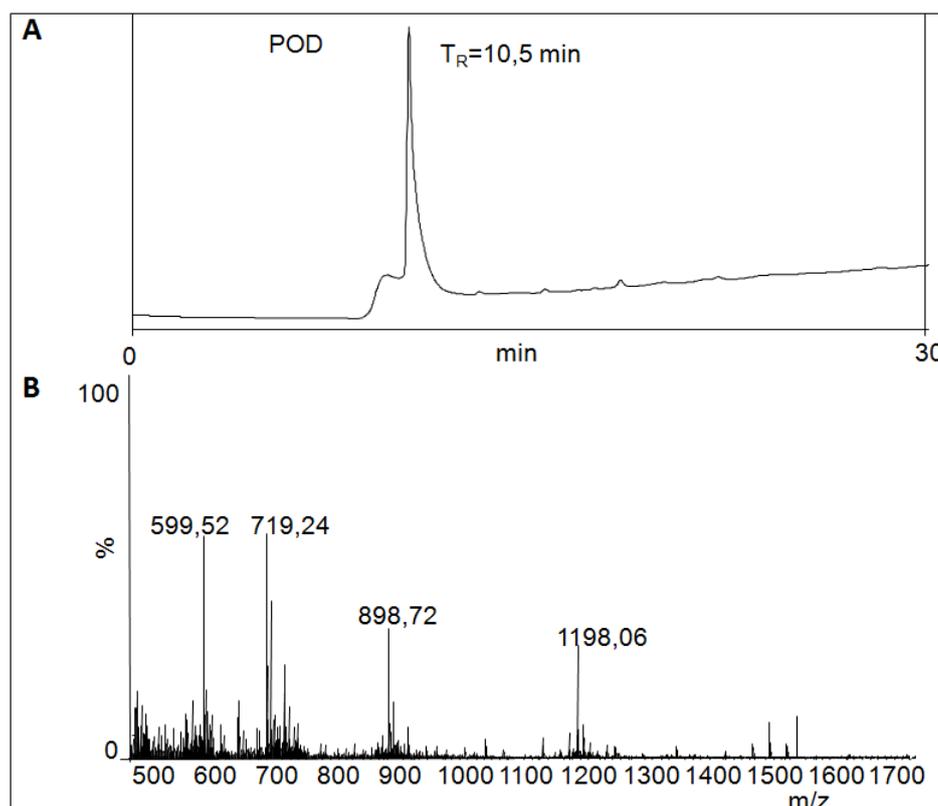


Figura 15. Espectro de HPLC analítico (A) y ES-MS (B) del péptido POD.

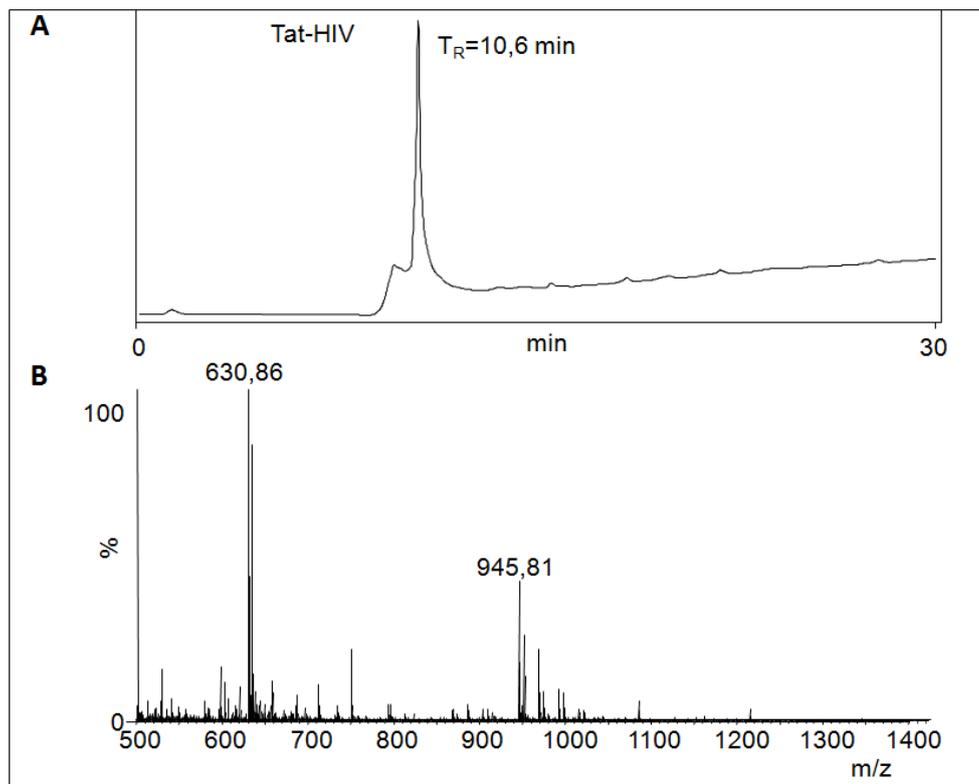


Figura 16. Espectro de HPLC analítico (A) y ES-MS (B) del péptido Tat-HIV.

4.1.2 Obtención de la formulación PLGA-NPs-PEG-Péptido

Como ha sido descrito anteriormente por Vega et al [48, 49], las NPs de PLGA son un sistema efectivo para la liberación controlada de FB en tejidos oculares. Considerando las publicaciones anteriores, en este trabajo se han obtenido NPs utilizando el polímero PLGA que contiene grupos carboxilos (PLGA-H), los cuales permitirán la posterior pegilación de las partículas. Las NPs PLGA-H, que contienen FB, se obtuvieron mediante el método del desplazamiento del disolvente. El tensioactivo Lutrol[®] F68 se utilizó como estabilizante de las NPs en suspensión acuosa; debido a su carácter no iónico, este tensioactivo no provoca irritación ocular [165]. Por otra parte, ha sido aprobado por las autoridades regulatorias de administración ocular [166].

Las NPs de PLGA-H fueron previamente activadas (PLGA-NHS) y posteriormente se procedió a su pegilación utilizando el NH₂-PEG-Maleimido. La cantidad de PEG en la superficie de las NPs de PLGA se determinó a diferentes tiempos (4, 8 y 24 horas) cuantificando indirectamente la cantidad de PEG libre que no reaccionó. En este ensayo se utilizó el reactivo TNBS, el cuál reacciona con los grupos aminos (NH₂-PEG-Maleimido) obteniéndose un complejo naranja. La eficiencia de pegilación osciló entre 2,5-4,2% (Tabla 10).

Tabla 10. Eficiencia de Pegilación de las NPs PLGA (media \pm SD, n=9).

Tiempo	Eficiencia de Pegilación
(h)	(%)
4	2,5 \pm 0,5
8	3,9 \pm 1,1
24	4,2 \pm 0,8

De acuerdo a estos resultados se decidió llevar a cabo la pegilación en un tiempo de 8 horas pues no había diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto a las 24 horas de reacción. En sentido general se obtuvo una baja eficiencia de pegilación, lo que puede deberse a la adsorción del tensioactivo Lutrol[®] F68 en la superficie de las NPs, que limita la formación del enlace amida de los grupos carboxilos de las NPs y los grupos aminos del PEG. Otros de los motivos sería el impedimento estérico ocasionado por las NPs PLGA. Zhang N et al. plantean una dilución previa (0,2 mg/ml) de estas NPs para su posterior pegilación [167]. En nuestro caso decidimos no variar la concentración (9 mg/ml) para evitar problemas de desorción del fármaco de la matriz polimérica.

Las NPs pegiladas que contienen el grupo maleimido (PLGA-NPs-PEG-Maleimido) se conjugaron con los péptidos POD y Tat-HIV. Los grupos tioles (SH) de las cisteínas que contienen ambos péptidos en su extremo-N-terminal permiten el establecimiento de un enlace covalente con el grupo maleimido de las PLGA-NPs-PEG-Maleimido (Figura 17). En la actualidad este polímero se ha empleado frecuentemente en la conjugación de diferentes moléculas a NPs poliméricas [168, 169].

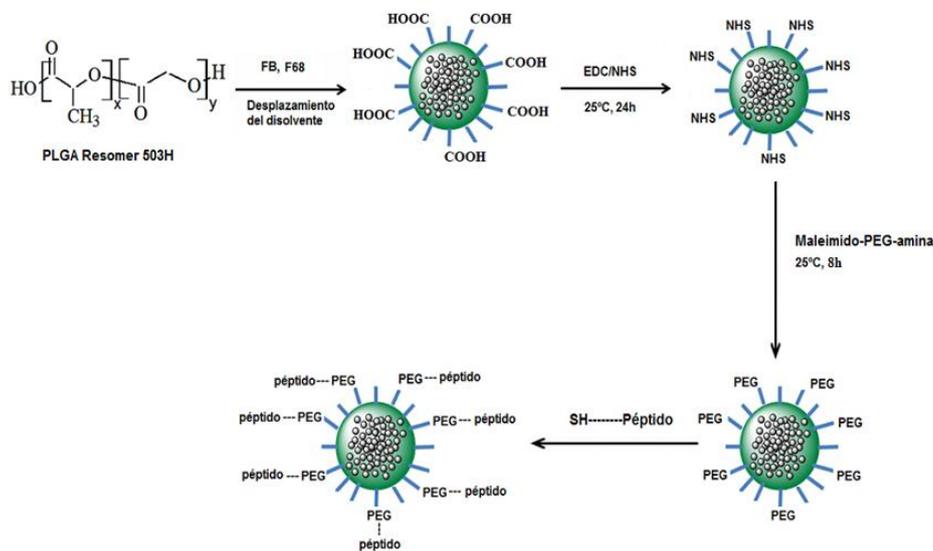


Figura 17. Representación esquemática de las NPs pegiladas y posterior conjugación con el péptido.

Las NPs conjugadas con los péptidos se inmovilizaron en la matriz DHB y su posterior análisis se llevó a cabo utilizando la técnica de EM-MALDI-TOF (Figura 18 y Figura 19). Los Mw de ambos péptidos obtenidos mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF concuerdan con los obtenidos por espectrometría de masas ES-MS. La técnica de MALDI-TOF es mucho mas sensible para moléculas de elevados peso moleculares como es el caso del péptido POD [170].

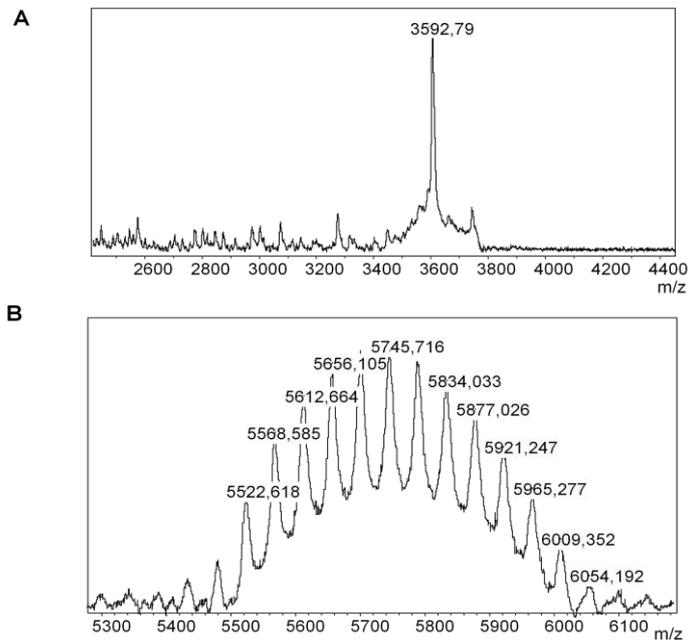


Figura 18 Espectros de MALDI-TOF del péptido POD (A) y su conjugación al NH₂-PEG-Maleimido (B).

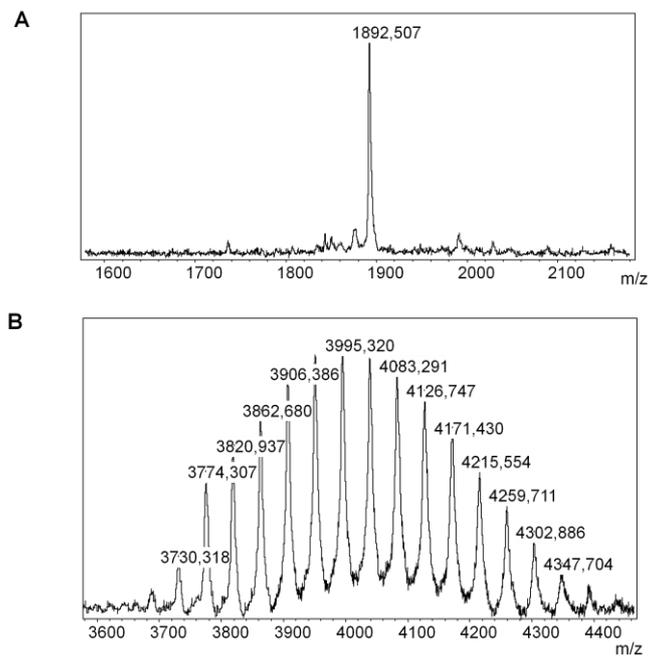


Figura 19. Espectros de MALDI-TOF del péptido Tat-HIV (A) y su conjugación al NH₂-PEG-Maleimido (B).

La Tabla 11 muestra los Mw teóricos y experimentales del PEG-POD y PEG-Tat-HIV. Podemos ver que algunas de las poblaciones de los Mw $[M+Na^+]$ experimentales coinciden con los valores teóricos $[M+H^+]$, demostrando la formación del enlace covalente PEG-Péptido. El resto de poblaciones no encontradas indican que cierta cantidad de péptido quedó sin reaccionar. La cantidad de péptido (POD ó Tat-HIV) unido covalentemente a las PLGA-NPs-PEG-Maleimido se cuantificó mediante el test de Ellman [138], este reactivo reacciona con los grupos tioles de las cisteínas formando un complejo amarillo. Se obtuvo una eficiencia de conjugación de $1,6 \pm 0,4$ % y $2,8 \pm 0,7$ % de los péptidos POD y Tat-HIV respectivamente. La cantidad de péptido POD es ligeramente menor que la del péptido Tat-HIV, lo que puede deberse al mayor impedimento estérico que tienen los grupos tioles de las Cys para formar el enlace covalente.

Tabla 11. Pesos moleculares del PEG-POD y PEG-Tat-HIV

Mw Teor ^a	Mw Exp ^b	Mw Teor ^a	Mw Exp ^b
[PEG-POD + H ⁺]	[PEG-POD + Na ⁺]	[PEG-Tat-HIV + H ⁺]	[PEG-Tat-HIV + Na ⁺]
5210,5	5522,6*	3510,2	3730,3**
5254,5	5568,6	3554,2	3774,3**
5342,6	5612,7*	3642,3	3820,9**
5430,6	5656,1*	3730,3**	3862,7
5474,6	5745,7*	3774,3**	3906,4**
5518,6*	5834,0	3818,3**	3995,3**
5606,7*	5877,0*	3906,4**	4083,3**
5650,7*	5921,2*	3950,4	4126,7
5694,7	5965,3	3994,4**	4171,4**
5738,7*	6009,4	4038,5	4215,6**
5782,8	6054,2	4082,5**	4259,7
5870,8*	-	4170,5**	4302,9
5914,9*	-	4214,6**	4347,7

^aMasa teórica obtenida por el programa de cálculo ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/>).

^bMasa experimental obtenida por espectrometría de masas MALDI-TOF.

* Mw teórica y experimental del PEG-POD

** Mw teórica y experimental del PEG-Tat-HIV

4.1.3 Obtención de los polímeros PLGA-PEG y PLGA-PEG-Péptido

Estudios previos han demostrado que las NPs PLGA-PEG de diferentes composiciones de PEG (5%, 10% y 15 %) aumentan la biodisponibilidad del FB [171]. De todas estas formulaciones, solo las NPs PLGA-PEG (5%) tuvieron una mayor eficiencia de encapsulación y una liberación más controlada del FB; esto se debe a la naturaleza hidrofóbica del fármaco.

De acuerdo a estos resultados, se sintetizó el polímero PLGA-PEG (PEG 5%, 2000 Da) para comparar con el polímero comercial PLGA-PEG[®] (PEG 5%, 5000 Da) y estudiar la influencia de las propiedades de las NPs de acuerdo al Mw del PEG. La Figura 20 muestra el esquema de síntesis de los polímeros PLGA-PEG y PLGA-PEG-Péptido. Previamente, se activaron los grupos carboxilos del PLGA-H (Anexo 2) y posteriormente se procedió a la unión covalente con el polímero NH₂-PEG-metoxi (NH₂-PEG-m) (Anexo 3) o NH₂-PEG-Maleimido (Anexo 4). Por otra parte se sintetizó el polímero PLGA-PEG-Péptido, utilizando los péptidos POD y Tat-HIV, indistintamente.

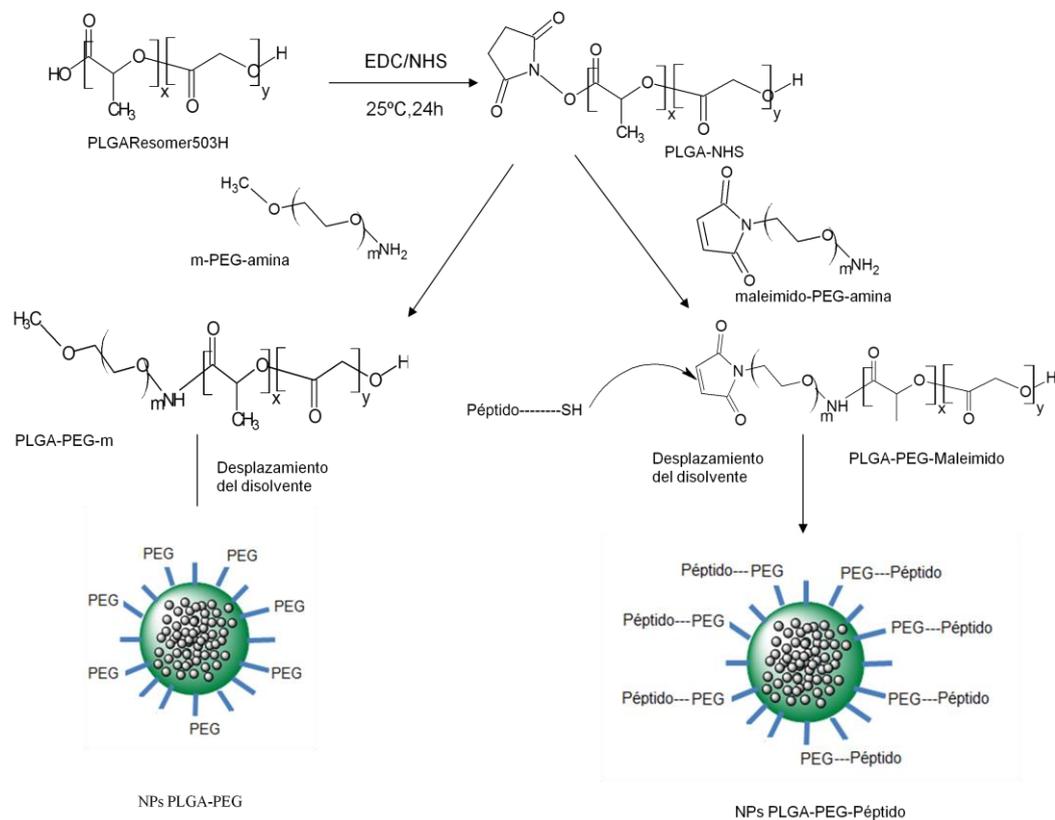
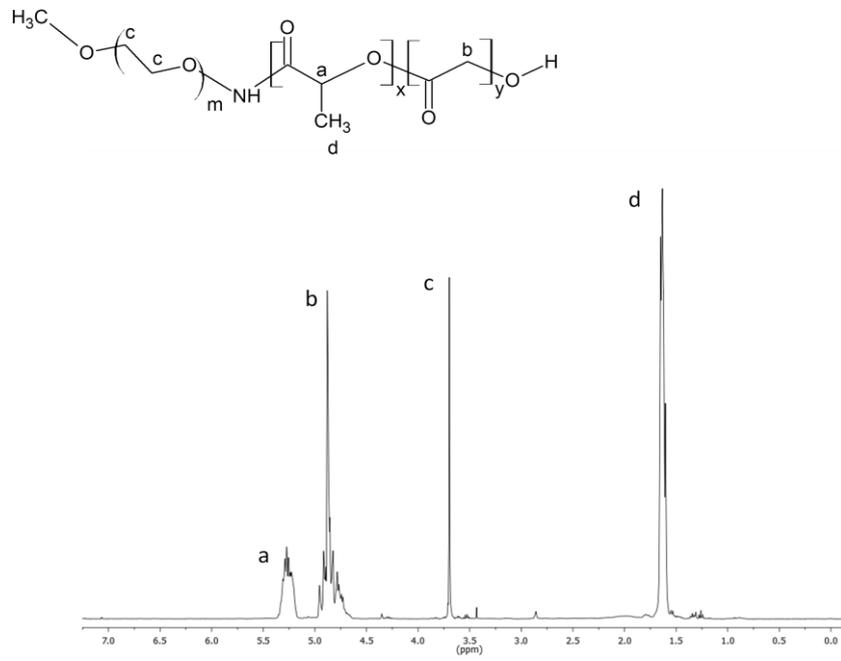


Figura 20. Representación esquemática de la síntesis de los polímeros PLGA-PEG y PLGA-PEG-Péptido con posterior obtención de las NPs.

En la Figura 21 se presentan los espectros de RMN-¹H de los polímeros PLGA-PEG-m y PLGA-PEG-Maleimido, donde se observan cuatro señales características a 1,5 ppm (CH₃ de ácido poliláctico), 3,6 ppm (CH₂ de etilenglicol), 4,8 ppm (CH₂ ácido glicólico) y 5,2 ppm (CH de ácido poliláctico). También se observó una pequeña señal a 6,7 ppm correspondiente al grupo maleimido.

A



B

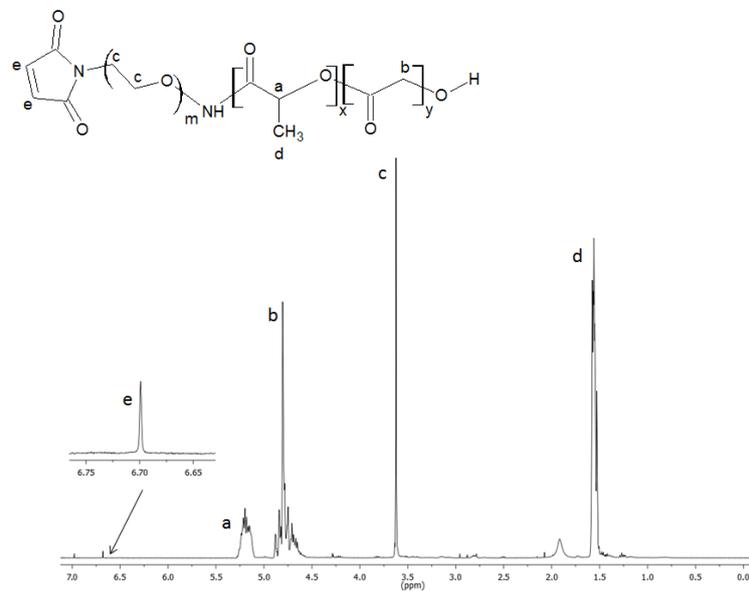


Figura 21. Espectros de RMN-¹H de los polímeros PLGA-PEG-m (A) y PLGA-PEG-Maleimido (B).

El rendimiento de síntesis se calculó según la Ecuación 14 obteniéndose un $58,8 \pm 3,4$ % (PLGA-PEG-m) y $62,5 \pm 2,7$ % (PLGA-PEG-Maleimido). La eficiencia de pegilación se calculó de acuerdo a la integración de las señales correspondientes a cada polímero (Ecuación 15) obteniéndose un $11,2 \pm 4,0$ % y $18,5 \pm 6,5$ % para PLGA-PEG-m y PLGA-PEG-Maleimido respectivamente.

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{\text{Masa (PLGA - PEG)}}{\text{Masa (PLGA - NHS)} + \text{Masa (PEG - NH}_2\text{)}} \times 100\%$$

Ecuación 14

$$\text{Eficiencia pegilación}(\%) = \frac{\text{Area (3,6 - 3,5ppm)}/4}{[\text{Area}(5,3 - 5,2\text{ppm}) + \text{Area}(4,9 - 4,6\text{ppm}) + \text{Area}(1,6 - 1,5\text{ppm})]/6} \times 100\%$$

Ecuación 15

Los péptidos POD y Tat-HIV se conjugaron al PLGA-PEG mediante la unión de la cisteína/maleimido. Los espectros de RMN-¹H de los polímeros PLGA-PEG-POD y PLGA-PEG-Tat-HIV se muestran en la Figura 22. La cantidad de péptido (POD ó Tat-HIV) en el polímero se expresó como porcentaje en masa (Ecuación 16):

$$W_{\text{péptido}} = 100 (M_{\text{péptido}} (I_{\text{péptido}}/n)) / (M_{\text{PLGA}} (I_{\text{PLGA}} (\text{CH}, \delta=5,2)))$$

(Ecuación 16)

Donde:

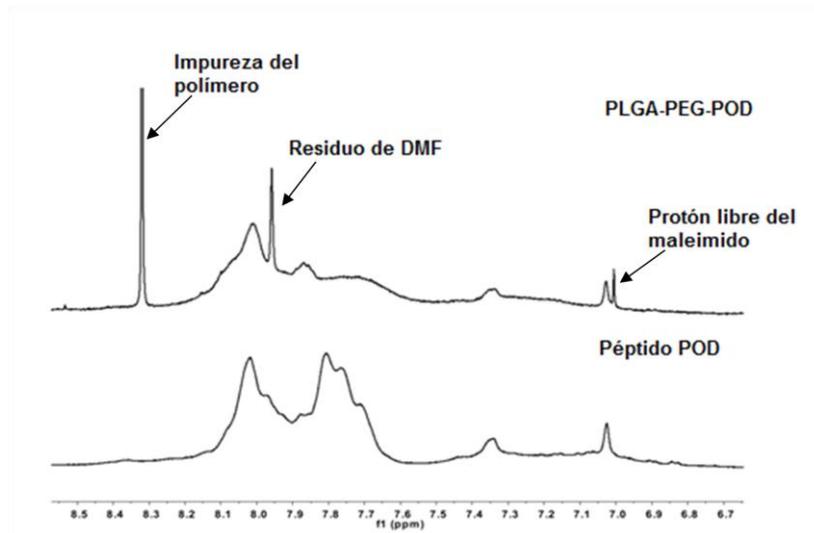
$M_{\text{péptido}}$ y M_{PLGA} son los pesos moleculares de los péptidos y PLGA (130 g/mol).

$I_{\text{péptido}}$ es la integral del POD (región amida/amina en 7,0-8,2 ppm) y Tat-HIV (señal de tirosina en 6,64 ppm).

I_{PLGA} es la integral de la señal correspondiente a los grupos -CH de la unidad del PLA del PLGA correspondiente a un protón.

n es el número de protones ($76H$ de las cadenas laterales de los grupos amida, amina y guanidinio en el péptido POD y la señal aislada a 6,64 ppm correspondiente a $2H$ aromáticos de la Tirosina en el péptido Tat-HIV).

A



B

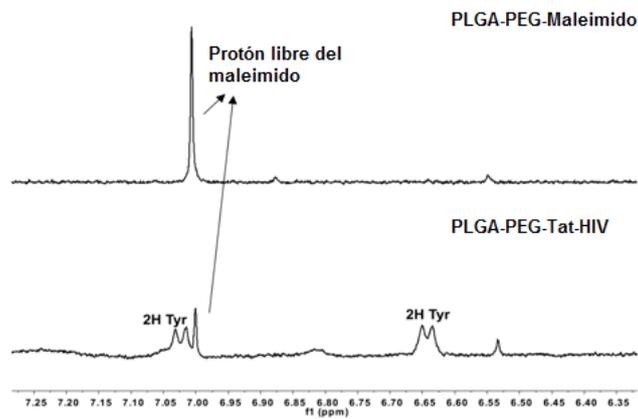


Figura 22. Espectros de RMN- 1H de los polímeros PLGA-PEG-POD (A) y PLGA-PEG-Tat-HIV (B).

Los niveles de funcionalización calculados fueron $3,6 \pm 0,3 \%$ y $2,8 \pm 0,5 \%$ para los polímeros PLGA-PEG-POD y PLGA-PEG-Tat-HIV respectivamente.

Los resultados de este epígrafe demuestran que la síntesis de los polímeros PLGA-PEG y PLGA-PEG-Péptido, es más eficiente que la síntesis de las NPs con posterior conjugación del PEG y péptido en su superficie (PLGA-NPs-PEG-Péptido). En este caso se obtuvo una mayor eficiencia de pegilación y mayor cantidad de péptido unido. Con este nuevo sistema polimérico se obtendrán NPs del tipo PLGA-PEG-NPs y PLGA-PEG-Péptido-NPs que contienen FB.

4.1.4 Caracterización fisicoquímica de las NPs que contienen FB

En el desarrollo de un sistema de liberación de fármacos para la administración ocular, el tamaño de partícula es un parámetro importante para evaluar el riesgo de irritación. Si la partícula induce lagrimeo se provocaría un rápido drenaje de la dosis del fármaco instilado y podría reducir su biodisponibilidad, disminuyendo así el tiempo de residencia del fármaco en el saco conjuntival [172].

Se prepararon NPs que contienen FB a partir de polímeros con diferente composición. De cada una de las formulaciones se evaluó la morfometría (tamaño de partícula y polidispersión), potencial zeta (Z_{pot}) y la eficiencia de asociación (EA) (Tabla 12 y Tabla 13); obteniéndose en todos los casos un tamaño inferior a 300 nm, lo que resulta adecuado para la administración ocular de fármacos. El índice de polidispersión (PI) es inferior a 0,1 que indica una distribución estrecha del tamaño de partícula.

La caracterización de las NPs de PLGA, PLGA-NPs-PEG, PLGA-PEG-NPs-POD y PLGA-PEG-NPs-Tat-HIV se muestra en la Tabla 12. La conjugación del PEG y de los péptidos en la superficie de las NPs provocó un ligero aumento del tamaño de partícula. Estos resultados concuerdan con

los obtenidos por otros autores que modificaron la superficie de NPs con péptidos [173]. Por otro lado, se observó que las PLGA-NPs-PEG-POD y PLGA-NPs-PEG-Tat-HIV tienen un tamaño similar, de manera que la cantidad de péptido en la superficie de las NPs no parece afectar su tamaño. Se obtuvo una elevada EA entre $70,3 \pm 5,6\%$ y $76,5 \pm 3,8 \%$, indicando que la conjugación del PEG y los péptidos en la superficie de las NPs no induce la desorción del fármaco de la matriz polimérica. No se observaron diferencias significativas en la EA del FB en las NPs PLGA con respecto a las PLGA-NPs-PEG ($P=0,473$) y PLGA-NPs-PEG-Tat-HIV ($P=0,764$), indicando que se mantiene la cantidad inicial de FB en cada paso de reacción. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre las NPs PLGA y PLGA-NPs-PEG-POD ($P=0,042$). A pesar de la variación en los resultados estadísticos, consideramos que la EA obtenida (70%), es apropiada para la encapsulación de fármacos en sistemas poliméricos.

Tabla 12. Propiedades fisicoquímicas y eficiencia de asociación de las PLGANPs-PEG-Péptido. (media \pm SD, n=3).

Composición NPs	Tamaño \pm SD (nm)	Polidispersión \pm SD	Z _{pot} \pm (mV)	EA \pm SD (%)
PLGA-H 50:50	148,4 \pm 2,0	0,064 \pm 0,027	-29,1 \pm 1,3	-
PLGA-H 50:50 + FB	190,5 \pm 1,5	0,065 \pm 0,020	-30,4 \pm 3,3	77,1 \pm 4,2
PLGA-NPs-PEG	164,5 \pm 1,8	0,079 \pm 0,007	-32,5 \pm 1,5	-
PLGA-NPs-PEG + FB	170,3 \pm 3,5	0,079 \pm 0,007	-30,6 \pm 0,7	75,4 \pm 2,0
PLGA-NPs-PEG-POD	203,8 \pm 1,4	0,051 \pm 0,009	33,2 \pm 1,7	-
PLGA-NPs-PEG-POD + FB	219,9 \pm 1,2	0,051 \pm 0,009	30,2 \pm 1,4	70,3 \pm 5,6
PLGA-NPs-PEG-Tat-HIV	218,4 \pm 0,9	0,070 \pm 0,045	25,2 \pm 2,6	-
PLGA-NPs-PEG-Tat-HIV + FB	210,7 \pm 0,2	0,070 \pm 0,045	20,2 \pm 1,2	76,5 \pm 3,8

La Tabla 13 muestra las propiedades fisicoquímicas de las PLGA-PEG-NPs, PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs obtenidas a partir de los polímeros sintetizados. En general, las PLGA-PEG-Péptido-NPs mostraron un tamaño de partícula menor que las PLGA-NPs-PEG-Péptido. Por otra parte las PLGA-PEG-NPs muestran una disminución del tamaño con respecto a las NPs preparadas a partir del polímero comercial (PLGA-PEG[®]). Algunos autores han demostrado que existe una relación directa entre el Mw del polímero y el tamaño de partículas [174, 175]. Por otra parte, los polímeros de elevado Mw presentan largas cadenas poliméricas, que requieren mayor tiempo de degradación [176, 177]. Lo contrario ocurrió con las PLGA-PEG-Péptido-NPs. En este caso, la distribución de tamaño de partícula se ve influenciada por la densidad de carga positiva del péptido, ocasionando una mayor atracción electrostática intramolecular entre el péptido y el polímero, que tiene carga negativa, disminuyendo así el tamaño de partícula. Este efecto ha sido más pronunciado en las PLGA-PEG-POD-NPs, debido a que el péptido POD presenta mayor carga neta positiva (+17) que el péptido Tat-HIV (+9).

La EA de las PLGA-PEG-Péptido-NPs fue mayor que las PLGA-PEG-NPs, indicando que existe una ligera asociación del FB con la matriz polimérica en presencia de ambos péptidos.

El Z_{pot} es también una característica importante ya que puede influir en la estabilidad de las partículas. En teoría, los valores de Z_{pot} más pronunciados (positivos o negativos) tienden a estabilizar la suspensión de las partículas. La repulsión electrostática entre las partículas con la misma carga eléctrica evita su agregación [178]. Los resultados obtenidos para las NPs PLGA y PLGA-NPs-PEG son altamente negativos debido a la ionización de los grupos carboxilos en la superficie del polímero [179]. La presencia de los péptidos POD y Tat-HIV cambia el potencial zeta de negativo a positivo siendo este comportamiento mucho más marcado en las PLGA-NPs-PEG-

Péptido. En el caso de las PLGA-PEG-Péptido-NPs, éstas presentaron valores más bajos debido a que la presencia del PEG y de los péptidos que cubren las cargas del PLGA. La presencia de cargas positivas podría contribuir a la mucoadhesión ocular debido a las interacciones electrostáticas con la mucosa ocular que presenta carga negativa [180].

Tabla 13. Propiedades fisicoquímicas y eficiencia de asociación de PLGA, PLGA-PEG, PLGA-PEG-Péptido NPs (obtenido a partir de los polímeros sintetizados). (media \pm SD, n=3).

Composición NPs	Mw (KDa)	Tamaño \pm SD (nm)	Polidispersión \pm SD	Z _{pot} \pm SD (mV)	EA \pm SD (%)
PLGA-PEG-NPs	34PLGA 2PEG	105,1 \pm 0,2	0,080 \pm 0,026	-24,3 \pm 3,3	-
PLGA-PEG-NPs + FB		128,9 \pm 0,9	0,079 \pm 0,017	-12,6 \pm 3,0	73,3 \pm 3,3
PLGA-PEG [®] -NPs	95PLGA 5 PEG	147,7 \pm 1,1	0,095 \pm 0,039	-24,0 \pm 0,7	-
PLGA-PEG [®] -NPs + FB		150,8 \pm 1,0	0,096 \pm 0,017	-20,9 \pm 1,1	78,0 \pm 2,5
PLGA-PEG-POD-NPs	34PLGA 2PEG 3,6POD	85,9 \pm 0,9	0,011 \pm 0,020	15,2 \pm 0,3	-
PLGA-PEG-POD-NPs + FB		103,7 \pm 0,3	0,097 \pm 0,014	18,6 \pm 1,5	82,9 \pm 0,8
PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs	34PLGA 2PEG 1,8 Tat-HIV	102,8 \pm 1,1	0,012 \pm 0,010	20,0 \pm 0,4	-
PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs + FB		123,1 \pm 1,7	0,103 \pm 0,007	14,0 \pm 0,8	81,0 \pm 1,7

4.1.5 Estudios morfológicos (SEM y AFM)

La morfología de las NPs se determinó mediante las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). A modo de ejemplo en la Figura 23 y Figura 24 se muestran las imágenes de las PLGA-PEG-POD-NPs que contienen FB. La

técnica de SEM se ha utilizado ampliamente para la visualización de NPs poliméricas [181-183]. En este caso, la muestra se recubrió previamente con cromo, mediante el método de pulverización catódica, para evitar que el haz de electrones ocasionara un daño a la misma. Se observó que las partículas presentaron una forma esférica con una estrecha distribución del tamaño.

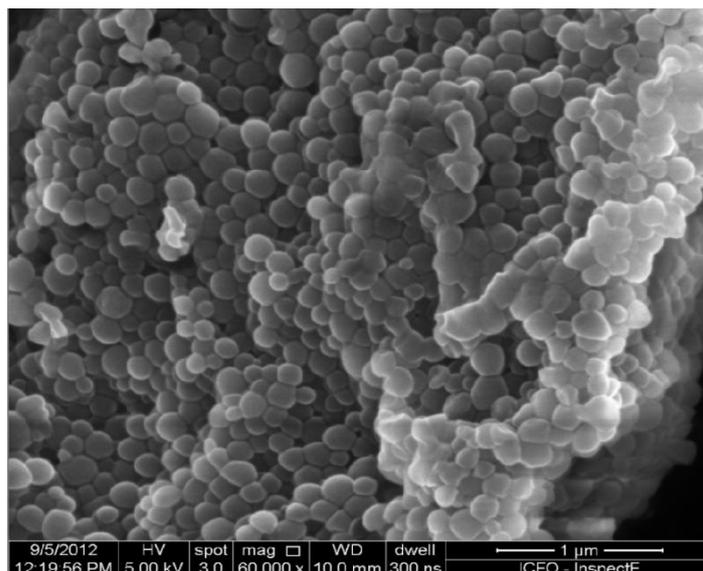


Figura 23. Imagen de las PLGA-PEG-POD-NPs obtenida por SEM.

EL AFM, es otra de las técnicas más utilizadas para obtener imágenes de con alta resolución atómica [184, 185]. La sonda del AFM detecta la topografía de la superficie de una muestra con una punta muy aguda que se localiza al final del brazo del cantilever. La fuerza entre la punta y la superficie de la muestra contribuyen a la flexión del cantilever, siendo la más común la fuerza de Van der Waals. Esta técnica se puede utilizar en tres modos: contacto, semicontacto y no contacto. En este trabajo, se utilizó el modo semicontacto para evitar el deterioro por arrastre continuo de la punta sobre la superficie de la muestra. En la Figura 24 se observa la imagen en 3D de la superficie de las NPs, donde se aprecia su forma esférica con un diámetro menor de 500 nm. La imagen topográfica demostró que existe una cierta rugosidad en la superficie de las partículas individuales. Este

resultado podría proporcionar una evidencia física en el mecanismo de liberación del fármaco a través de su difusión y erosión de la matriz polimérica. En ambas figuras no se observó presencia de estructuras cristalinas, indicando ausencia del fármaco en la superficie. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en previos estudios realizados en NPs PLGA que contienen FB [49]. En todas las formulaciones preparadas en este trabajo, se obtuvieron resultados similares demostrando su idoneidad para ser empleadas en aplicaciones oftálmicas [2, 186].

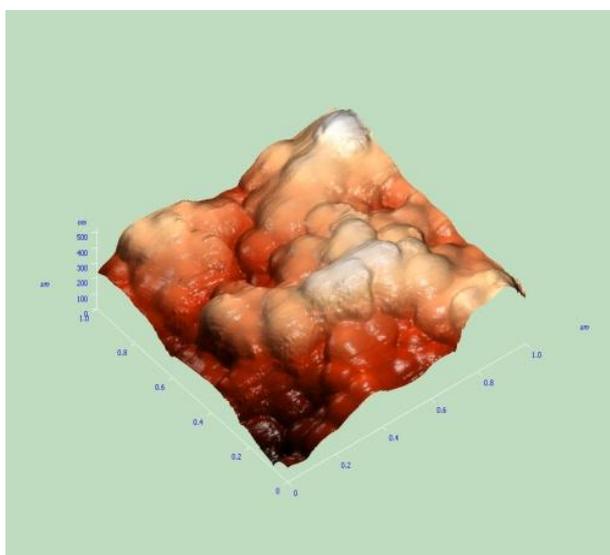


Figura 24. Imagen de las PLGA-PEG-POD-NPs obtenidas por AFM.

4.1.6 Estudio de liberación *in vitro*

El estudio de liberación *in vitro* de las NPs que contienen los péptidos POD y Tat-HIV se realizó mediante el método de difusión de diálisis. La Figura 25 muestra el perfil de liberación de las NPs que contienen FB (1 mg/ml), el patrón de FB a la misma concentración en PBS 0,1 M y pH=7,4 y el colirio comercial Ocuferen[®].

Como era de esperar, en un inicio el FB se libera rápidamente; después de 150 minutos mantiene un perfil de liberación lento hasta completar las 8 horas (480 minutos) de estudio. La rápida liberación inicial se atribuye a la

fracción del fármaco que se absorbe o queda débilmente unido a la superficie de las NPs. El FB se distribuye uniformemente en la matriz polimérica y la liberación *in vitro* se produce, principalmente, por la difusión del fármaco a través de la matriz [187]. Por otra parte, el bajo Mw del FB (244,25 Da) mejora el mecanismo de difusión.

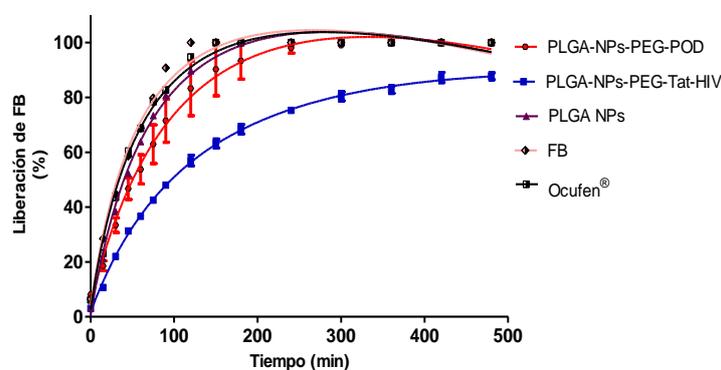
En sentido general, la difusión del FB de las NPs obtenidas es más retardada que la del Ocufer[®] y la del patrón de FB. En un tiempo de 150 minutos, las NPs preparadas a partir de PLGA-H (modificado con grupos carboxilos) han liberado un 100 % de FB. Comparando el perfil de liberación obtenido en estudios previos [48, 49], las NPs PLGA presentan una mayor eficiencia de encapsulación y un perfil de liberación de FB mas retardado, con respecto a las PLGA-H. Podemos decir que la presencia del grupo carboxilo en el polímero PLGA-H provoca una disminución en la EA de FB y una rápida liberación del fármaco. La Figura 25A muestra el perfil de liberación de FB de las PLGA-NPs-PEG-Péptido. Como se puede observar, después de 120 minutos las PLGA-NPs-PEG-POD y PLGA-NPs-PEG-Tat-HIV liberaron un 83,3 % y 56,5 % del fármaco respectivamente. Las PLGA-NPs-PEG-Tat-HIV presentaron una liberación más retardada, obteniendo un perfil máximo de liberación de un 90 % durante el período de estudio.

La Figura 25B muestra el perfil de liberación de las PLGA-PEG-NPs, PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs. Las NPs obtenidas a partir del polímero comercial (PLGA-PEG[®]) y sintetizado (PLGA-PEG) tienen un comportamiento similar, es decir, la diferencia en los Mw no afecta el tamaño de partícula ni la liberación del fármaco. En el caso de las PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs liberaron un 46,1 % y 80,9 %, respectivamente.

En apartados anteriores se demostró que en las PLGA-NPs-PEG-Péptido existe una mayor cantidad de péptido Tat-HIV unido a la superficie de las NPs, mientras que en las PLGA-PEG-Péptidos-NPs hay una mayor cantidad

de péptido POD. Los resultados obtenidos en este estudio permiten predecir que la liberación del FB a través de las PLGA-NPs-PEG-Péptido y PLGA-PEG-Péptido-NPs están influenciados por la cantidad de péptido unido a las NPs o al polímero, provocando una difusión mas retardada del fármaco encapsulado. En sentido general, las PLGA-PEG-POD-NPs presentaron una liberación más sostenida con respecto a todas las formulaciones estudiadas.

A



B

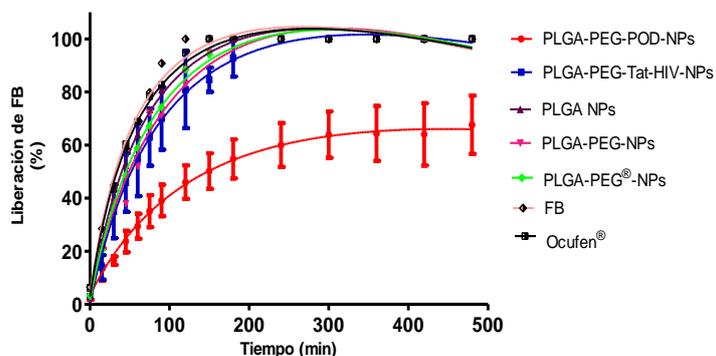


Figura 25. Perfil de liberación *in vitro* de FB de: PLGA-NPs-PEG-Péptido (A) y PLGA-PEG-Péptido-NPs (B).

4.1.6.1 Mecanismo de difusión del Flurbiprofeno

La migración de un fármaco al medio acuoso desde sistemas poliméricos (tipo matriz) implica un proceso de absorción de agua o fluido biológico, y

otro simultáneo de desorción del fármaco, mediante un mecanismo de difusión, controlado por el hinchamiento que sufre el material polimérico [188, 189]. El comportamiento de hinchamiento está caracterizado por la presencia de dos frentes: uno que separa el estado vítreo del estado elastomérico (interfase de hinchamiento) y se mueve hacia el estado vítreo con una determinada velocidad, y otro que separa el polímero hinchado del medio de disolución (interfase polimérica) y se mueve hacia el exterior [190].

Con el fin de determinar el mecanismo de liberación de FB de las PLGA-NPs-PEG-Péptido y NPs PLGA-PEG-Péptido, se evaluaron los perfiles empleando el modelo de Korsmeyer-Peppas [149]. El exponente de difusión (n) se calculó a partir de la pendiente de la línea recta del logaritmo del porcentaje acumulativo de FB liberado ($\log Q$ (%)) frente al logaritmo del tiempo de registro ($\log t$). Los resultados de n , el coeficiente de correlación (r^2) y la constante de velocidad de liberación (k) obtenidos se muestran en la Tabla 14. Estos resultados indican que la liberación de FB de estos sistemas se rige por un comportamiento no fickiano.

Generalmente, el proceso de difusión de solutos desde sistemas elastoméricos (ejemplo: NPs poliméricas) en el equilibrio de hinchamiento sigue la ley de Fick. Vega et al estudiaron la liberación de FB en NPs de PLGA y PLGA-PEG, obteniendo un mecanismo de difusión fickiano [171]. Podemos decir que la presencia de los péptidos cambia el mecanismo de difusión del FB de la matriz polimérica. Esto significa que las PLGA-NPs-PEG-Péptido y las PLGA-PEG-Péptido-NPs están gobernadas por un mecanismo de difusión del fármaco y relajación del polímero siguiendo una cinética de segundo orden. En este caso, el origen de la migración del FB se atribuye a la existencia de fenómenos de relajación lentos de la matriz polimérica, inducidos por el proceso de hinchamiento. Estos procesos de relajación están relacionados con los tiempos finitos que necesitan las

cadena macromoleculares para responder a la presión de hinchamiento osmótico y ordenarse para acoger las moléculas de disolvente que penetran en su interior.

Tabla 14. Ajuste de los perfiles de liberación del FB mediante el modelo de Korsmeyer-Peppas (media \pm SD, n=3).

Composición de NPs	Modelo de Korsmeyer-Peppas*			Mecanismo de transporte
	r ²	k \pm SD (h ⁻ⁿ)	n \pm SD	
PLGA-NPs-PEG-POD	0,948	7,23 \pm 1,32	0,47 \pm 0,02	Difusión anómala o No-fickiana
PLGA-NPs-PEG-Tat-HIV	0,974	2,67 \pm 0,07	0,63 \pm 0,01	Difusión anómala o No-fickiana
PLGA-PEG-POD-NPs	0,989	2,71 \pm 1,48	0,60 \pm 0,07	Difusión anómala o No-fickiana
PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs	0,967	2,56 \pm 0,20	0,74 \pm 0,11	Difusión anómala o No-fickiana

* No se observaron diferencias significativas en los valores de n (P<0,05).

4.1.7 Espectroscopía FTIR

La técnica de espectroscopia FTIR se utilizó como una herramienta cualitativa para comprobar si existía alguna interacción entre el FB y las PLGA-NPs, PLGA-PEG-NPs, PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs.

En la Figura 26 se muestran los espectros FTIR de las NPs que contienen FB, así como el espectro del fármaco libre. En el espectro del FB se observa una banda ancha entre 3300-2500 cm⁻¹ asociado al *stretching* del COO-H st, otra a 1700 cm⁻¹ del *stretching* C=O st y una banda intensa alrededor de 1218cm⁻¹ correspondiente al *stretching* C-F st.

En el caso de las NPs sólo se aprecian las principales bandas de las cadenas alifáticas del PLGA, PEG y los péptidos: banda intensa a $3000-2840\text{cm}^{-1}$ del *stretching* C-H st, banda intensa a 1758 cm^{-1} (C=O st), banda poco intensa a $1660-1650\text{ cm}^{-1}$ del *stretching* C=O st correspondiente al enlace amida de polipéptidos, bandas de intensidad media: $1470-1430\text{ cm}^{-1}$ del $\text{CH}_3\ \delta$ as y $\text{CH}_2\ \delta$, $1395-1365\text{ cm}^{-1}$ del $\text{CH}_3\ \delta$ sim y otra banda a $1170-1090\text{ cm}^{-1}$ del *stretching* (C-O st).

No se observó ninguna interacción entre las NPs y el FB obteniéndose un espectro similar al de las NPs sin el fármaco (Anexo 5). Este resultado indica que ninguna de las matrices poliméricas, con o sin péptido, interfieren en la liberación del FB, corroborando de esta manera que este fármaco se liberará completamente de las NPs, de una manera sostenida en el tiempo, dependiendo del polímero utilizado. Resultados similares fueron obtenidos en NPs de PLGA [49] y PCL [191] que contienen FB.

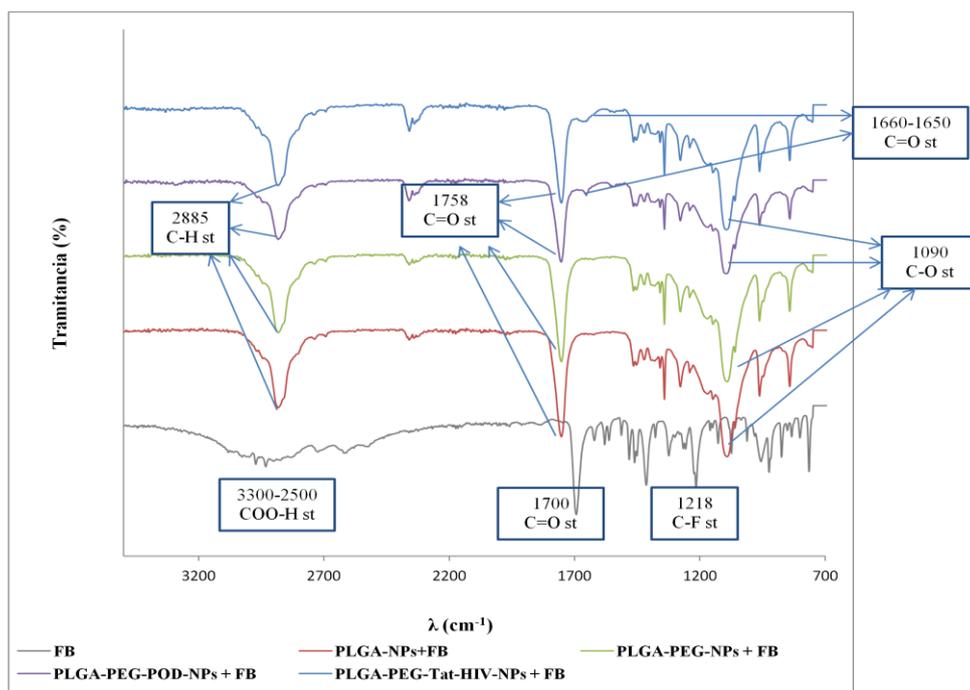


Figura 26. Espectro FTIR de las NPs PLGA, PLGA-PEG-NPs, PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs que contienen FB.

4.1.8 Estudios de estabilidad

Se realizó un estudio de estabilidad preliminar de las PLGA-NPs, PLGA-PEG-NPs, PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs que contienen FB, a diferentes temperaturas (4°C y 25°C) durante un período de 30 días. En la Tabla 15 podemos apreciar que las NPs a una temperatura de 4°C, mantienen los parámetros físicoquímicos y la eficiencia de asociación óptimos para sistemas de liberación de fármacos en tejidos oculares. En todos los casos el tamaño de partícula disminuye gradualmente debido a la erosión de la matriz polimérica. Tal y como ya ha sido descrito, la hidrólisis del éster y los mecanismos de transesterificación son los encargados de la pérdida de masa en los polímeros de poliéster [192]. La erosión de las NPs es iniciada por la absorción de agua seguida de la escisión de la cadena hidrolítica del PLGA con la liberación de los oligómeros de ácido láctico. Otros autores [193-195] han demostrado que las NPs que contienen PEG (mayor contenido hidrófilo) se hinchan más fácilmente que las NPs que contienen menor contenido hidrofílico, lo que permite mayor captación de agua en la matriz, aumentando así la velocidad de hidrólisis y pérdida de masa de las NPs.

La Tabla 16 muestra los resultados obtenidos a una temperatura de 25°C, donde las NPs PLGA y PLGA-PEG-NPs mantienen un comportamiento similar a la temperatura de 4°C. Sin embargo, las PLGA-PEG-POD-NPs y las PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs después de 15 días, comienzan aparecer agregados, aumentando su tamaño y disminuyendo la densidad de carga positiva considerablemente, lo que indica una inestabilidad del sistema

Tabla 15. Estabilidad de las NPs a una temperatura=4°C. (media \pm SD, n=3).

Tiempo(días)	NPs	Tamaño \pm SD (nm)	Polidispersión	Z _{pot} \pm SD (mV)	EA \pm SD (%)
0	PLGA	208,0 \pm 2,9	0,112 \pm 0,007	-14,3 \pm 1,10	86,4 \pm 2,3
	PLGA-PEG	158,8 \pm 1,2	0,078 \pm 0,0098	-9,16 \pm 0,51	84,5 \pm 3,6
	PLGA-PEG-POD	90,52 \pm 0,9	0,105 \pm 0,0165	+21,3 \pm 2,0	79,2 \pm 5,2
	PLGA-PEG-Tat-HIV	110,6 \pm 2,0	0,112 \pm 0,028	+15,1 \pm 0,8	82,6 \pm 1,7
7	PLGA	207,8 \pm 4,2	0,111 \pm 0,0048	-15,5 \pm 1,50	85,2 \pm 3,7
	PLGA-PEG	157,8 \pm 0,9	0,075 \pm 0,033	-10,7 \pm 0,9	85,6 \pm 2,9
	PLGA-PEG-POD	87,29 \pm 1,5	0,115 \pm 0,046	+15,6 \pm 0,5	77,8 \pm 2,4
	PLGA-PEG-Tat-HIV	106,1 \pm 0,8	0,101 \pm 0,009	+13,0 \pm 0,9	80,1 \pm 1,9
15	PLGA	209,6 \pm 1,8	0,047 \pm 0,020	-21,6 \pm 0,862	85,5 \pm 3,3
	PLGA-PEG	155,8 \pm 0,58	0,063 \pm 0,010	-19,8 \pm 0,64	83,9 \pm 5,6
	PLGA-PEG-POD	84,52 \pm 0,81	0,086 \pm 0,010	+17,1 \pm 0,5	77,1 \pm 1,8
	PLGA-PEG-Tat-HIV	107,4 \pm 0,7	0,098 \pm 0,030	+17,2 \pm 0,6	80,1 \pm 0,6
30	PLGA	204,2 \pm 2,8	0,033 \pm 0,013	-19,2 \pm 1,1	85,0 \pm 2,0
	PLGA-PEG	152,8 \pm 2,8	0,100 \pm 0,023	-14,2 \pm 0,6	83,5 \pm 0,9
	PLGA-PEG-POD	85,26 \pm 1,28	0,137 \pm 0,059	+16,8 \pm 0,6	78,3 \pm 2,1
	PLGA-PEG-Tat-HIV	104,4 \pm 1,06	0,078 \pm 0,05	+18,3 \pm 0,8	80,0 \pm 3,7

Tabla 16. Estabilidad de las NPs a una temperatura=25°C. (media \pm SD, n=3).

Tiempo(días)	NPs	Tamaño \pm SD (nm)	Polidispersión	Z _{pot} \pm SD (mV)	EA \pm SD (%)
0	PLGA	208,0 \pm 2,9	0,112 \pm 0,007	-14,3 \pm 1,10	86,4 \pm 2,3
	PLGA-PEG	158,8 \pm 1,2	0,078 \pm 0,0098	-9,16 \pm 0,51	84,5 \pm 3,6
	PLGA-PEG-POD	90,52 \pm 0,9	0,105 \pm 0,0165	+21,3 \pm 2,0	79,2 \pm 5,2
	PLGA-PEG-Tat-HIV	110,6 \pm 2,0	0,112 \pm 0,028	+15,1 \pm 0,8	82,6 \pm 1,7
7	PLGA	207,7 \pm 3,8	0,060 \pm 0,029	-19,9 \pm 0,4	85,7 \pm 1,8
	PLGA-PEG	156,0 \pm 1,57	0,047 \pm 0,067	-10,9 \pm 0,9	84,1 \pm 2,4
	PLGA-PEG-POD	89,38 \pm 0,69	0,069 \pm 0,023	+12,6 \pm 1,6	77,2 \pm 1,7
	PLGA-PEG-Tat-HIV	108,4 \pm 2,73	0,094 \pm 0,011	+11,1 \pm 0,2	81,1 \pm 2,0
15	PLGA	201,3 \pm 2,1	0,051 \pm 0,026	-18,9 \pm 0,8	84,2 \pm 3,2
	PLGA-PEG	153,8 \pm 1,6	0,074 \pm 0,019	-23,1 \pm 0,8	82,7 \pm 1,1
	PLGA-PEG-POD	218,5 \pm 46,94	0,336 \pm 0,035	-2,36 \pm 1,23	75,0 \pm 3,7
	PLGA-PEG-Tat-HIV	190,1 \pm 2,75	0,166 \pm 0,014	-,763 \pm 0,31	75,3 \pm 5,0
30	PLGA	197,4 \pm 6,3	0,096 \pm 0,015	-23,5 \pm 1,40	84,0 \pm 2,2
	PLGA-PEG	152,8 \pm 4,1	0,091 \pm 0,022	-16,0 \pm 0,4	80,9 \pm 4,0
	PLGA-PEG-POD	769,1 \pm 79,59	0,505 \pm 0,036	0,314 \pm 0,5	68,3 \pm 4,2
	PLGA-PEG-Tat-HIV	653 \pm 43,02	0,203 \pm 0,092	1,06 \pm 0,48	70,5 \pm 3,9

4.1.9 Estudio de mucoadhesión

La eficacia de mucoadhesión de los polímeros ha sido demostrada mediante estudios *in vivo* en la mucosa gastrointestinal, nasal y ocular de diferentes especies [196]. Los principales componentes de la mucosa son el agua y la mucina (polielectrolito aniónico), además de otros componentes como son los lípidos y mucopolisacáridos.

El moco en el ojo se produce principalmente por las células caliciformes conjuntivales, y forma la capa inferior de la película de humectación lagrimal del epitelio corneal. Los polímeros mucoadhesivos pueden adherirse a la capa de mucina que cubre la conjuntiva y las superficies de la córnea por enlaces de hidrógeno, covalentes, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Estas conforman la base de la mucoadhesión ocular [197].

Atendiendo a lo anterior, hemos estudiado la influencia de la carga superficial de diferentes NPs (PLGA-PEG-NPs, PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs) que contienen FB antes y después de la incubación con mucina. Los valores de Z_{pot} obtenidos sugieren que existe cierta interacción entre las NPs y la mucina (Figura 27). Se obtuvieron diferencias significativas entre las PLGA-PEG-NPs y PLGA-PEG-Péptido-NPs antes y después de la incubación con mucina ($P < 0,001$). A pesar de la repulsión electrostática de las PLGA-PEG-NPs, se conoce que la presencia de las cadenas de PEG en la superficie de las partículas puede modular las propiedades interfaciales de las NPs, y por lo tanto influir en la mucoadhesión y absorción del fármaco [196, 198]. Los valores de Z_{pot} de las PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs disminuyen inmediatamente después de la incubación con mucina, cambiando la carga de positiva a negativa. Esta reducción puede ser atribuida a las fuerzas de atracción electrostática entre las PLGA-PEG-Péptido-NPs y la mucina. Los resultados indican que ambos péptidos aumentan las propiedades

mucoadhesivas de las NPs poliméricas. No se observaron diferencias significativas entre las PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs ($P < 0,05$).

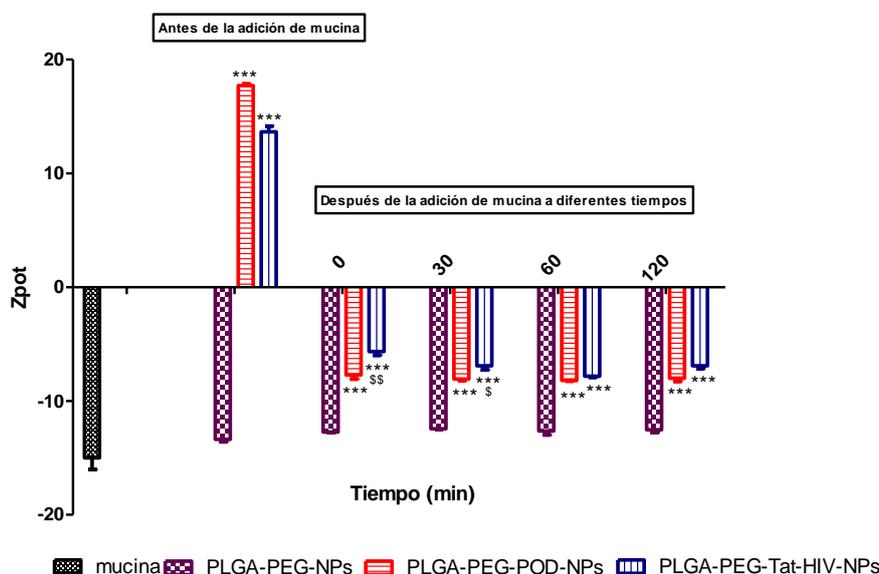


Figura 27. Valores de Z_{pot} obtenidos de la mucina y las NPs (PLGA-PEG-NPs, PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs) que contienen FB antes y después de la incubación con mucina. Los valores se expresaron en media \pm SD, $n=3$. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ and *** $P < 0,001$ (PLGA-PEG-NPs vs PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs). \$ $P < 0,05$, \$\$ $P < 0,01$ y \$\$\$ $P < 0,001$ (PLGA-PEG-POD-NPs vs PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs).

4.1.10 Estudio ex vivo de la interacción de las PLGA-PEG-Péptido-NPs con el epitelio corneal

Uno de los retos más importantes en el diseño de fármacos para administración tópica ocular, es conseguir atravesar las barreras protectoras del ojo sin dañar las estructuras oculares. La penetración de los fármacos mediante esta vía, se puede llevar a cabo a través de la córnea (vía transcorneal) o de la conjuntiva y esclera (vía conjuntival/escleral). Se conoce que la mayoría de las sustancias activas que se emplean por vía tópica se absorben empleando la ruta transcorneal. Por este motivo, durante

mucho tiempo se pensó que la conjuntiva era sólo una vía de eliminación. Hoy en día se sabe que hay sustancias capaces de atravesar la conjuntiva llegando a alcanzar, en ciertas ocasiones, el segmento posterior del ojo [199].

El transporte de fármacos a través de la córnea está regulado por la anatomía y propiedades físico-químicas de las distintas capas de la misma. En general, el epitelio corneal permite el paso de sustancias activas hidrofóbicas de pequeño tamaño a través de las células epiteliales por difusión (ruta transcelular) y el de sustancias hidrofílicas entre los espacios de las mismas en lo que se conoce como ruta paracelular [200]. Tanto el epitelio como el endotelio corneal son de naturaleza lipídica, mientras que el estroma tiene una alta permeabilidad a sustancias hidrofílicas. Por lo tanto, la formulación óptima deberá tener características hidrofílicas y lipofílicas para atravesar estas capas, es decir, una solubilidad bifásica.

En este epígrafe se estudiará la interacción de las PLGA-PEG-Péptido-NPs con las células del epitelio corneal, mediante la técnica de microscopía confocal. Para realizar este estudio, las NPs fueron previamente marcadas con una sonda fluorescente (Rho).

4.1.10.1 Síntesis de las NPs PLGA-PEG-Péptido-Rho

Los péptidos POD y Tat-HIV fueron marcados previamente con rodamina (Rho). La Figura 28 muestra los espectros de MALDI-TOF de los péptidos POD-Rho y Tat-HIV-Rho, indicando que la Rho se unió covalentemente al extremo N-terminal de ambos péptidos. Se determinó el grado de marcaje, obteniendo $2,65 \times 10^{-3}$ moles Rho/mol POD y $4,0 \times 10^{-2}$ moles Rho/mol Tat-HIV.

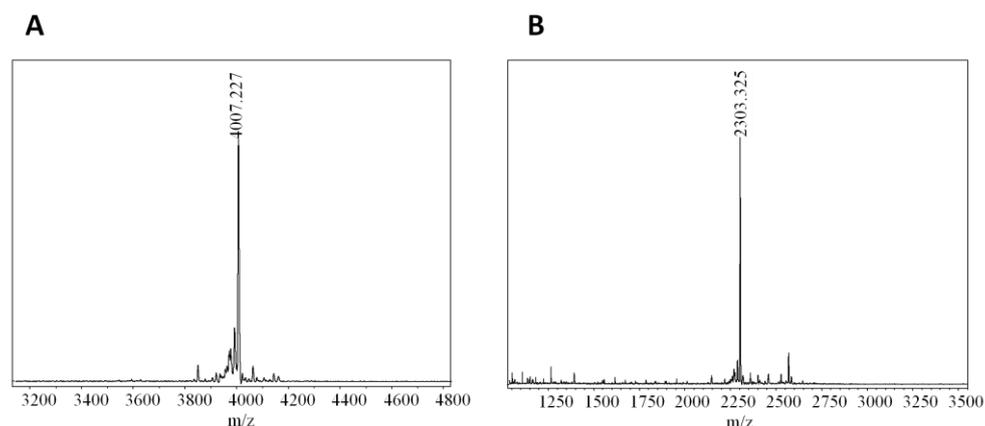


Figura 28. Espectro MALDI-TOF de los péptidos: POD-Rho (A) y Tat-HIV-Rho (B).

Las NPs PLGA-PEG-Péptido-Rho se obtuvieron a partir de polímero PLGA-PEG-Maleimido y los péptidos marcados con Rho. Posteriormente se prepararon las NPs (sin FB) por el método del desplazamiento del disolvente. La cantidad de Rho en ambas formulaciones (PLGA-PEG-POD-Rho y PLGA-PEG-Tat-HIV-Rho) se determinó mediante curva de calibración utilizando patrones de Rho de concentración conocida. Se obtuvo una concentración similar de $0,25\mu\text{M}$ y $0,24\mu\text{M}$ de Rho para las NPs PLGA-PEG-POD-Rho y PLGA-PEG-Tat-HIV-Rho, respectivamente. La Tabla 17 muestra los parámetros fisicoquímicos de las NPs marcadas.

Tabla 17. Propiedades físicoquímicas de las PLGA-PEG-Péptido-Rho-NPs. (media \pm SD, n=3).

Composición NPs	Tamaño \pm SD (nm)	Polidispersión \pm SD	Z _{pot} \pm SD (mV)
PLGA-PEG-POD-Rho	87,18 \pm 0,30	0,112 \pm 0,041	22,6 \pm 2,7
PLGA-PEG-Tat-HIV-Rho	99,74 \pm 1,19	0,083 \pm 0,028	15,8 \pm 0,8

Si comparamos estos resultados con los obtenidos en la Tabla 12, vemos que los parámetros de las NPs marcadas son similares a los de las NPs sin marcar, esto significa que la cantidad de Rho utilizada no afecta los parámetros fisicoquímicos de las NPs. La Figura 29 muestra las imágenes de microscopía de fluorescencia de las NPs marcadas. En ambas imágenes se observa una distribución de tamaño de partícula homogénea.

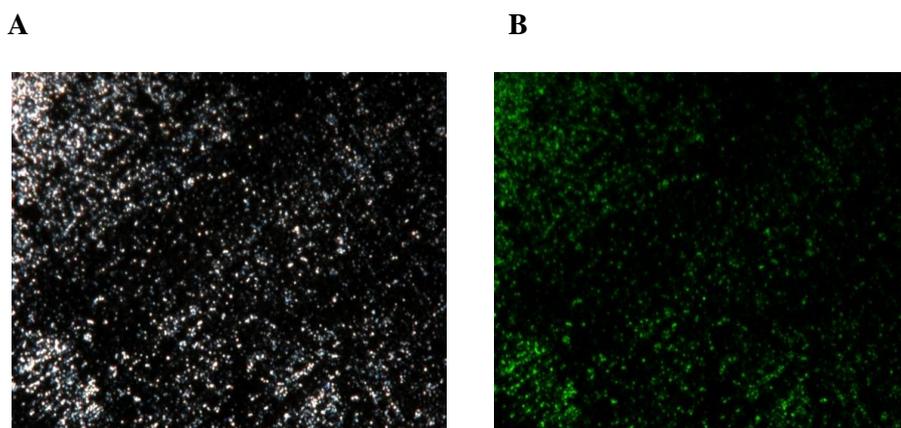


Figura 29. Microscopía de fluorescencia de las NPs PLGA-PEG-Péptido-Rho. Luz visible (A) y excitación a 580 nm (B).

4.1.10.2 Microscopía confocal de barrido (CLSM)

La microscopía confocal es una de las técnicas más utilizadas para evaluar el efecto de diversos fármacos o vehículos en la superficie corneal[201]. Qaddoumi M.G et al han estudiado la interacción de las NPs PLGA con células epiteliales conjuntivales de conejo, demostrando que las mismas se adsorben a las células mediante un mecanismo de endocitosis [202]. Otros estudios realizados por De Campos A.M et al, demostraron que la interacción de las NPs de PCL con células del epitelio corneal depende de la composición del polímero utilizado para cubrir su superficie. Las NPs de PCL recubiertas con PEG aceleran el transporte a través de todo el epitelio, mientras que las NPs recubiertas con quitosano (CS) favorecen la adsorción en las capas superficiales del epitelio corneal [43].

En este apartado se ha estudiado la interacción de las PLGA-PEG-Péptido-NPs con el epitelio corneal. Las imágenes obtenidas por CLSM muestran las células del epitelio corneal del conejo una vez que han sido expuestas a las PLGA-PEG-POD-Rho-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-Rho-NPs (Figura 30A-E). Se utilizaron los colorantes WGA y Hoechst para distinguir los contornos del núcleo y la membrana celular. Como era de esperar, ambas formulaciones, que presentan en su composición PLGA y PEG, se adsorben a las células epiteliales. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores en la utilización de NPs de PLGA-PEG [171], poli(alquilocianoacrilato) [203] y PCL [204]. Estos autores demostraron que las NPs penetran en el epitelio corneal a través de una vía transcelular siguiendo un mecanismo de endocitosis de adsorción debido a interacciones no específicas de las NPs con las primeras capas del epitelio.

En las imágenes obtenidas se aprecia que las NPs se distribuyen principalmente alrededor del núcleo. En el caso de las PLGA-PEG-POD-NPs se observa mayor intensidad en las señales de fluorescencia que la obtenida con las PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs. A pesar que los resultados del estudio de mucoadhesión demostraron que ambos péptidos proporcionan una mejor interacción electrostática con la mucina, el estudio *ex vivo* mediante CLSM sugiere que las PLGA-PEG-POD-NPs presentan mayor interacción que las PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs. Estudios previos han demostrado que el péptido POD conjugado a fármacos (moléculas pequeñas) penetra a través del epitelio corneal mediante aplicación tópica [61]. Nuestros resultados demuestran que este péptido tiene un elevado potencial para direccionar moléculas de elevado peso molecular, como es el caso de las NPs poliméricas objeto de nuestro estudio.

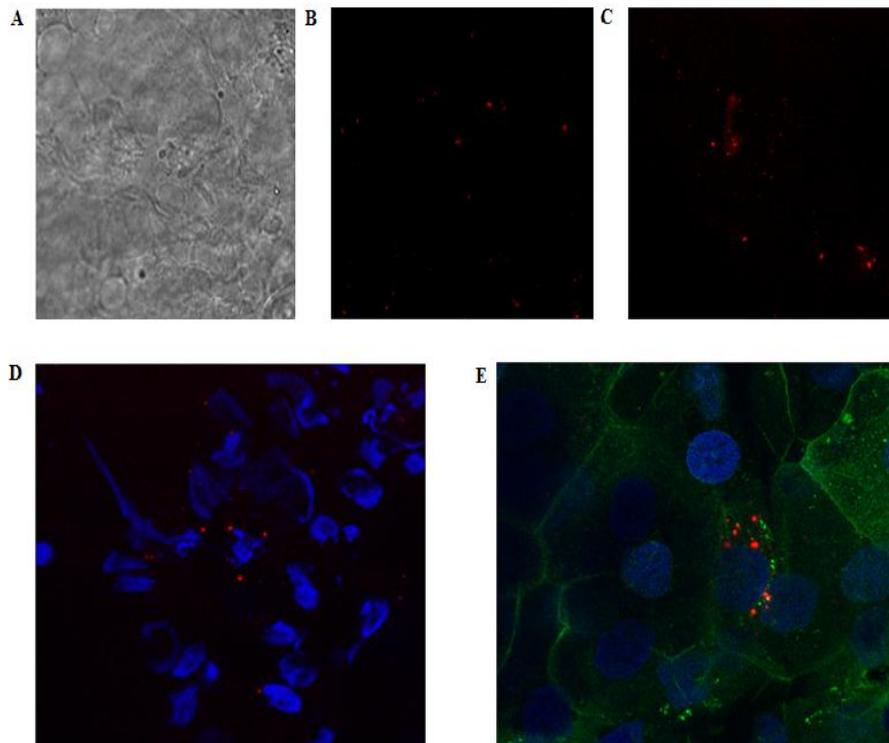


Figura 30. CLSM de las NPs no marcadas en las células del epitelio corneal (A), NPs marcadas PLGA-PEG-Tat-HIV-Rho (B), PLGA-PEG-POD-Rho (C) y su contraste con el núcleo (D) y la membrana celular (E).

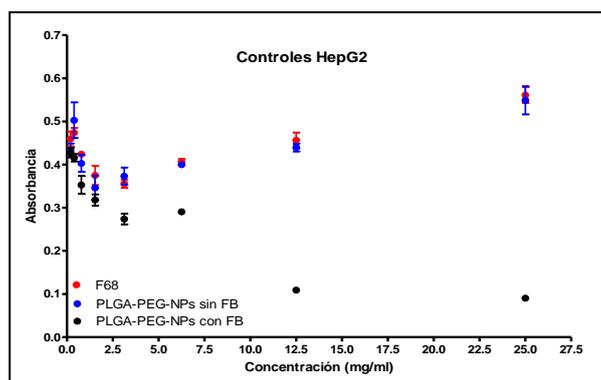
4.1.11 Citotoxicidad de las PLGA-PEG-Péptido-NPs

El estudio de citotoxicidad se realizó mediante el procedimiento experimental del MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenada que produce un compuesto de color azul (formazán) que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, siendo la cantidad de células vivas proporcional a la cantidad de formazán producido [205-207].

Se evaluó la citotoxicidad de las PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs en dos líneas celulares diferentes: HeLa y HepG2. En primer lugar se analizaron diferentes controles: F68 (tensioactivo utilizado para la

obtención de las NPs) y las PLGA-PEG-NPs sin y con FB. Como se puede observar, los valores de absorbancia siguen la misma tendencia en el caso del F68 y PLGA-PEG-NPs sin FB, mientras que las que contienen FB disminuyen a medida que aumenta la concentración de las NPs, lo que indica una cierta citotoxicidad del fármaco a concentraciones elevadas (Figura 31).

A



B

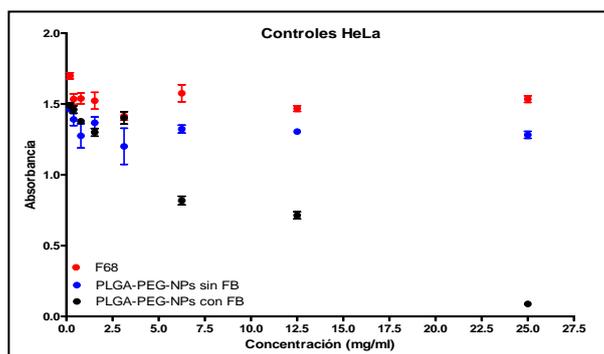


Figura 31. Valores de absorbancia de los controles en las células HepG2 (A) e HeLa (B).

Tomando como control los valores de absorbancia de F68, los resultados de viabilidad celular se presentaron como el cociente entre la absorbancia de las NPs en estudio y la del control expresado en porcentaje. En la Figura 32 se muestran los diagramas obtenidos, los cuales han sido ajustados a una curva decreciente exponencial para obtener los IC_{50} (concentración que inhibe el 50% de la fusión celular).

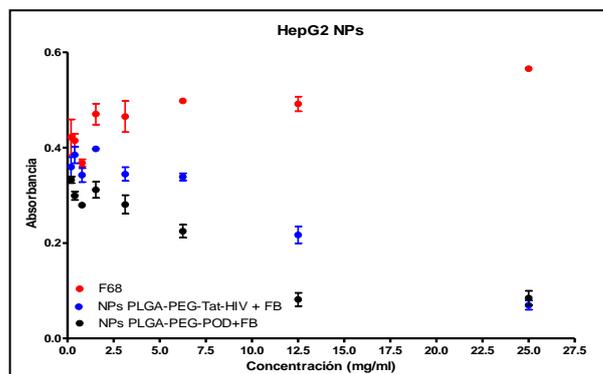
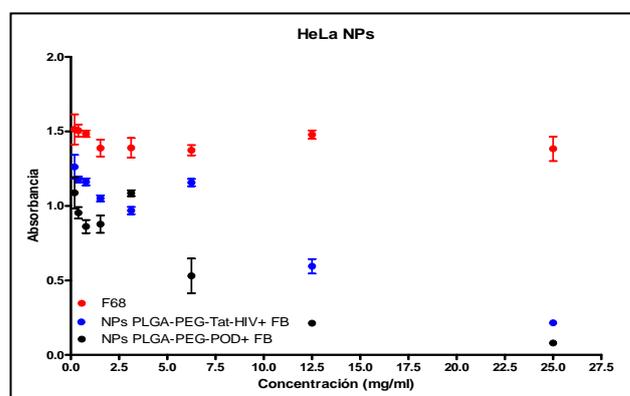
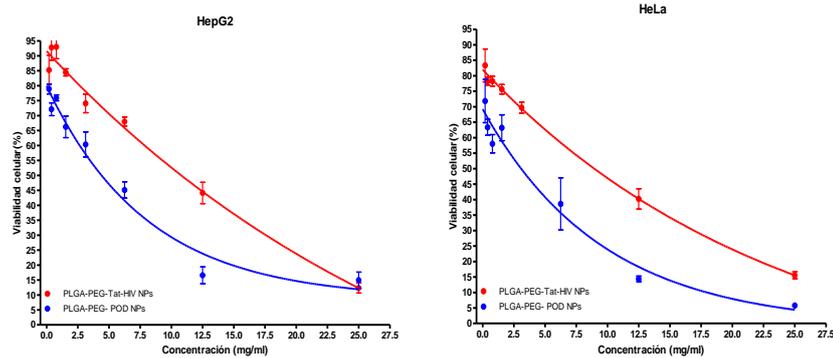
A**B**

Figura 32. Valores de absorbancia de las PLGA-PEG-Péptido-NPs con FB en las células HepG2 (A) HeLa (B).

Los valores experimentales de IC_{50} en las PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs fueron de 10,8 mg/ml en células HepG2 y de 8,4 mg/ml en células HeLa, mientras que para las de PLGA-PEG-POD-NPs fueron de 4,4 mg/ml y 3,9 mg/ml, respectivamente (Figura 33A). La Figura 33B muestra las fotografías representativas de los cultivos celulares HepG2 y HeLa en presencia de las NPs estudiadas. En las primeras columnas se muestran los cultivos celulares sin tratamiento, únicamente con tensioactivo; en las segundas se observan imágenes de los cultivos incubados con una concentración de NPs aproximada a su IC_{50} y en las terceras, los mismos cultivos con una concentración de NPs elevada próxima a su IC_{100} (concentración que inhibe el 100% de la fusión celular). Estos resultados coinciden con lo reportado por

otros autores, indicando la ausencia de toxicidad de las NPs a las concentraciones ensayadas [207].

A



B

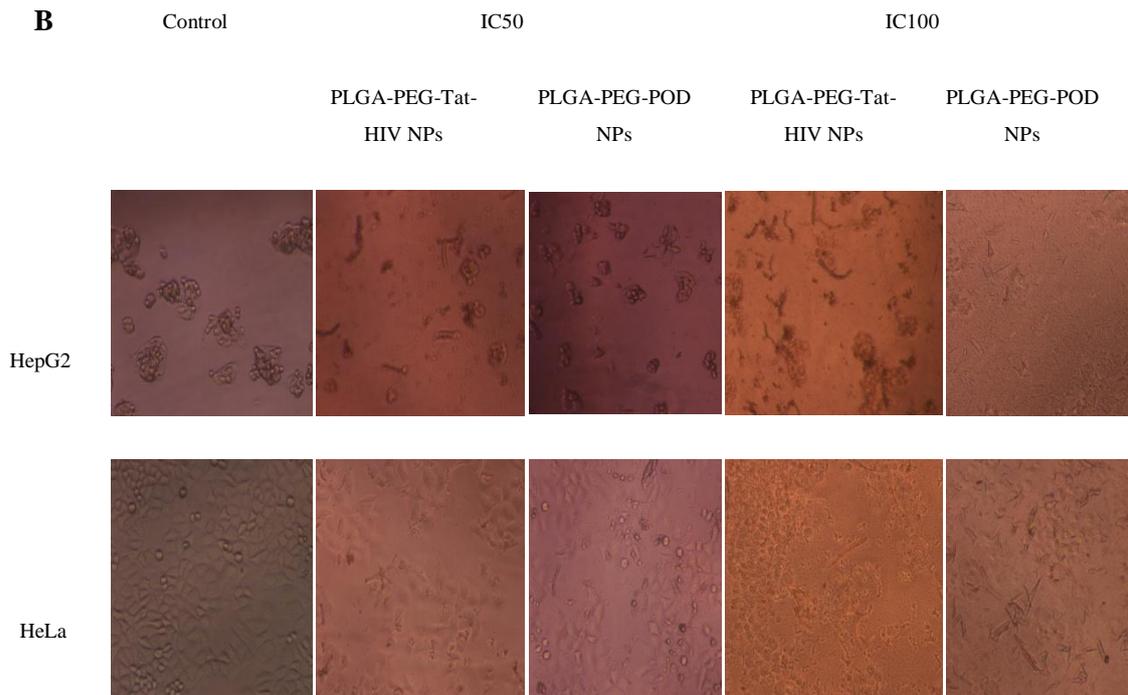


Figura 33. Citotoxicidad de las PLGA-PEG-Péptido-NPs en líneas celulares HepG2 y HeLa. Curvas de viabilidad celular en un rango de concentración de 25 mg/ml a 0,1 mg/ml (A). Fotografía de las células HepG2 y HeLa incubadas con las NPs a las concentraciones IC₅₀ y IC₁₀₀ (B).

4.1.12 Estudio de tolerancia ocular

4.1.12.1 *In vitro* HET-CAM

El HET-CAM es un método alternativo a la experimentación animal [208] para la evaluación del potencial de irritación ocular que está basado en la observación de los efectos irritantes de un producto sobre la membrana corioalantoidea (CAM) de un huevo de gallina con un embrión de 10 días. Esta membrana está muy vascularizada y tiene una estructura similar a la de otros tejidos muy vascularizados como la conjuntiva, por lo que constituye un modelo ideal para el ensayo de productos potencialmente irritantes a nivel ocular.

Las PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs se evaluaron mediante el ensayo del HET-CAM. Posteriormente se aplicaron las formulaciones directamente sobre la CAM (Figura 34). Como control positivo se utilizó una solución de NaOH (0,1 M) para detectar los cambios que ocurren en la membrana (vasoconstricción, hemorragia y coagulación). La hemorragia puede observarse como la aparición de sangre extravasada en forma de “coliflor”, mantel, velo difuso o puntiforme. La vasoconstricción se aprecia en los capilares, que se vuelven más finos y de color más claro. La coagulación se manifiesta como opacidad y/o trombosis; la opacidad como la aparición de un velo opalescente en parte o toda la membrana y la trombosis aparece como una discontinuidad del flujo sanguíneo en los vasos que les da un aspecto segmentado.

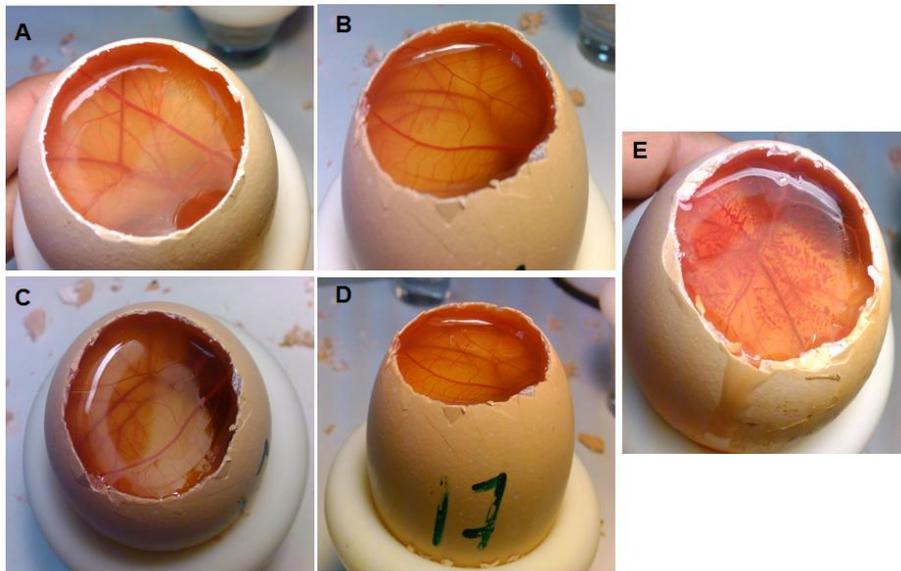


Figura 34. Fotografía del CAM después de la instilación de las NPs que contienen FB: (A) PLGA-NPs, (B) PLGA-PEG-NPs, (C) PLGA-PEG-POD-NPs, (D) PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs y (E) el control positivo (NaOH (0,1M)).

Transcurridos 5 minutos de la aplicación de las muestras no se observaron cambios significativos de la CAM, obteniéndose un bajo índice de irritación ocular (OII =0), lo que indica una óptima tolerancia ocular.

Con respecto al efecto del tamaño de partícula en la irritación ocular, Schoenwald and Stewart han descrito, que solo las que tienen un tamaño de 20 μm inducen problemas de irritación ocular [172]. Por lo tanto, la distribución de tamaños de partículas obtenidas en este trabajo son apropiados para la administración ocular de fármacos.

4.1.12.2 *In vivo* Draize test

Los estudios *in vitro* no pueden simular los mecanismos de irritación ocular que ocurren en la realidad, por este motivo se llevó a cabo también un ensayo *in vivo*. El test de Draize valora los efectos adversos de las sustancias sobre la córnea, el iris y la conjuntiva. De la córnea, se valora la opacidad y el área afectada; del iris, la presencia de inflamación, pliegues, edema, inyección ciliar circuncorneal, fotofobia, hemorragia y destrucción del

tejido; y de la conjuntiva, el grado de enrojecimiento, quemosis y la presencia de exudados.

Tras 1 hora de instilación de las NPs en el saco conjuntival de los conejos albinos, se realizó una observación en los ojos para valorar las posibles lesiones. Después de 24 horas de exposición de las NPs, se calculó la puntuación total media (PTM) de todas las formulaciones (PLGA-PEG-NPs, PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs). Según este ensayo las NPs se clasifican como no irritantes, obteniéndose una PTM=0 en todos los casos. En la Figura 35 se muestran a modo de ejemplo las fotografías del ojo de conejo después de la instilación de las PLGA-PEG-POD-NPs.

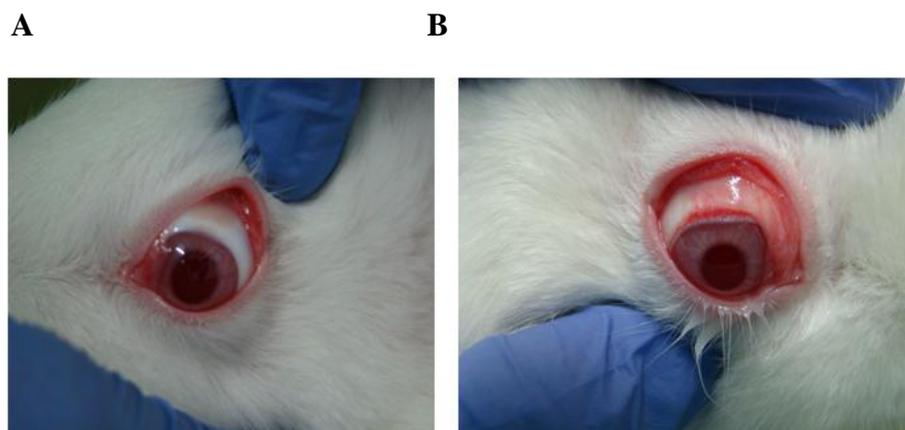


Figura 35. Fotografía del ojo de conejo después de la instilación de las PLGA-PEG-POD-NPs (A) y el AS (B).

4.1.13 Estudio de eficacia antiinflamatoria

Se realizaron dos estudios para determinar la eficacia antiinflamatoria de las NPs con el objetivo de utilizarlas como método de prevención o tratamiento en la cirugía de cataratas.

Para iniciar el estudio del tratamiento, previamente se instiló araquidonato de sodio (AS) que produce una inflamación y una significativa hiperemia en un tiempo de 30 min. Como la transparencia corneal no se afectó por la instilación de AS, este parámetro no fue considerado en el cálculo de la

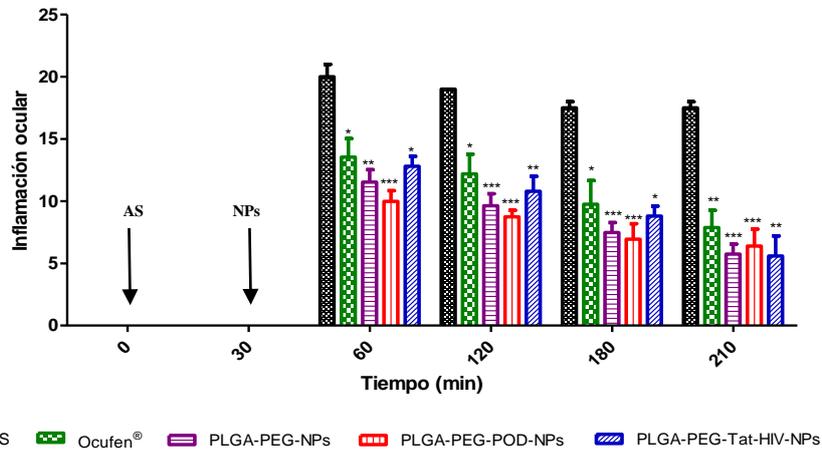
puntuación total media (PTM). Las NPs que contienen FB disminuyen lentamente la inflamación ocular obteniéndose un PTM mayor de 5 (Figura 36A). En ninguno de los casos se observó una mejora rápida, manteniéndose el enrojecimiento de la conjuntiva y la inyección circuncorneal moderada del iris. Si comparamos las NPs con el Ocufen[®], vemos que no se observan diferencias significativas entre ellas ($P < 0,05$).

En el caso de la prevención (Figura 36 B), solo las PLGA-PEG-POD-NPs disminuyen notablemente la inflamación conjuntival y la hiperemia del iris, desapareciendo totalmente los signos de inflamación 180 min después de inducir la inflamación ($P < 0,001$) (Figura 37).

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por el estudio *ex vivo* mediante CLSM, donde se demostró que las PLGA-PEG-POD-NPs presentan mayor interacción que las PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs con las células del epitelio corneal. Los resultados *in vivo* podrían explicar la retención prolongada de las PLGA-PEG-POD-NPs en el área precorneal así como su absorción/internalización en el epitelio corneal.

Las PLGA-PEG-POD-NPs presentaron una mayor respuesta antiinflamatoria en la prevención que en el tratamiento. Estos resultados podrían estar relacionados con la diferencia de absorción de las NPs en los tejidos sanos e inflamados. A pesar de que se ha demostrado que el tiempo de residencia de las NPs es mucho mayor en tejidos inflamados que en los sanos, nuestros resultados pueden deberse a algunas modificaciones fisiológicas peculiares que ocurren en los procesos inflamatorios [209, 210]. Por otra parte la instilación del AS antes de la administración de las NPs condujo al lagrimeo aumentando las pérdidas precorneales y eliminación de las NPs, provocando una disminución de su actividad terapéutica.

A



B

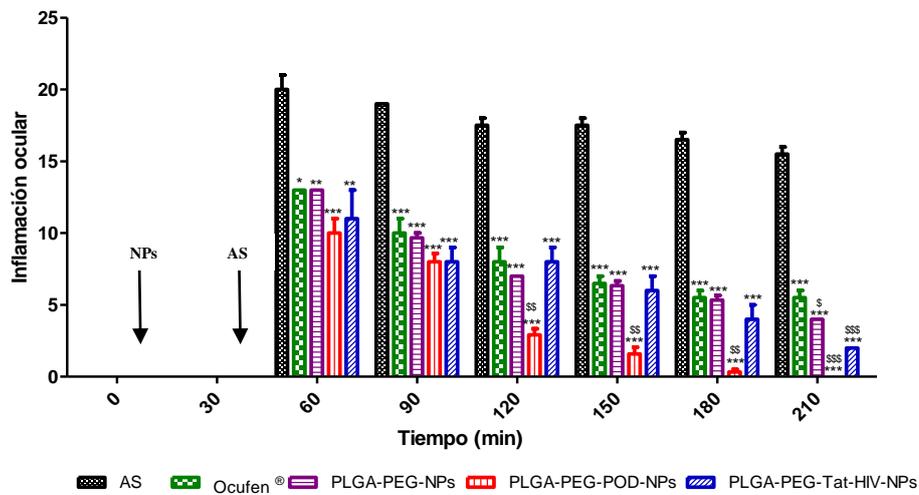


Figura 36. Comparación de la eficacia antiinflamatoria de: PLGA-PEG-NPs, PLGA-PEG-Péptido-NPs y Ocufen® en el (A) tratamiento y la (B) prevención de la inflamación ocular inducida por el AS en el ojo de conejo. Los valores se expresaron en media±SD, n=3. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ significativamente menor que la inflamación inducida por AS. \$ $P < 0,05$, \$\$ $P < 0,01$ y \$\$\$ $P < 0,001$ significativamente menor que la eficacia antiinflamatoria del Ocufen®.

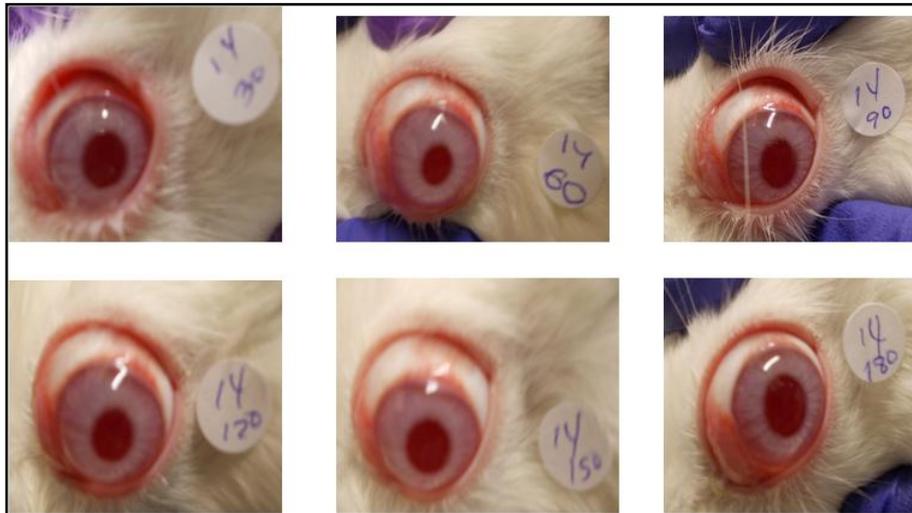


Figura 37. Efecto antiinflamatorio de las PLGA-PEG-POD-NPs en la prevención de la inflamación ocular inducida por el AS. (Las imágenes se tomaron 30 min después de inducir la inflamación).

Todos estos resultados indican que las PLGA-PEG-POD-NPs presentan una estrecha distribución de tamaño de partículas, son capaces de penetrar tejidos intraoculares, aumentando el tiempo de residencia del FB en la superficie corneal de manera sostenida, obteniéndose una óptima eficacia antiinflamatoria.

4.2 Diseño de nanosistemas para aumentar la actividad y biodisponibilidad de péptidos GBV-C inhibidores del HIV-1

En la Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédicas de Péptidos (USIBAP) del IQAC-CSIC en Barcelona, se ha demostrado que existen varios dominios peptídicos de la glicoproteína E2 del GBV-C que inhiben la entrada del virus HIV-1 a las células [87-90].

En estudios previos, se realizó un análisis minucioso mediante la síntesis en fase sólida de 124 secuencias peptídicas compuestas por 18 aminoácidos, solapadas en 15 residuos, que cubrían la totalidad de la estructura primaria de la proteína E2 (1-340 aa), de acuerdo con la base de datos GenBank (Figura 38).

```
E2 (U45966_USA)
APASVLGSRPFDYGLTWQSCSCRANGSRYYTTEKVVWDRGNVTLLCDCPNGPWV
WLPAFCQAIGWGDPIHWSHGQNRWPLSCPQYVYGSVSVTCVWGSVSWFASTG
GRDSKIDVWSLVPVGSASCTIAALGSSDRDVTVELSEWGVPCATCILDRRPASC
TCVRDCWPETGSVRFPPHRCGAGPKLTKDLEAVPFVNRTPFTIRGPLNQGRGN
PVRSPGFSGYAMTKIRDSLHLVKCPTPAIEPPTGTGFFPGVPPLNCLLLGTEVS
EALGGAGLTGGFYEPLVRRRSELMGRRNPVCPGFAWLSSGRPDGFIHVQGHLE
VDAGNFIPPRWLLDFVFLVLLYLMKLAEARLVPLLLLLWWWVNLAVLGLPA
VDAAVA
```

Figura 38. Estructura primaria de la proteína E2 GBV-C

Como se ha indicado anteriormente, la entrada del virus HIV-1 a la membrana celular viene dada principalmente por el péptido de fusión (PF-HIV-1). En trabajos previos de nuestro grupo, se realizaron diferentes estudios biofísicos con el propósito de conocer si existía alguna interacción entre el PF-HIV-1 y los péptidos E2 durante la penetración celular. Los primeros resultados satisfactorios se obtuvieron mediante el ensayo de liberación del contenido vesicular (*leakage*) utilizando liposomas de

palmitoiloleoilglicerofosfoglicerol (POPG) como modelo de membrana. Se demostró que el PF-HIV-1 permeabilizaba las membranas lipídicas con carga negativa provocando la liberación de las sondas fluorescentes contenidas en el interior de liposomas [211]. Se seleccionaron ciertas secuencias peptídicas como posibles candidatos inhibidores del HIV-1: P11 (31-48), P19-P21 (55-78), P34 (100-118), P45-P47 (133-156), P97 (289-306), P109 (325-342) y P124 (370-387); presentando todos ellos un porcentaje de inhibición superior al 50% [88].

Posteriormente, se realizaron otros ensayos biofísicos mediante las técnicas de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y resonancia de plasmón superficial (SPR). Estos ensayos demostraron que existe cierta afinidad entre los péptidos E2 y el PF-HIV-1. Los resultados de ITC indicaron que la unión entre ambos péptidos está caracterizada por una entalpía negativa, indicando que esta afinidad se debe a las interacciones por puente de hidrógeno o de Van der Waals [212]. Los estudios de inhibición de la infectividad causada por el HIV-1, obtuvieron especial relevancia los dominios P19-P21 (55-78) y P45-P47 (133-156). Estos péptidos podrían proporcionar pistas útiles para el desarrollo de nuevos péptidos con actividad anti-HIV-1.

Recientemente, Koedel et al han realizado un *screening* de 33 péptidos que abarcan toda la proteína E2 [213]. Estos péptidos fueron evaluados en líneas celulares CEMx174-M7-R5 que expresan los receptores (CD4, CXCR4 y CCR5). Los resultados del *screening* revelaron que los péptidos P4 (31-50) y P6 (51-70) inhibían la replicación del HIV-1, resaltando que la región N-terminal de la proteína E2 GBV-C posee cierta capacidad inhibitoria. Para definir cual es la región específica responsable de la supresión del HIV-1, estos investigadores sintetizaron 20 péptidos con una secuencia de 18 aminoácidos que representan la región (23-78) del extremo N-terminal de la proteína E2-GBV-C. Ellos demostraron que la región (29-72) inhibe

eficientemente la replicación *in vitro* del HIV-1 [213]. En particular, los péptidos que se encuentran localizados en las posiciones (45-64) denominada (P6-2) y (37-64) denominada (P4762), mostraron una mayor potencia en los ensayos de replicación del HIV-1, realizados en células TZM-bl.

Teniendo en cuenta la elevada actividad inhibitoria que posee la región N-terminal E2 GBV-C, específicamente el péptido P6-2, una parte de este capítulo estará encaminada al diseño de diversas formas de presentación peptídica o vehiculización para aumentar la biodisponibilidad de este péptido, tales como son: derivatización lipófila con ácido palmítico (Pal-P6-2), conjugación del péptido a NPs poliméricas (PLGA-PEG-NPs-P6-2) y encapsulación en liposomas con diferentes composiciones lipídicas (PC, PC-Chol, PC-Chol-SM, PC-Chol-GalCer y PC-Chol-SM-GalCer)

4.2.1 Síntesis y caracterización de los péptido P6-2 y Pal-P6-2

La síntesis del péptido P6-2 (LCDPCNGPWVWVPAFCQAVG) se realizó de forma manual en fase sólida utilizando la resina hidroxilo NovaSyn TGA con una funcionalidad inicial 0,26 mmol/g. La incorporación del primer aminoácido se efectuó tras la formación del anhídrido simétrico del aminoácido (Fmoc-Gly protegido en su extremo α -amino y cadena lateral) en presencia de DMAP. La cantidad de Gly unido a la resina se determinó espectrofotométricamente, obteniéndose un 72% de eficiencia de acoplamiento.

El resto de la síntesis se realizó siguiendo la estrategia Fmoc/tBu, utilizando 3 equivalentes de aminoácido y los activadores (DIEA y HATU) disueltos en DMF. Posteriormente se procedió al desanclaje, de una parte de la peptidil resina, con posterior liofilización del péptido. A continuación, se llevó a cabo la purificación del P6-2 crudo mediante HPLC a escala semipreparativa. Se utilizó una columna de fase reversa C₈ con un gradiente

de 80% a 20% de H₂O/ACN en 25 minutos, a un flujo de 3 ml/min y detección 280 nm. En la Figura 39 se muestra el cromatograma analítico, donde se puede observar que la purificación del péptido fue efectiva obteniéndose un porcentaje de pureza que supera el 95%. Posteriormente, el péptido puro se analizó mediante la técnica UPLC/ES-MS confirmándose que la pureza y el Mw del péptido se corresponden con lo esperado (Figura 40).

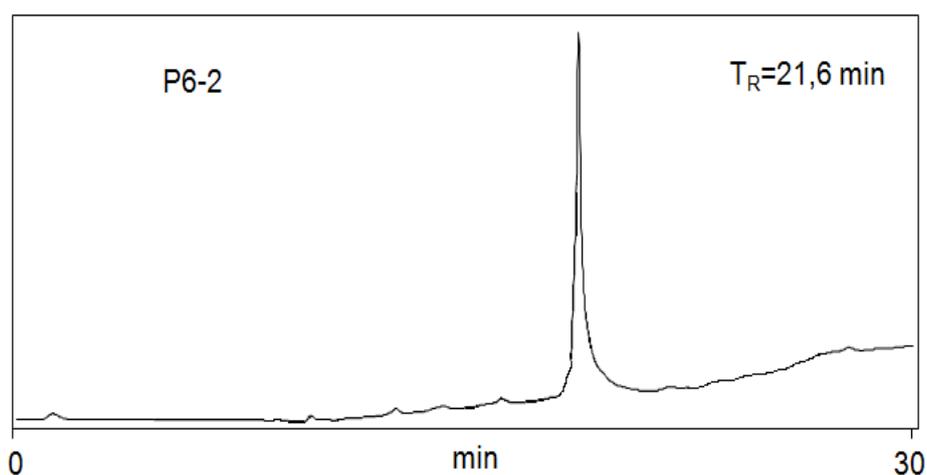


Figura 39. Espectro de HPLC analítico del péptido P6-2 puro, utilizando columna de fase reversa C₈. Flujo 1ml/min y detección a 220 nm. Gradiente de elución: 95% H₂O (0,05% TFA) a 5% ACN (0,05% TFA) en 30min.

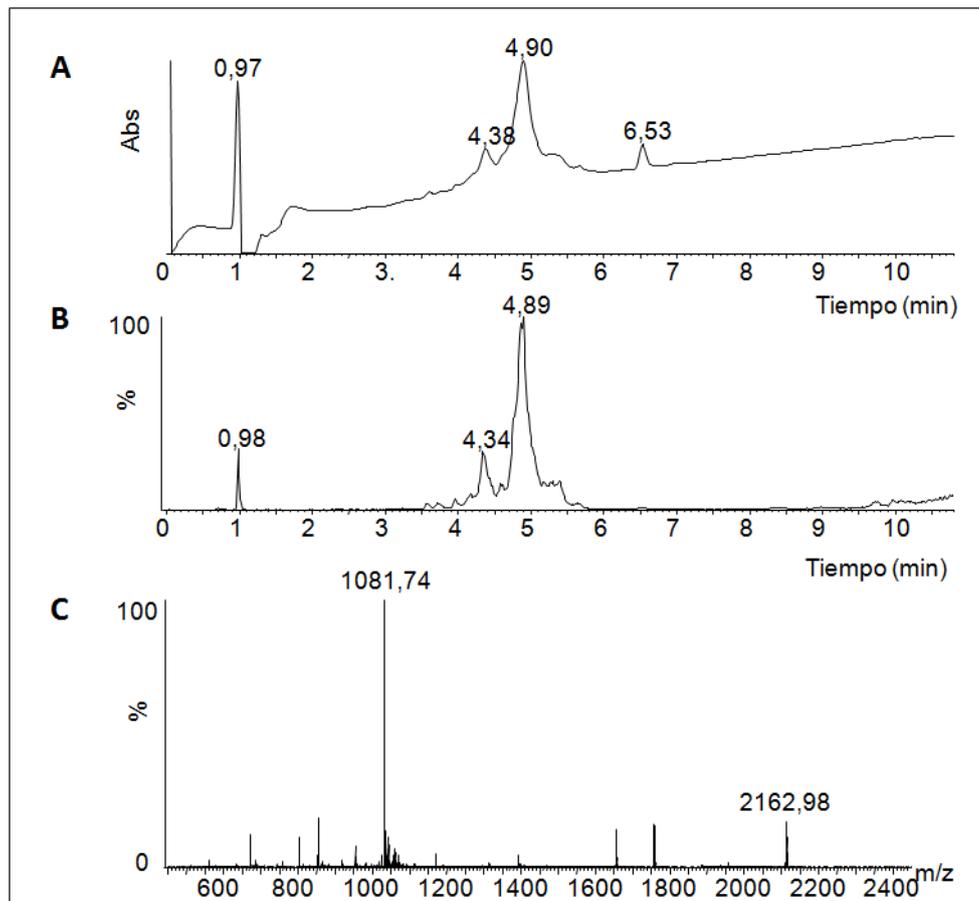


Figura 40. Espectro de UPLC/ES-MS del péptido P6-2 puro. El espectro *diode arrays* (A), su correspondiente ionización MS ES⁺ (B) y las masas obtenidas en un tiempo de 4,89 min (C). Masa teórica= 2162,53 según el programa de cálculo ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/>).

Algunos autores plantean que la adición de ácidos grasos a las secuencias peptídicas, garantiza una mayor concentración del péptido inhibidor en la membrana celular, logrando así un mayor impedimento de la fusión del virus del HIV-1 a la célula (Figura 41).

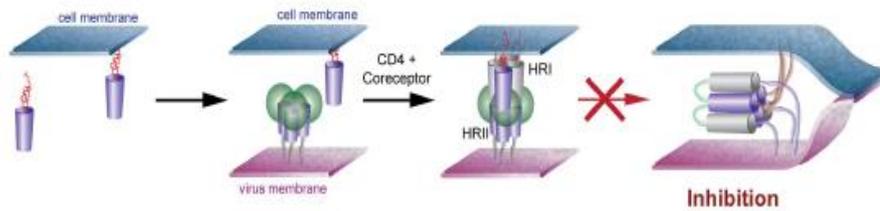


Figura 41. Esquema de la inhibición de la fusión de la membrana vírica y la célula producida por lipopéptidos[214].

Wexler-Cohen et al han conjugado diferentes ácidos grasos: ácido octanoico (C8), ácido dodecanoico (C12) y ácido hexadecanoico (C16) a péptidos inhibidores del HIV-1, demostrando que la actividad inhibitoria aumenta con la longitud de las cadenas de ácidos grasos [215].

Recientemente se ha estudiado, mediante modelos de interacción molecular, que la molécula de ácido palmítico (ácido hexadecanoico) inhibe la fusión e infección causada por el HIV-1 mediante un mecanismo de unión a los receptores $CD4^+$ que bloquea la formación del complejo proteína-receptor ($gp120-CD4^+$) [216].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, realizamos la derivatización lipofílica del péptido P6-2 con ácido palmítico. Una vez terminada la síntesis del péptido se adicionó el ácido graso al extremo N-terminal de la peptidil-resina. La derivatización lipofílica se realizó con los activadores DIPCDI/HOBt. Para las incorporaciones de los ácidos grasos se utilizaron tres excesos, tanto del ácido graso como de los agentes de acoplamiento. El tiempo de acoplamiento fue aproximadamente de 24 horas. El test de la ninhidrina dió como resultado perlas amarillas indicando la formación satisfactoria del derivado Pal-P6-2. A continuación, se llevó a cabo el desanclaje con posterior liofilización empleando el mismo procedimiento realizado con el péptido P6-2. Finalmente, el derivado lipófilo se caracterizó mediante HPLC analítico y ES-MS. La purificación se realizó por el método de extracción en fase sólida, ya que el crudo peptídico tenía una elevada

pureza (90 %). Por otro lado, la presencia del ácido graso en la cadena peptídica aumenta la adsorción en las columnas cromatograficas, aunque éstas posean baja polaridad, disminuyendo así el rendimiento del péptido. Posteriormente se caracterizó el péptido puro mediante HPLC analítico y UPLC/ES-MS (Figura 42).

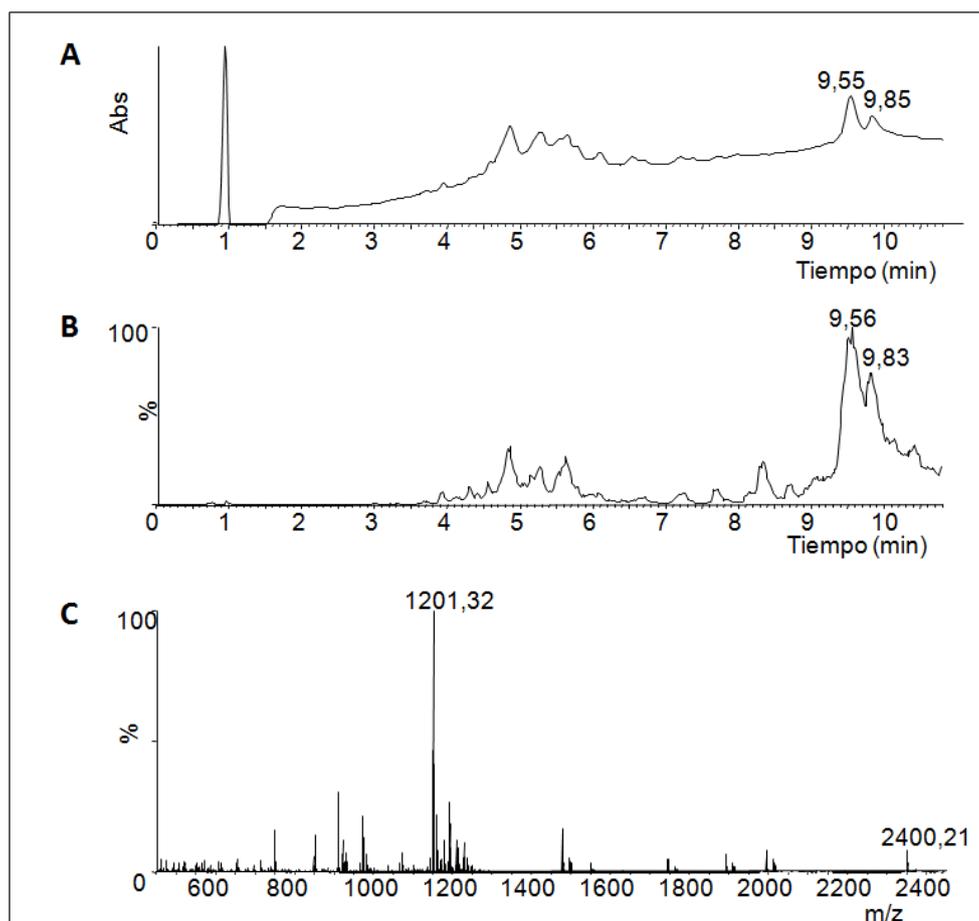


Figura 42. Espectro de UPLC/ES-MS del péptido Pal-P6-2 puro. El espectro *diode arrays* (A), su correspondiente ionización MS ES⁺ (B) y las masas obtenidas en un tiempo de 9,56 min (C). Masa teórica= 2400,95 según el programa de cálculo ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/>).

4.2.2 Síntesis de PLGA-PEG-NPs-P6-2

Como ya se ha explicado anteriormente, las NPs poliméricas son un modelo atractivo como sistemas de liberación de fármacos. El desarrollo e

innovación en este campo ha ido evolucionando desde la encapsulación de activos (primera generación) hasta la modificación de su superficie con polímeros hidrofílicos como el PEG (segunda generación) (Figura 43A-B). La tercera generación de estos sistemas se ha dirigido a la funcionalización con moléculas como ligandos de vectorización y péptidos fusógenos para obtener un sistema multifuncional (Figura 43C). La modificación en la superficie de NPs poliméricas con moléculas terapéuticas, aumenta su biodisponibilidad y liberación directa en el sitio diana [217, 218].

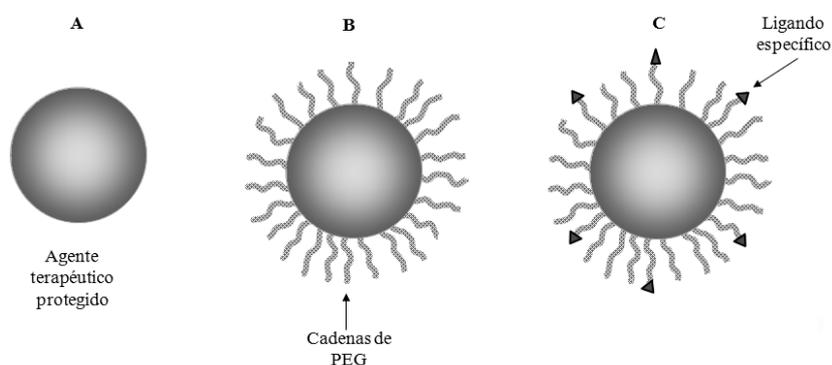


Figura 43. NPs con el agente terapéutico encapsulado (primera generación) (A), NPs pegiladas (segunda generación) (B) y NPs pegiladas con ligando específicos (tercera generación) (C) [219].

Nuestro propósito es diseñar un sistema de tercera generación del tipo PLGA-PEG que contenga como ligando específico el péptido P6-2. Este tipo de sistema garantizará una mayor concentración del péptido inhibidor y el aumento de la penetración y distribución intracelular.

El polímero hidrofílico PEG tiene especial importancia en el tema de liberación de fármacos. Se ha visto que este polímero impide el fenómeno de reconocimiento por los macrófagos, por lo que se ha hecho de vital interés su utilización en el campo de la biomedicina.

En investigaciones recientes se ha estudiado la influencia del PEG en copolímeros de PLGA-PEG de diferentes composiciones [174]. Este polímero hidrofílico forma una barrera estérica variando las propiedades fisicoquímicas de las partículas, siendo capaz de mejorar la absorción de moléculas terapéuticas ayudando a alcanzar la zona diana [195].

Las PLGA-PEG-NPs-P6-2 se obtuvieron a partir del polímero PLGA-PEG-Maleimido con posterior conjugación del péptido P6-2. Posteriormente se prepararon las NPs PLGA-PEG mediante el método del desplazamiento del disolvente. Con la finalidad de estudiar la influencia del PEG en las NPs, las mismas fueron analizadas mediante la técnica de RMN-¹H en medio de D₂O y CDCl₃.

En el espectro de RMN¹H se puede observar una señal intensa a 3,6 ppm correspondiente a los protones metileno del PEG (Figura 44). Las señales de los grupos metil o metileno del PLGA disminuyeron su intensidad en medio de CDCl₃ (Figura 44A) mientras que en el D₂O desaparecieron las señales (Figura 44B). Esto puede indicar que los protones del PLGA no se pueden detectar fácilmente porque se encuentran en el entorno sólido, debido a su escasa solubilidad en agua; mientras que las cadenas del PEG se mantienen en estado móvil facilitando la detección de las señales de este polímero hidrofílico en D₂O.

Nuestros resultados confirman que las NPs están compuestas por un núcleo de PLGA y una cubierta de PEG [195, 198, 220]. Por lo tanto, el análisis de RMN¹H podría indicar que durante el método de obtención de las NPs, la parte hidrofílica del polímero (PEG) se orienta hacia la fase externa (agua) mientras que el residuo lipófilo (PLGA) conforma el núcleo. Sin embargo, este resultado no es cuantitativo, por lo que no podemos asegurar que todas las cadenas de PEG se encuentren localizadas en la superficie de las PLGA-PEG-NPs.

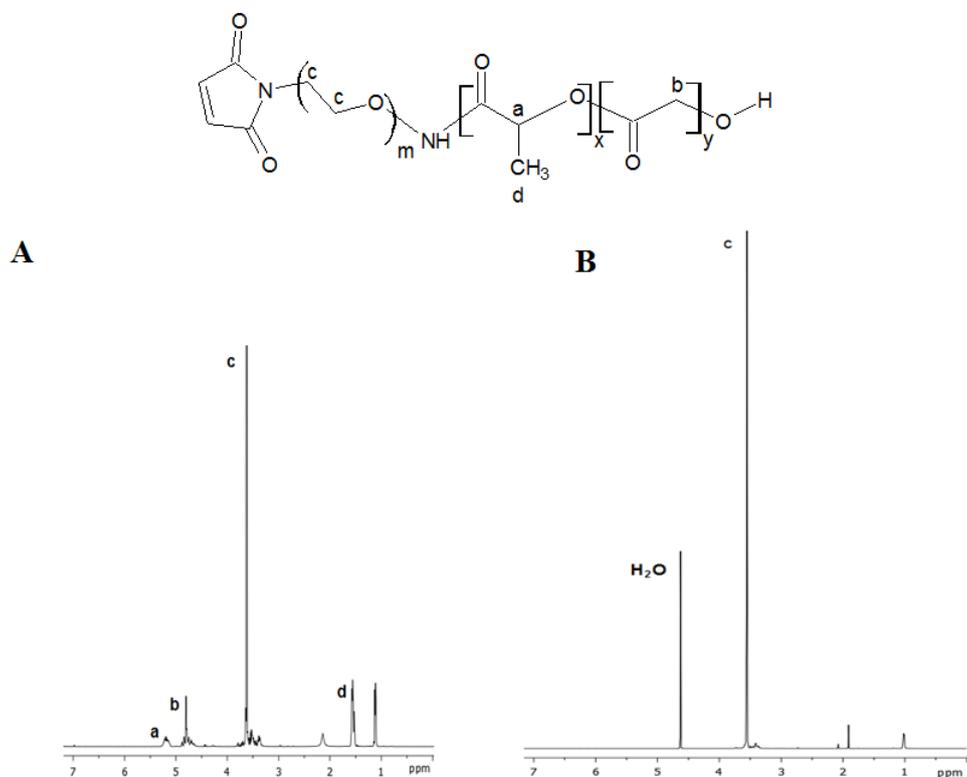


Figura 44. Espectro RMN-¹H de las NPs PLGA-PEG liofilizadas y resuspendidas en CDCl₃ (A) y D₂O (B).

El péptido P6-2 se unió covalentemente a las NPs PLGA-PEG-Maleimido mediante los grupos tioles (SH) de las tres Cys presentes en la secuencia peptídica. En la Tabla 18 se muestran los parámetros físicoquímicos de las NPs obtenidas. Una vez incorporado el péptido a la superficie de las NPs PLGA-PEG-Maleimido, se pudo observar un aumento en el tamaño y polidispersión de las mismas. Por otra parte se incrementó la carga superficial de las NPs, obteniéndose un nuevo valor de Z_{pot} con carga positiva. Estos parámetros evidencian la presencia del péptido P6-2 en la superficie de las NPs pegiladas.

Tabla 18. Propiedades físicoquímicas de las NPs de PLGA que contienen el péptido P6-2.

Composición NPs	Tamaño \pm SD (nm)	PI \pm SD	Z _{pot} \pm SD (mV)	EC \pm SD (%)
PLGA-PEG-Mal	144,7 \pm ,83	0,071 \pm 0,034	-5,36 \pm 0,68	-
PLGA-PEG-P6-2	190,0 \pm 2,8	0,122 \pm 0,020	18,1 \pm 0,44	30,5 \pm 3,8

Después de 24 h las PLGA-PEG-NPs-P6-2 fueron dializadas y se determinó la cantidad de P6-2 libre mediante la técnica de HPLC a escala analítica. Posteriormente, una parte de las NPs se liofilizaron y analizaron mediante RMN-¹H (Figura 45).

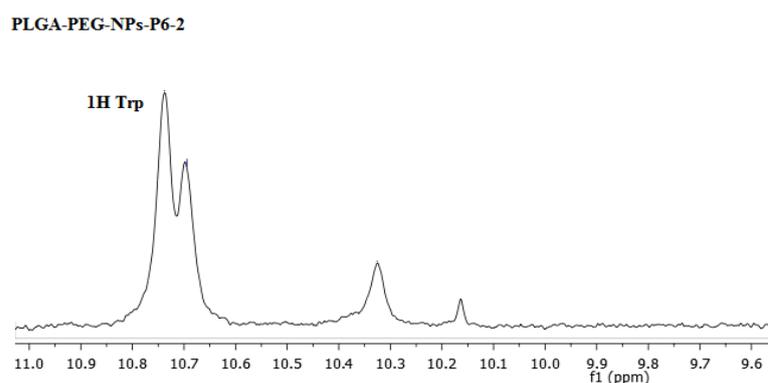


Figura 45. Espectros de RMN-¹H de las NPs PLGA-PEG-P6-2.

La cantidad de péptido unido covalentemente a las NPs se determinó mediante la (Ecuación 17) obteniéndose un 8,9 \pm 1,5 %.

$$W_{P6-2} = 100 (M_{P6-2} (I_{P6-2} (\delta = 11,8)/2)) / (M_{PLGA} (I_{PLGA} (CH, \delta = 5,2)))$$

(Ecuación 17)

Donde:

M_{P6-2} y M_{PLGA} son los pesos moleculares del P6-2 y el PLGA

I_{P6-2} es la integral de la señal correspondiente al triptófano (10,8 ppm).

I_{PLGA} es la integral de la señal correspondiente a los grupos -CH del PLGA (5,2 ppm).

4.2.3 Obtención de liposomas derivatizados con péptidos: P6-2 y VIR-P6-2

Los liposomas se han convertido en un sistema de gran interés para la vehiculización de principios activos debido a su prolongado tiempo de circulación [221]. Los liposomas del tipo LUVs se han utilizado como modelo de membrana biológica debido a que los fosfolípidos adoptan una estructura similar a los fosfolípidos que se encuentran en la membrana citoplasmática [222].

Con el fin de simular un modelo de membrana biológica, diseñamos liposomas del tipo LUVs con diferente composición lipídica. Estos liposomas se obtuvieron mediante las técnicas de extrusión y sonicación para lograr obtener un tamaño de partícula entre 100-200 nm, similar a los dominios de las balsas lipídicas que conforman un punto de ensamblaje importante para el virus HIV-1.

Nuestro propósito principal es diseñar un modelo lipídico que contenga encapsulados péptidos inhibidores, que sirva de sistema de reconocimiento y a su vez impida la replicación del virus HIV-1. En este sentido, hemos obtenido liposomas del tipo LUVs que contienen los péptidos inhibidores P6-2 y VIR-P6-2. Este último está compuesto por una variante del péptido VIRIP derivado de la α -1 antitripsina, que inhibe la replicación del HIV-1 a concentraciones inferiores a las del T-20 [223]. El péptido VIR576 ((LEAIPCSIPPEFLFGKPFVF)₂) es una variante dimérica del VIRIP (LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF) pero difiere en 4 aminoácidos y la sustitución de la metionina (M) por la cisteína (C), lo que promueve la

formación de un puente disulfuro intermolecular, aumentando considerablemente la capacidad anti-HIV-1 del péptido [224].

El péptido quimérico VIR-P6-2 fue sintetizado, purificado y caracterizado previamente en nuestro grupo de investigación con el propósito de aumentar la actividad del péptido P6-2.

Se prepararon liposomas del tipo LUVs que contienen encapsulados los péptidos P6-2 y VIR-P6-2. Los LUVs que contienen ambos péptidos se obtuvieron a partir de diferentes composiciones lipídicas: PC, PC-Chol, PC-Chol-SM, PC-Chol-GalCer y PC-Chol-SM-GalCer; para estudiar su influencia en la respuesta antiviral.

Los liposomas de PC son los más empleados en el sector farmacéutico debido a su fácil difusión en los tejidos y las células. Por otro lado, el colesterol es incapaz de formar bicapas por si solo, pero su presencia en la bicapa fosfolipídica confiere estabilidad a los liposomas. Dado su carácter anfipático, el colesterol orienta el grupo hidroxilo hacia la superficie de la bicapa e intercala el resto de la molécula entre las cadenas de ácido graso en el interior de la bicapa. Por otro lado, los esfingolípidos (SM y GalCer) mantienen el orden de las membranas celulares, conservando sus lípidos densamente empaquetados y con una movilidad reducida en el plano de la bicapa. Cuando el colesterol está presente en la bicapa, este tiende a ocupar los espacios situados entre las cadenas hidrocarbonadas saturadas de los lípidos, alineándose con los fosfolípidos y esfingolípidos [225].

Las preparaciones liposómicas se caracterizaron mediante el tamaño de las vesículas, el grado de incorporación de los péptidos y la determinación cuantitativa de fosfolípidos. Inicialmente se conoce la cantidad de lípido que se introduce para formar la bicapa lipídica, sin embargo, el problema que presenta la preparación de vesículas es que la cantidad de lípido varía durante el proceso de extrusión, y por lo tanto se desconoce la concentración

de liposomas después de la misma. Mediante la determinación del contenido de fosfatos fue es posible estimar las pérdidas y el contenido lipídico de las vesículas formadas. Posteriormente, el tamaño de las vesículas y la cantidad de péptido encapsulado se determinaron mediante las técnicas dispersión dinámica de la luz (Zetasizer Nano ZS) y HPLC en fase reversa. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Caracterización de los liposomas que contienen los péptidos P6-2 y VIR-P6-2. (media \pm SD, n=3).

Liposomas	Péptidos	Tamaño (nm)	Polidispersión	Contenido fosfatos (mM)	Concentración de péptido (mM)
PC	-	134,2 \pm 2,52	0,0066 \pm 0,048	3,19	-
	P6-2	145,1 \pm 1,6	0,330 \pm 0,083	4,90	0,163
	VIR-P6-2	133,7 \pm 2,24	0,069 \pm 0,013	4,74	0,114
PC-Chol	-	135,0 \pm 1,16	0,096 \pm 0,037	2,72	-
	P6-2	193,9 \pm 4,2	0,314 \pm 0,052	2,63	0,086
	VIR-P6-2	145,1 \pm 1,36	0,076 \pm 0,029	5,75	0,152
PC-Chol-SM	-	143,4 \pm 2,55	0,101 \pm 0,060	4,63	-
	P6-2	503,6 \pm 19,8	0,716 \pm 0,165	4,19	0,13
	VIR-P6-2	161,7 \pm 2,35	0,079 \pm 0,031	6,60	0,174
PC-Chol-GalCer	-	145,9 \pm 1,18	0,066 \pm 0,039	2,17	-
	P6-2	717,2 \pm 80,61	0,787 \pm 0,226	2,99	0,417
	VIR-P6-2	253,6 \pm 2,1	0,469 \pm 0,081	3,36	0,088
PC-Chol-SM-GalCer	-	145,8 \pm 0,46	0,123 \pm 0,052	5,50	-
	P6-2	279,8 \pm 3,3	0,751 \pm 0,055	3,83	0,499
	VIR-P6-2	152,8 \pm 2,97	0,129 \pm 0,036	6,22	0,185

En general las formulaciones obtenidas con el péptido P6-2 poseen un tamaño y polidispersión mayor que las del péptido VIR-P6-2. Las diferencias en los tamaños se deben principalmente al método de obtención empleado. El péptido VIR-P6-2 se pudo homogenizar y encapsular en los LUVs eficazmente mediante el método de extrusión. Esta técnica permite obtener pequeñas poblaciones de tamaños de partículas dependiendo del tamaño de poro del filtro utilizado, siendo útil en la encapsulación de solutos lábiles, péptidos y proteínas [226]. Sin embargo, los LUVs que contenían el P6-2 se utilizó el método de sonicación realizándose 10 ciclos de calentamiento (5 minutos) seguido la sonicación (2 minutos). Este último método se empleó, debido a que previamente se ensayaron todas las composiciones de liposomas mediante el método de extrusión, obteniéndose un bajo contenido de fosfolípido y una baja concentración de péptido encapsulado. Esto se puede deber a una posible asociación del P6-2 con los liposomas, quedando la cadena peptídica tanto en el espacio acuoso interno y externo, pudiendo en este último caso dar lugar a la agregación de los liposomas dificultando su extrusión.

En todos los casos, la cantidad de péptido encapsulada con respecto al contenido de fosfatos fue suficiente para realizar los ensayos de fusión celular y susceptibilidad anti-HIV-1 que se describirán más adelante.

4.2.4 Estudio de la viabilidad celular y actividad de inhibición de los nanosistemas derivatizados con péptidos mediante la fusión celular

En este apartado se exponen los resultados obtenidos en la evaluación de la viabilidad celular y la actividad de inhibición de fusión del péptido P6-2 y sus derivados: Pal-P6-2, PLGA-PEG-NPs-P6-2 y liposomas que contienen este péptido encapsulado así como su derivado quimérico VIR-P6-2; mediante la inhibición de la formación de sincitios entre las células HeLa-env y TZM-bl. Previamente, se llevó a cabo el estudio de citotoxicidad de los péptidos, NPs PLGA-PEG y liposomas mediante el ensayo de MTT, para

descartar que la formación de sincitios en el ensayo de fusión celular fuera debido al efecto tóxico de las muestras en las células. En este caso se incubaron las células TZM-bl (25000 células/pocillo) con cantidades crecientes de los péptidos, NPs PLGA-PEG y liposomas (5-200 μ M) por triplicado, durante 24 horas. Como control positivo de viabilidad celular se reservaron pocillos sólo con células. Los valores de absorbancia obtenidos se compararon con los del control y se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 20).

Tabla 20. Citotoxicidad de los péptidos y nanosistemas estudiados.

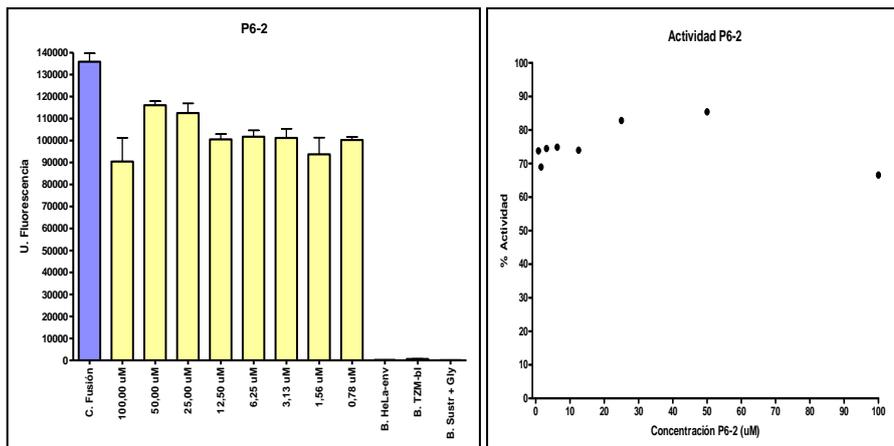
Muestras		Citotoxicidad
Péptidos	P6-2	>150 μ M
	Pal-P6-2	>100 μ M
NPs	PLGA-PEG	>120 μ M
Liposomas	PC	
	PC-Chol-SM	>120 μ M
	PC-Chol-SM- GalCer	

Ninguno de los péptidos y formulaciones mostraron una citotoxicidad apreciable para las concentraciones ensayadas, por lo que se consideraron aptas para el posterior ensayo de la inhibición de la fusión celular. Este ensayo se realizó por triplicado a diferentes concentraciones de los péptidos P6-2 y Pal-P6-2 (70 μ M hasta 0,55 μ M), partiendo de una concentración inicial de 5 mM, en ambos casos. Se incluyó en el ensayo el péptido C34 [227] como control positivo, mientras que las células en ausencia de péptidos (formación 100% de sincitios) representaron el control negativo.

Posteriormente, se realizó este mismo ensayo con los liposomas y las NPs que contienen el péptido P6-2. Los valores de fluorescencia obtenidos se

compararon con el control. Tanto en los péptidos como en las formulaciones liposomales no se pudo determinar el IC₅₀, ya que presentaban valores muy altos en los porcentajes de actividad de fusión y no se observaba una tendencia clara en la curva dosis-respuesta. A modo de ejemplo en la Figura 46 se muestran los gráficos obtenidos para los péptidos P6-2 y Pal-P6-2.

A



B

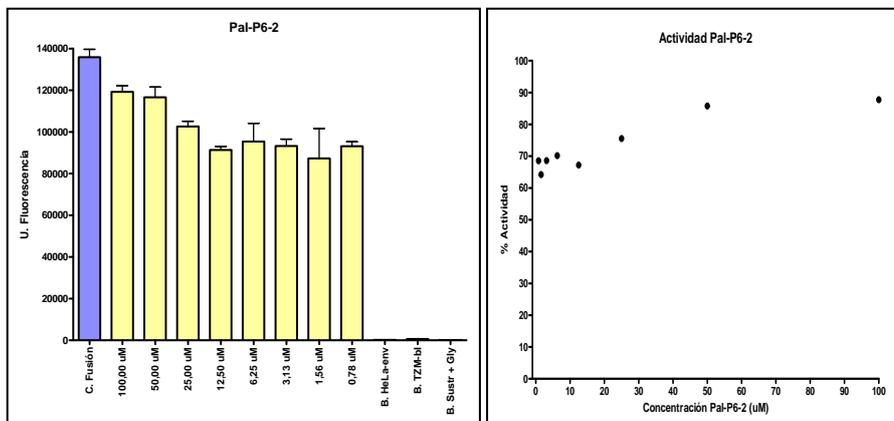


Figura 46. Determinación de la actividad de inhibición de los péptidos (A) P6-2 y (B) Pal-P6-2.

Posteriormente, se determinó la actividad de inhibición de fusión del péptido T20, el cual está descrito como potencial inhibidor de la fusión celular [228]. Además, se analizaron otras formulaciones de liposomas (PC-Chol-SM-GalCer) con el péptido T20 encapsulado y también NPs de

PLGA-PEG con el péptido T20 anclado en la superficie. Se realizaron las curvas dosis-respuesta de este péptido y las formulaciones que contienen el mismo, siguiendo el mismo procedimiento explicado anteriormente. Teniendo en cuenta la elevada actividad del péptido T20, se partió de una concentración de 0,24 mM. Los resultados obtenidos reafirman la actividad del T20 con un IC₅₀ de 62 nM, mientras que los liposomas alcanzaron valores de IC₅₀ de 516 nM y las NPs de 161 nM (Figura 47).

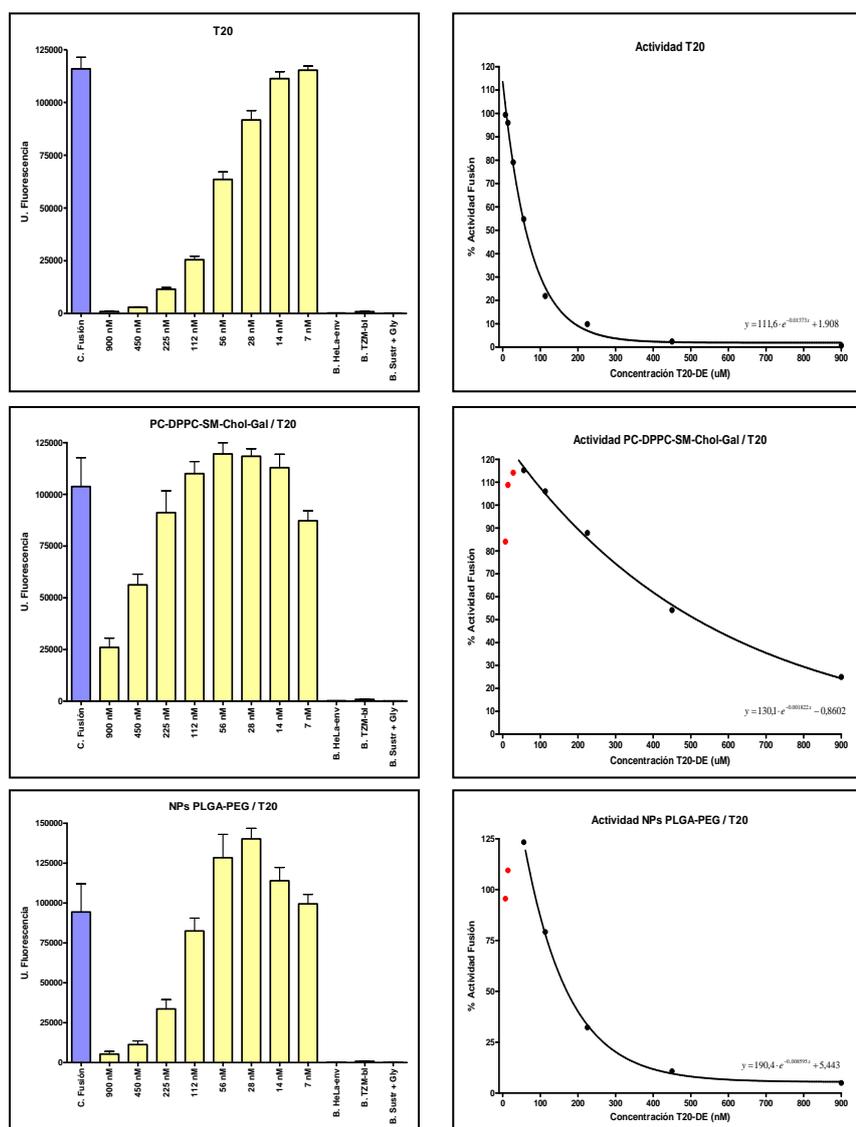


Figura 47. Determinación de la actividad inhibitoria del péptido T20, liposomas y NPs que contienen el péptido.

Es un hecho conocido que el péptido inhibidor T20 o enfurvirtide se une a la zona hidrofóbica de la región HR1 de la glicoproteína gp41 mientras se halla en su conformación extendida, impidiendo el cambio conformacional de la misma e interfiriendo así en el acercamiento y posterior fusión de la membrana vírica y celular [229, 230].

Mediante este ensayo no se observó ninguna mejora de la actividad de inhibición del T20, aunque cabe destacar que se obtuvieron mejores resultados en el caso de las NPs PLGA-PEG.

4.2.5 Estudio de la inhibición del virus HIV-1 inducida por los péptidos y nanosistemas derivatizados con péptidos

Se estudió la capacidad de los péptidos y nanosistemas derivatizados con los péptidos de inhibir la infección viral producida por el virus HIV-1. Este estudio se realizó en colaboración con el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico de Barcelona. En este ensayo se utilizaron los péptidos P6-2, Pal-P6-2 y las diferentes formulaciones lipídicas que contienen el péptido P6-2 y el VIR-P6-2, antes descrita.

Para efectuar el estudio de susceptibilidad de la replicación del HIV-1, se infectaron las células TZM-bl en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos y las formulaciones que contenían los mismos. Como control negativo de la infección se cultivaron las células en ausencia de péptidos, mientras que como control positivo del ensayo se utilizó el péptido inhibidor C34. El cálculo de la IC_{50} se realizó mediante regresión no lineal con el programa GraphPad® (V5 Prism).

En la Tabla 21 se muestran los resultados del péptido P6-2 y su derivado lipófilo (Pal-P6-2). Los resultados de este ensayo corroboran que el péptido P6-2 posee una elevada actividad inhibitoria frente al virus HIV-1. Koedel et al [213] mediante ensayos de inhibición de la fusión del virus HIV-1, utilizando el virus NL4-3BlaM-Vpr para infectar las células PBMC y

CEMx174-M7-R5; demostraron que el P6-2 previene eficientemente la entrada del virus, siendo comparable su actividad inhibitoria con el T20. Sus investigaciones atribuyen que el péptido P6-2 y otros péptidos activos de esta región de la proteína E2 del GBV-C (P4 (31-50), P4-7 (37-56) y P6 (51-70), interfieren en la replicación del virus HIV-1 a través de la interacción de estos péptidos con la partícula viral.

Merece ser destacado que estos péptidos no mostraron una mejora en los ensayos de fusión mediados por la glicoproteína gp41 y los receptores y correceptores de la entrada de la célula huésped; mientras que los resultados de susceptibilidad frente al virus HIV-1 muestran una elevada actividad inhibitoria. En este sentido, un primer resultado positivo obtenido, fue el incremento de la actividad inhibitoria del péptido Pal-P6-2 frente al virus HIV-1 alcanzando una IC₅₀ incrementada

Por otra parte, las NPs PLGA-PEG no mejoraron la actividad del péptido P6-2, resultado que coincide con los obtenidos en el ensayo de fusión celular. En el trabajo de máster de Marcos Jiménez se realizó la síntesis de diferentes derivados cíclicos del péptido P6-2, mediante la formación del puente disulfuro utilizando las Cys en posición (5-19) (LCDSPNGPWVWVPAFCQAVG), la posición (5-17) (LSDCPNGPWVWVPAFCQAVG) y un péptido control que contenía 3 Ser (LSDSPNGPWVWVPAFSQAVG) en lugar de las 3 Cys que contiene la secuencia nativa. Los ensayos de susceptibilidad de la replicación del HIV-1 de estos péptidos no mostraron ninguna mejora con respecto al P6-2. En nuestro caso, la reacción de conjugación del P6-2 en la superficie de las NPs PLGA-PEG se llevó a cabo mediante la formación del enlace tioéter entre las Cys del péptido y el grupo maleimido. En sentido general, podemos decir que los resultados de actividad antiviral obtenidos en todos los casos, demuestran que las Cys presentes en el péptido P6-2 juegan un papel importante en la actividad anti-HIV-1.

Tabla 21. Susceptibilidad anti-HIV del péptido P6-2 y sus derivados.

Formulaciones	Péptidos	IC50
-	P6-2	7 μ M
-	Pal-P6-2	4 μ M
-	VIR-P6-2	5 μ M
NPs PLGA-PEG	P6-2	> 313 μ M
Liposomas		
PC	P6-2	> 10 μ M
	VIR-P6-2	0,8 μ M
PC-Chol	P6-2	> 10 μ M
	VIR-P6-2	0,8 μ M
PC-Chol-SM	P6-2	> 9 μ M
	VIR-P6-2	1 μ M
PC-Chol-GalCer	P6-2	> 10 μ M
	VIR-P6-2	1,5 μ M
PC-Chol-SM- GalCer	P6-2	> 10 μ M
	VIR-P6-2	1 μ M

En cuanto a los liposomas ensayados con las diferentes composiciones lipídicas que contienen el P6-2, se aprecia una similitud en todos los casos, no mejorando en ninguno de ellos su actividad inhibitoria. Sin embargo, las formulaciones que contienen el péptido quimérico VIR-P6-2 presentaron una mejora de la actividad del orden de 3-6 veces con respecto al péptido libre. Esto puede deberse a un posible cambio conformacional que ocurre cuando el péptido quimérico se encuentra en medio lipídico, siendo mas

selectivo a los sitios de unión del virus, obteniéndose así una mayor capacidad inhibitoria.

4.3 Estudio de interacción de NPs PLGA-PF-HIV-1 con los péptidos E1P8 lineal y cíclico mediante el ensayo de STD-RMN

Recientemente, en nuestro grupo de investigación, se han obtenido también péptidos derivados de las glicoproteínas de envoltura E1, los cuales intervienen en la unión y/o fusión del virus HIV-1 a las células [90, 231, 232]. La región (22-39) de la proteína E1 GBV-C, denominada E1P8, ha resultado ser el mejor candidato en la inhibición de la fusión celular, debido a su elevada interacción con el PF-HIV-1 [90, 231].

Con el fin de aumentar la actividad anti-HIV-1 de este péptido, se realizaron diferentes modificaciones químicas tales como son: modificación de la estructura primaria para analizar la influencia de cada uno de los aminoácidos así como su carga neta, derivatización con ácido palmítico y ácido mirístico para obtener lipopéptidos y la síntesis de péptidos cíclicos mediante la formación de puente disulfuro [90].

En colaboración con el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico de Barcelona, se analizó la capacidad de estas secuencias peptídicas de inhibir la replicación del virus del HIV-1 en cultivos celulares. Los resultados obtenidos demostraron que el péptido E1P8 cíclico mejoró la actividad anti-HIV-1 unas 17 veces con respecto al péptido lineal [232].

De acuerdo a estos resultados se realizaron diferentes estudios para entender el mecanismo de interacción del E1P8 lineal y cíclico con el PF-HIV-1. Para ello se utilizaron métodos biofísicos, como son: el ensayo de liberación de contenidos vesiculares (*leakage*), utilizando liposomas de POPG que contienen sondas fluorescentes (ANT/DPX), dicroísmo circular y monocapas de Langmuir, que demostraron que el péptido E1P8 cíclico es un potencial inhibidor de la entrada del virus HIV-1 a la célula huésped.

Este epígrafe se dirige al estudio de interacción de los péptidos E1P8 lineal y cíclico con el PF-HIV-1, mediante el ensayo Diferencia de Transferencia de Saturación (*Saturation Transfer Difference*, STD-RMN) utilizando NPs PLGA como soporte de interacción. Este trabajo se realizó en colaboración con la Doctora Yolanda Pérez, responsable de la Unidad de Resonancia Magnética Nuclear del IQAC-CSIC.

La técnica de STD-RMN constituye una de las aproximaciones de RMN más potentes para detectar y caracterizar las interacciones receptor-ligando en disolución. Esta técnica se ha convertido en una de las más potentes y versátiles, con una creciente aplicación tanto en investigaciones académicas como en la industria farmacéutica, en estrategias para el descubrimiento, diseño, y optimización de fármacos [233-235]. En sentido general, esta técnica requiere que la macromolécula a estudiar tenga un peso molecular mayor de 10 kDa. En nuestro caso, el estudio de interacción comprende de dos péptidos de bajo peso molecular. Siguiendo un enfoque alternativo, algunos autores plantean el estudio de interacción de péptidos, si uno de ellos se encuentra unido de forma covalente a NPs PLGA-PVA de modo que actúe como receptor de elevado peso molecular [236].

4.3.1 Síntesis de las NPs PLGA-PF-HIV-1

La síntesis de las NPs de PLGA se llevó a cabo mediante el método del desplazamiento del disolvente. En este caso se utilizó como tensioactivo el PVA. Este agente estabilizante es uno de los más empleados a la hora de preparar NPs biodegradables a partir de poliésteres, debido a que previene la agregación de partículas durante los pasos post-preparativos, como pueden ser la purificación y el liofilizado [237].

El PF-HIV-1 utilizado para la obtención de NPs PLGA-PF-HIV-1, es un análogo que tiene una mayor solubilidad (R^{22} [1-23] gp41). Con este péptido se han realizado diferentes ensayos biofísicos, ya que presenta una Arg que

produce un aumento de desestabilización de las membranas lipídicas que presentan carga negativa. Los grupos carboxilo de las NPs PLGA-PVA fueron activados con NHS y posteriormente se realizó la conjugación con el péptido PLGA- PF-HIV-1[173]. Las NPs de PLGA-PVA mostraron una estrecha distribución de tamaño con un bajo índice de polidispersión. Sin embargo, la conjugación del péptido PF-HIV-1 en la superficie de las NPs, provocó un incremento en el tamaño de partícula con una elevada polidispersión (Figura 48 y Tabla 22). Otros autores han estudiado la interacción del PF-HIV-1 con liposomas, demostrando que este péptido promueve la agregación y desestabilización de las membranas vesiculares [231, 238].

En teoría, valores positivos elevados de Z_{pot} tienden a estabilizar la suspensión de NPs [178]. En este caso, la repulsión electrostática entre las partículas es muy pequeña, causando la agregación de las NPs.

La concentración del PF-HIV-1 se determinó indirectamente, cuantificando la cantidad de péptido libre en solución. La concentración de péptido obtenida fue suficiente para facilitar el estudio de interacción con el péptido E1P8 cíclico mediante estudios de STD-RMN.

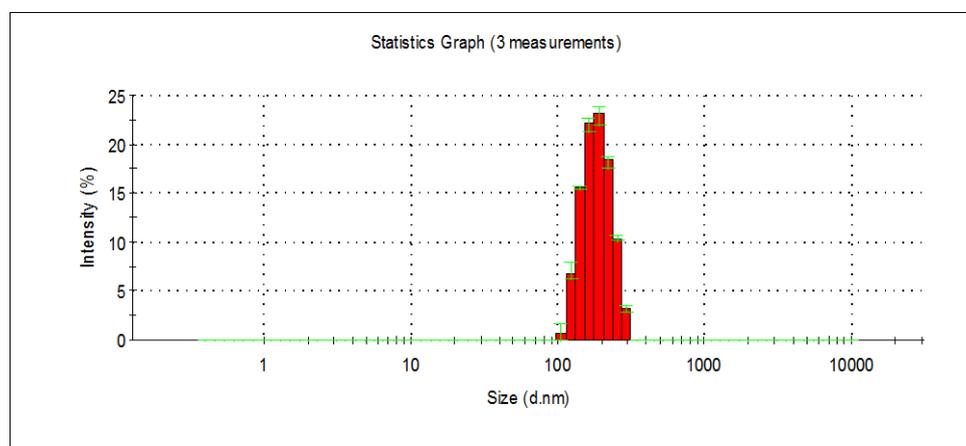
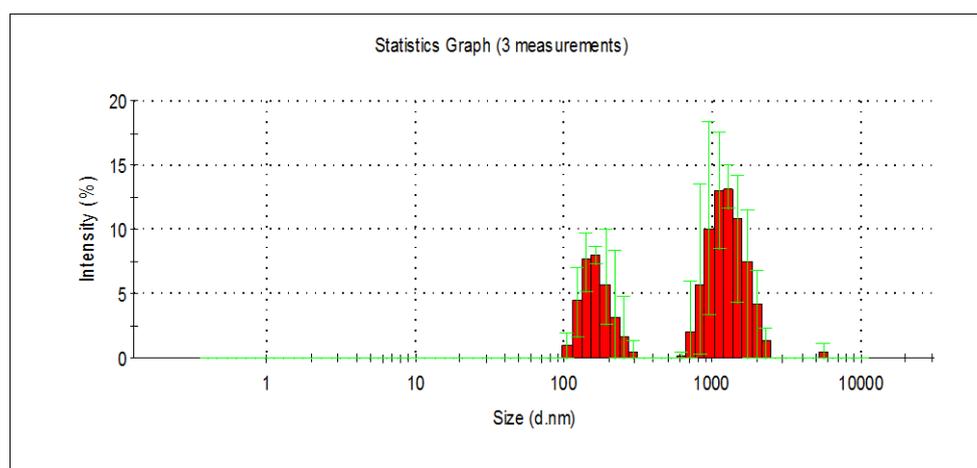
A**B**

Figura 48. Distribución hidrodinámica del tamaño de las NPs PLGA (A) y PLGA-PF-HIV-1(B) expresadas en diámetro a una temperatura 25°C, media± SD, n=3.

Tabla 22. Propiedades físico-químicas de las NPs de PLGA que contienen el péptido PF-HIV-1.

Composición NPs	Tamaño ± SD (nm)	PI ± SD	Z _{pot} ± SD (mV)	EC ± SD (%)
PLGA	179,0 ± 2,1	0,024 ± 0,007	-8,04 ± 1,3	-
PLGA- PF-HIV-1	617,6 ± 1,8	0,768 ± 0,056	1,45 ± 0,3	36,1 ± 4,2

4.3.2 Ensayo de STD-RMN

Mediante el experimento de STD-RMN se estudió la interacción a nivel molecular entre el FP-HIV-1 unido a NPs PLGA y diferentes ligandos peptídicos (Tabla 23).

Tabla 23. Ligandos peptídicos utilizados en el ensayo de STD-RMN.

Péptido	Secuencia	Carga neta
E1P8	APEDIGFCLEGGCLVALG	-3
E1P32	SGVLTVGVALTRRVYPVP	+2
VIR-576	LEAIPCSIPPEFLFGKPFVF	-1

Como control positivo se empleó el péptido inhibidor VIR-576 (VIR), descrito previamente [224], y como control negativo se utilizó el péptido E1P32. Según los estudios biofísicos previamente realizados en nuestro laboratorio, este último no interacciona con el PF-HIV-1.

La cantidad de PF-HIV-1 en las NPs de PLGA se confirmó mediante RMN-¹H y se expresó como el porcentaje en masa de acuerdo a la siguiente ecuación (Ecuación 18) obteniéndose un valor de $27,0 \pm 3,5$ %:

$$W_{\text{PF-HIV-1}} = 100 \left(\frac{M_{\text{PF}} (I_{\text{PF}}(\delta=7,2)/10)}{M_{\text{PLGA}} (I_{\text{PLGA}}(\text{CH}, \delta=5,2))} \right) \quad (\text{Ecuación 18})$$

Donde:

M_{PF} y M_{PLGA} son los pesos moleculares del PF-HIV-1 (2140,11 g/mol) y el PLGA (130 g/mol).

I_{PF} es la integral de la señal correspondiente a la fenilalanina (7,2 ppm).

I_{PLGA} es la integral de la señal correspondiente a los grupos -CH del PLGA (5,2 ppm).

Previamente al ensayo de STD-RMN, las NPs PLGA-PF-HIV-1 se resuspendieron en agua, no observándose ninguna señal de las mismas (Figura 49). Esto nos permitió estudiar la interacción entre el péptido PF-HIV-1 contenido en las NPs y los péptidos ligandos (E1P8 cíclico, E1P32 y VIR) sin interferencias de las resonancias de las NPs.

En la Figura 50 se muestran los espectros de STD donde se observan claramente mejoras en las señales de todos los residuos del péptido. Además se realizaron espectros controles del péptido EIP8 cíclico y las NPs PLGA para confirmar la especificidad del efecto STD.

También se estudió la interacción con los péptidos VIR (control positivo) (Figura 51) y E1P32 (control negativo) (Figura 52). Este último péptido ha sido probado con anterioridad y posee una carga neta negativa a diferencia del E1P8. En ambos casos, no se observó ninguna interacción entre las NPs PLGA-PF-HIV-1 y ambos péptidos. En el caso del péptido VIR, una posible explicación es su alta hidrofobicidad, lo que puede afectar a las mediciones de STD-RMN en presencia de las NPs PLGA-PF-HIV-1, debido a que este péptido no permanece en solución.

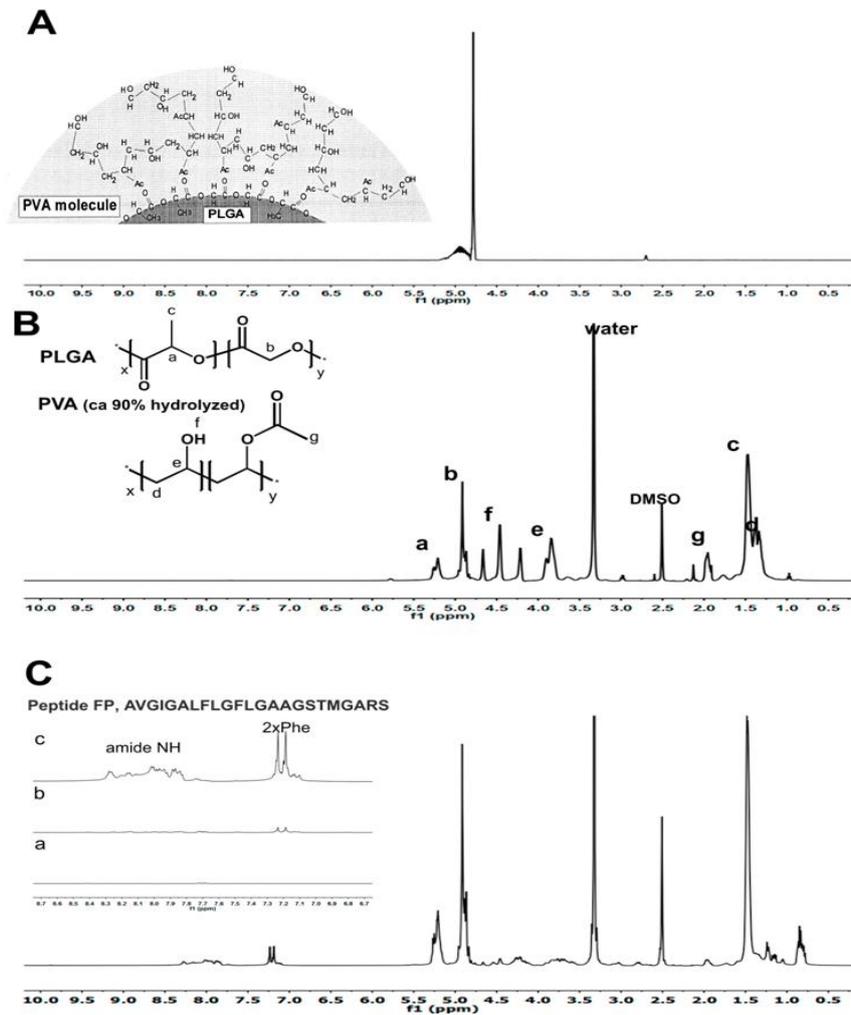


Figura 49. Espectro RMN-¹H de las NPs PLGA-PF-HIV-1 (4 mg) disueltas en 90% / 10% H₂O/D₂O (A). Espectro RMN-¹H de las NPs PLGA (8 mg) disueltas en DMSO-d₆ (B). La asignación de desplazamiento químico fue confirmada mediante los espectros: 2D gCOSY, gHSQC, gHMBC y gH2BC. Espectro RMN-¹H de las NPs PLGA-PF-HIV-1 (4mg) disueltas en DMSO-d₆ (C). Expansión de la región aromática para las NPs PLGA (a) y NPs PLGA-PF-HIV-1 ((b) menor y (c) mayor contenido de péptido PF-HIV-1).

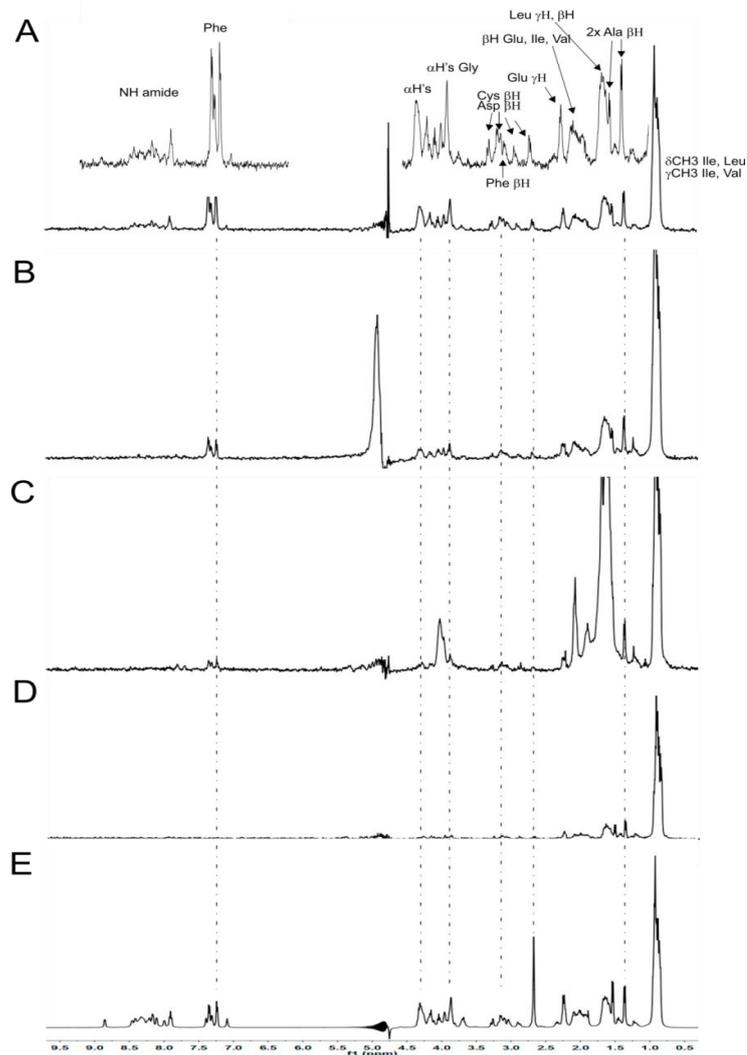


Figura 50. Análisis STD de la interacción entre E1P8 cíclico (0,75 mM) y las NPs PLGA-PF-HIV-1 (1,3 mg). Los espectros de STD de E1P8 cíclico y las NPs PLGA-PF-HIV-1 (w_{PF} : 27%, 12:1 relación molar) (A), los espectros de STD de E1P8 cíclico y las NPs PLGA-PF-HIV-1 (w_{PF} : 1,7%, 40:1 relación molar) (B), los espectros de STD de E1P8 cíclico y las NPs de PLGA (C), los espectros de STD de 0,75 mM E1P8 cíclico, (E) referencia de STD (*off resonance*) espectros de 0,75 mM E1P8 cíclico (PBS, 10% D₂O) (D).

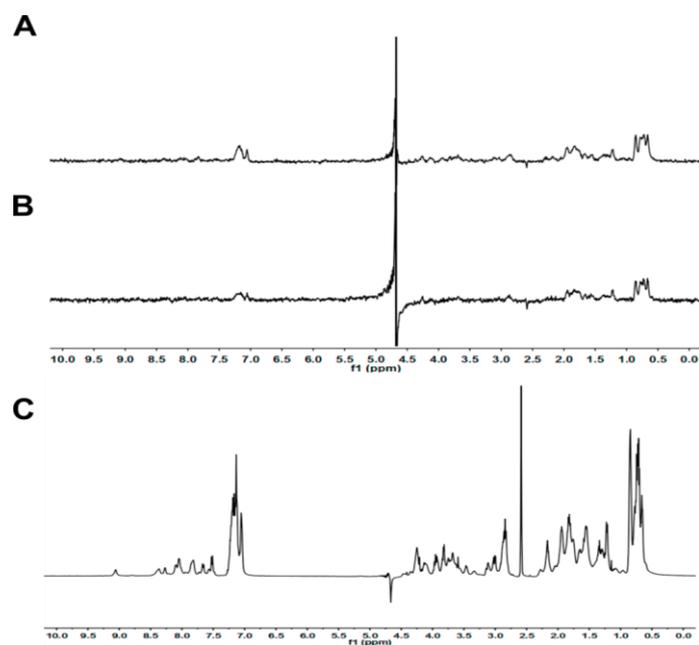


Figura 51. Espectros de STD para las concentraciones: 0,9 mM (A) y 0,75 mM (B) de VIR con las NPs PLGA-PF-HIV-1 (27 % PF-HIV-1, relación molar 12:1). Espectros de referencia de STD (*off resonance*) del VIR y las NPs PLGA-PF-HIV-1 (en PBS, 10% de DMSO-d6) (C).

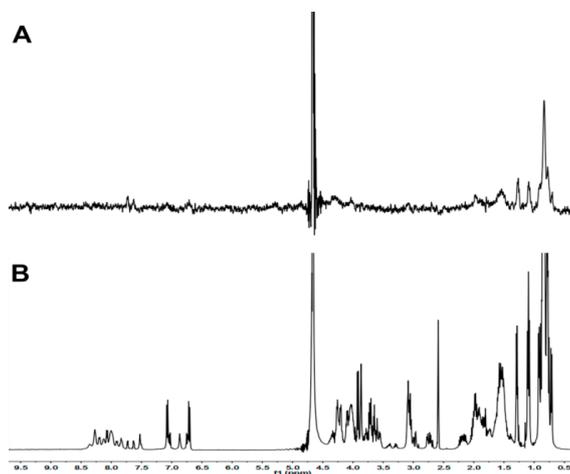


Figura 52. Espectros de STD del péptido E1P32 y las NPs PLGA-PF-HIV-1 (27 % PF-HIV-1, relación molar 12:1) (A), Espectro RMN-¹H del péptido E1P32 (0,75 mM) (B).

El principal problema para los estudios de interacción mediante STD-RMN de péptidos con NPs que contienen un ligando peptídico, es la similitud de las resonancias de los péptidos. La precisión en la selección del punto de irradiación y la adquisición de varios espectros con los controles nos pudo permitir obtener información específica acerca de la interacción de ambos péptidos. En la Figura 50A se observa que el efecto de STD es mayor cuando hay un elevado contenido PF-HIV-1 en las NPs (a pesar de que hay un menor contenido de péptido ligando en exceso) y más alto que la muestra con solo E1P8 cíclico o con NPs en blanco (PLGA). El aumento de la intensidad de las señales, se traduce como una escala de proximidad de las distintas zonas de la estructura peptídica (E1P8 cíclico) a las NPs PLGA-PF-HIV-1, manifestando que existe interacción a nivel atómico. Todos estos resultados indican que el péptido E1P8 cíclico es capaz de interactuar con el PF-HIV-1, abriendo nuevas perspectivas para el diseño de nuevos péptidos derivados del GBV-C como inhibidores de la entrada del HIV-1 a la célula.

5. CONCLUSIONES

- ✓ Los péptidos lineales (POD y Tat-HIV) se sintetizaron satisfactoriamente siguiendo la metodología de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS). La caracterización analítica por HPLC-RP y espectrometría de masas (UPLC/EM-MS y MALDI-TOF) confirmó que los péptidos corresponden a las secuencias peptídicas deseadas.
- ✓ Las NPs del tipo PLGA-NPs-PEG-Péptido y PLGA-PEG-Péptido-NPs se obtuvieron mediante el método de desplazamiento del solvente. Las PLGA-PEG-Péptido-NPs presentaron mayor eficiencia de pegilación y mayor grado de funcionalización peptídico.
- ✓ Todas las NPs mostraron un tamaño medio apropiado para la administración oftálmica (menor de 300 nm), una morfología esférica y un índice de polidispersidad menor de 0,1; lo que se corresponde con sistemas monodispersos. Las PLGA-PEG-Péptido-NPs mostraron un tamaño menor que las PLGA-NPs-PEG-Péptido, una mayor eficiencia de asociación del FB y una liberación más sostenida siguiendo una cinética de segundo orden.
- ✓ Mediante la técnica de espectroscopía FTIR se pudo comprobar que las NPs PLGA, PLGA-PEG-NPs y PLGA-PEG-Péptido-NPs no interaccionan con el FB.
- ✓ Las PLGA-PEG-Péptido-NPs son estables a una temperatura de 4°C mientras que a 25°C formaron agregados en un tiempo de 15 días.
- ✓ Las PLGA-PEG-Péptido-NPs no fueron tóxicas y presentaron una óptima tolerancia ocular *in vitro* (HET-CAM) e *in vivo* (Test de Draize).
- ✓ Los péptidos POD y Tat-HIV proporcionaron a las NPs una densidad de carga positiva que facilitó la mucoadhesión ocular, siendo las PLGA-PEG-POD-NPs las que presentaron mayor interacción con el epitelio corneal obteniéndose una óptima eficacia antiinflamatoria.

- ✓ El péptido P6-2 y su derivado lipófilo (Pal-P6-2) fueron sintetizados satisfactoriamente mediante SPPS. El Pal-P6-2 incrementó la actividad anti- HIV-1 aproximadamente 2 veces.
- ✓ Las PLGA-PEG-NPs-P6-2 se obtuvieron mediante el método del desplazamiento del disolvente. Las partículas fueron homogéneas con un grado de funcionalización peptídico mayor de un 9 %, sin embargo no mejoraron la actividad anti-HIV-1 del péptido libre.
- ✓ Los LUV que contienen los péptidos P6-2 y VIR-P6-2 presentaron una distribución homogénea en el tamaño de partícula. Los resultados de actividad anti-HIV-1 indicaron una actividad incrementada del orden de 3-6 veces para el VIR-P6-2.
- ✓ La unión del péptido PF-HIV-1 a las NPs de PLGA provocó un incremento en el tamaño de partícula con una elevada polidispersión. Estas NPs PLGA- PF-HIV-1 fueron útiles para demostrar mediante el ensayo de STD-RMN, la interacción entre el péptido E1P8 cíclico y el PF-HIV-1.
- ✓ Los nanosistemas peptídicos seleccionados constituyeron una herramienta útil tanto para aumentar la biodisponibilidad y actividad de diferentes moléculas con acción terapéutica, como para ser empleados en ensayos biofísicos, idóneos para el estudio de la interacción péptido-péptido.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Feynman RP. There's plenty of room at the bottom. *Engineering and science*. 1960;23:22-36.
- [2] Acharya S, Dilnawaz F, Sahoo SK. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. *Biomaterials*. 2009;30:5737-50.
- [3] Wang H, Zhao Y, Wu Y, Hu Y-l, Nan K, Nie G, et al. Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32:8281-90.
- [4] Gu G, Xia H, Hu Q, Liu Z, Jiang M, Kang T, et al. PEG-co-PCL nanoparticles modified with MMP-2/9 activatable low molecular weight protamine for enhanced targeted glioblastoma therapy. *Biomaterials*. 2013;34:196-208.
- [5] BarathManiKanth S, Kalishwaralal K, Sriram M, Pandian S, Youn H, Eom S, et al. Research anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *J Nanotechnol*. 2010;8:16.
- [6] Damgé C, Maincent P, Ubrich N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *Journal of Controlled Release*. 2007;117:163-70.
- [7] Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KPS, Paramakrishnan N, Suresh B. Poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2008;1200:159-68.
- [8] Hu K, Shi Y, Jiang W, Han J, Huang S, Jiang X. Lactoferrin conjugated PEG-PLGA nanoparticles for brain delivery: preparation, characterization and efficacy in Parkinson's disease. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;415:273-83.
- [9] Feng S-S, Zeng W, Teng Lim Y, Zhao L, Yin Win K, Oakley R, et al. Vitamin E TPGS-emulsified poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for cardiovascular restenosis treatment. 2007.
- [10] Sun D, Zhuang X, Xiang X, Liu Y, Zhang S, Liu C, et al. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Molecular Therapy*. 2010;18:1606-14.
- [11] Couvreur P, Fattal E, Andreumont A. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. *Pharmaceutical research*. 1991;8:1079-86.
- [12] Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;75:1-18.
- [13] Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) devices. *Biomaterials*. 2000;21:2475-90.

- [14] Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64:72-82.
- [15] Bittner B, Ronneberger B, Zange R, Volland C, Anderson J, Kissel T. Bovine serum albumin loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres: the influence of polymer purity on particle characteristics. *Journal of microencapsulation*. 1998;15:495-514.
- [16] Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, Shakesheff KM. Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical reviews*. 1999;99:3181-98.
- [17] Fonseca C, Simoes S, Gaspar R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *Journal of Controlled Release*. 2002;83:273-86.
- [18] Dillen K, Vandervoort J, Van den Mooter G, Verheyden L, Ludwig A. Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;275:171-87.
- [19] Ayalasangajula SP, Kompella UB. Subconjunctivally administered celecoxib-PLGA microparticles sustain retinal drug levels and alleviate diabetes-induced oxidative stress in a rat model. *Eur J Pharmacol*. 2005;511:191-8.
- [20] Zambaux M, Bonneaux F, Gref R, Maincent P, Dellacherie E, Alonso M, et al. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *Journal of Controlled Release*. 1998;50:31-40.
- [21] Singer S, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Day and Good Membranes and viruses in immunopathology*. 1972:7-47.
- [22] Skalicky SE, Goldberg I, McCluskey P. Ocular surface disease and quality of life in patients with glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2012;153:1-9. e2.
- [23] Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. Age-related macular degeneration. *The Lancet*. 2012;379:1728-38.
- [24] Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes care*. 2012;DC_111909.
- [25] Chang JR, Koo E, Agrón E, Hallak J, Clemons T, Azar D, et al. Risk Factors Associated with Incident Cataracts and Cataract Surgery in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS): AREDS Report Number 32. *Ophthalmology*. 2011;118:2113-9.
- [26] Indaram M, Agrón E, Clemons TE, Sperduto RD, Wong WT, Ferris Iii FL, et al. Changes in Lens Opacities on the Age-Related Eye Disease Study Grading Scale Predict Progression to Cataract Surgery and Vision Loss: Age-Related Eye Disease Study Report No. 34. *Ophthalmology*.

- [27] Ahuja M, Dhake AS, Sharma SK, Majumdar DK. Topical ocular delivery of NSAIDs. *The AAPS journal*. 2008;10:229-41.
- [28] Brown RM, Roberts CW. Preoperative and postoperative use of nonsteroidal anti inflammatory drugs in cataract surgery. *Insight - the Journal of the American Society of Ophthalmic Registered Nurses*. 1996;21:13-6.
- [29] Brown RM, Roberts CW. Preoperative and postoperative use of nonsteroidal anti inflammatory drugs in cataract surgery. *Insight-the Journal of the American Society of Ophthalmic Registered Nurses*. 1996;21:13-6.
- [30] Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2008;13:144-51.
- [31] Bochot A, Fattal E, Gulik A, Couarraze G, Couvreur P. Liposomes dispersed within a thermosensitive gel: a new dosage form for ocular delivery of oligonucleotides. *Pharmaceutical research*. 1998;15:1364-9.
- [32] El-Gazayerly ON, Hikal AH. Preparation and evaluation of acetazolamide liposomes as an ocular delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997;158:121-7.
- [33] Durrani A, Davies N, Thomas M, Kellaway I. Pilocarpine bioavailability from a mucoadhesive liposomal ophthalmic drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. 1992;88:409-15.
- [34] Ahmed I, Patton TF. Disposition of timolol and inulin in the rabbit eye following corneal versus non-corneal absorption. *International Journal of Pharmaceutics*. 1987;38:9-21.
- [35] Saettone M, Perini G, Carafa M, Santucci E, Alhaique F. Non-ionic surfactant vesicles as ophthalmic carriers for cyclopentolate. A preliminary evaluation. *STP Pharma Sci*. 1996;6:94-8.
- [36] Vyas S, Mysore N, Jaitely V, Venkatesan N. Discoidal niosome based controlled ocular delivery of timolol maleate. *Die Pharmazie*. 1998;53:466-9.
- [37] Irache J, Merodio M, Arnedo A, Camapanero M, Mirshahi M, Espuelas S. Albumin nanoparticles for the intravitreal delivery of anticytomegaloviral drugs. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2005;5:293-305.
- [38] Garty N, Lusky M, Zalish M, Rachmiel R, Greenbaum A, Desatnik H, et al. Pilocarpine in submicron emulsion formulation for treatment of ocular hypertension-a phase-ii clinical-trial. *Investigative ophthalmology & visual science: Lippincott-raven publ 227 east Washington sq, Philadelphia, pa 19106; 1994. p. 2175-*.
- [39] Upendra Kumar S, Amita V, Sunil Kuamr P, Himanshu P, Avinash CP. In vitro, in vivo and pharmacokinetic assessment of amikacin sulphate laden polymeric nanoparticles meant for controlled ocular drug delivery. *Applied Nanoscience*. 2014.
- [40] Harmia T, Speiser P, Kreuter J. A solid colloidal drug delivery system for the eye: encapsulation of pilocarpin in nanoparticles. *Journal of microencapsulation*. 1986;3:3-12.

- [41] Pignatello R, Bucolo C, Spedalieri G, Maltese A, Puglisi G. Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application. *Biomaterials*. 2002;23:3247-55.
- [42] De Campos AM, Sánchez A, Alonso MaJ. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;224:159-68.
- [43] De Campos AM, Sánchez A, Gref R, Calvo P, Alonso MaJ. The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003;20:73-81.
- [44] Fialho SL, Silva-Cunha D. New vehicle based on a microemulsion for topical ocular administration of dexamethasone. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2004;32:626-32.
- [45] Vandamme TF, Brobeck L. Poly (amidoamine) dendrimers as ophthalmic vehicles for ocular delivery of pilocarpine nitrate and tropicamide. *Journal of Controlled Release*. 2005;102:23-38.
- [46] Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar R. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *Aaps Pharmscitech*. 2005;6:E329-E57.
- [47] Kristinsson JK, Fridriksdóttir H, Thorisdóttir S, Sigurdardóttir AM, Stefansson E, Loftsson T. Dexamethasone-cyclodextrin-polymer co-complexes in aqueous eye drops. *Aqueous humor pharmacokinetics in humans. Investigative ophthalmology & visual science*. 1996;37:1199-203.
- [48] Vega E, Egea MA, Valls O, Espina M, García ML. Flurbiprofen loaded biodegradable nanoparticles for ophthalmic administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;95:2393-405.
- [49] Vega E, Gamisans F, García ML, Chauvet A, Lacoulonche F, Egea MA. PLGA nanospheres for the ocular delivery of flurbiprofen: Drug release and interactions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97:5306-17.
- [50] Araújo J, Vega E, Lopes C, Egea MA, Garcia ML, Souto EB. Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;72:48-56.
- [51] Lindgren M, Hällbrink M, Prochiantz A, Langel Ü. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21:99-103.
- [52] Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 1988;55:1189-93.
- [53] Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*. 1994;269:10444-50.
- [54] Futaki S. Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57:547-58.

- [55] Morris MC, Deshayes S, Heitz F, Divita G. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol Cell*. 2008;100:201-17.
- [56] Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. *Endocytosis* 1997.
- [57] Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*. 1997;272:16010-7.
- [58] Ziegler A, Seelig J. Interaction of the protein transduction domain of HIV-1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters. *Biophys J*. 2004;86:254-63.
- [59] Patel LN, Zaro JL, Shen W-C. Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical research*. 2007;24:1977-92.
- [60] Tünnemann G, Martin RM, Haupt S, Patsch C, Edenhofer F, Cardoso MC. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *The FASEB journal*. 2006;20:1775-84.
- [61] Johnson LN, Cashman SM, Kumar-Singh R. Cell-penetrating Peptide for Enhanced Delivery of Nucleic Acids and Drugs to Ocular Tissues Including Retina and Cornea. *Mol Ther*. 2007;16:107-14.
- [62] Johnson LN, Cashman SM, Read SP, Kumar-Singh R. Cell penetrating peptide POD mediates delivery of recombinant proteins to retina, cornea and skin. *Vision Research*. 2010;50:686-97.
- [63] Read SP, Cashman SM, Kumar-Singh R. A poly(ethylene) glycolylated peptide for ocular delivery compacts DNA into nanoparticles for gene delivery to post-mitotic tissues in vivo. *The Journal of Gene Medicine*. 2010;12:86-96.
- [64] Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature reviews drug discovery*. 2006;5:123-32.
- [65] Pieramici DJ, Avery RL. Ranibizumab: treatment in patients with neovascular age-related macular degeneration. 2006.
- [66] Shell JW. Ophthalmic drug delivery systems. *Survey of ophthalmology*. 1984;29:117-28.
- [67] Jackson TL, Eykyn SJ, Graham EM, Stanford MR. Endogenous bacterial endophthalmitis: a 17-year prospective series and review of 267 reported cases. *Survey of ophthalmology*. 2003;48:403-23.
- [68] Read SP, Cashman SM, Kumar-Singh R. POD nanoparticles expressing GDNF provide structural and functional rescue of light-induced retinal degeneration in an adult mouse. *Molecular Therapy*. 2010;18:1917-26.
- [69] Binder C, Cashman SM, Kumar-Singh R. Extended Duration of Transgene Expression from Pegylated POD Nanoparticles Enables Attenuation of Photoreceptor Degeneration. *PloS one*. 2013;8:e82295.

- [70] Cancer IAFRo. Hepatitis viruses: International Agency for the Research on Cancer; 1993.
- [71] Leary TP, Muerhoff S, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Erker JC, Chalmers ML, et al. Sequence and genomic organization of GBV-C: A novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol.* 1996;48:60-7.
- [72] Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys : i. transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *The Journal of Experimental Medicine.* 1967;125:673-88.
- [73] Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ, Erker JC, et al. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol.* 1995;69:5621-30.
- [74] Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *The Journal of General Virology.* 2011;92:233-46.
- [75] Herrera JP, Gamboa G. Biología molecular en medicina. VI. La PCR en la práctica clínica. *Rev invest clín.* 1996;48:479-82.
- [76] Xiang J, Daniels K, Soll D, Schmidt W, LaBrecque D, Stapleton J. Visualization and characterization of GB virus-C particles: evidence for a nucleocapsid. *J Viral Hepatitis.* 1999;6:16-22.
- [77] De Lamballerie X, Charrel R, Dussol B. Hepatitis GB virus C in patients on hemodialysis. *New Engl J Med.* 1996;334:1549-.
- [78] Wang J-T, Tsai F-C, Lee C-Z, Chen P-J, Sheu J-C, Wang T-H, et al. A prospective study of transfusion-transmitted GB virus C infection: similar frequency but different clinical presentation compared with hepatitis C virus. *Blood.* 1996;88:1881-6.
- [79] Tagariello G, Infantolino D, Biasin MR, Davoli PG, Traldi A. Hepatitis G viral RNA in Italian haemophiliacs with and without hepatitis C infection. *The Lancet.* 1996;348:760-1.
- [80] Moaven LD, Tennakoon PS, Bowden DS, Locarnini SA. Mother-to-baby transmission of hepatitis G virus. *The Medical journal of Australia.* 1996;165:84-5.
- [81] Yoshida M, Okamoto H, Mishiro S. Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fulminant hepatitis of unknown aetiology. *The Lancet.* 1995;346:1131-2.
- [82] Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *New Engl J Med.* 2001;345:715-24.
- [83] Xiang J, Wünschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *New Engl J Med.* 2001;345:707-14.

- [84] Xiang J, McLinden JH, Kaufman TM, Mohr EL, Bhattarai N, Chang Q, et al. Characterization of a peptide domain within the GB virus C envelope glycoprotein (E2) that inhibits HIV replication. *Virology*. 2012;430:53-62.
- [85] Mohr EL, Xiang J, McLinden JH, Kaufman TM, Chang Q, Montefiori DC, et al. GB virus type C envelope protein E2 elicits antibodies that react with a cellular antigen on HIV-1 particles and neutralize diverse HIV-1 isolates. *The Journal of Immunology*. 2010;185:4496-505.
- [86] Tillmann HL, Manns MP. GB virus-C infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Antiviral Res*. 2001;52:83-90.
- [87] Herrera E, Gomara MJ, Mazzini S, Ragg E, Haro I. Synthetic peptides of hepatitis G virus (GBV-C/HGV) in the selection of putative peptide inhibitors of the HIV-1 fusion peptide. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009;113:7383-91.
- [88] Herrera E, Tenckhoff S, Gómara MaJ, Galatola R, Bleda MaJ, Gil C, et al. Effect of synthetic peptides belonging to E2 envelope protein of GB virus C on human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Med Chem*. 2010;53:6054-63.
- [89] Haro I, Gómara M, Galatola R, Domènech O, Prat J, Girona V, et al. Study of the inhibition capacity of an 18-mer peptide domain of GBV-C virus on gp41-FP HIV-1 activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2011;1808:1567-73.
- [90] J Gómara M, Galatola R, Gutiérrez A, C Gimeno M, M Gatell J, Sánchez-Merino V, et al. HIV-1 Inhibiting Capacity of Novel Forms of Presentation of GB Virus C Peptide Domains is Enhanced by Coordination to Gold Compounds. *Curr Med Chem*. 2014;21:238-50.
- [91] Gómara MJ, Fernández L, Pérez T, Tenckhoff S, Casanovas A, Tillmann HL, et al. Diagnostic Value of Anti-GBV-C Antibodies in HIV-Infected Patients. *Chemical biology & drug design*. 2011;78:277-82.
- [92] Gómara MJ, Fernández L, Pérez T, Ercilla G, Haro I. Assessment of synthetic chimeric multiple antigenic peptides for diagnosis of GB virus C infection. *Analytical Biochemistry*. 2010;396:51-8.
- [93] Fernández L, Chan WC, Egido M, Gómara MJ, Haro I. Synthetic peptides derived from an N-terminal domain of the E2 protein of GB virus C in the study of GBV-C/HIV-1 co-infection. *Journal of Peptide Science*. 2012;18:326-35.
- [94] Ojewole E, Mackraj I, Naidoo P, Govender T. Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70:697-710.
- [95] Sharma P, Garg S. Pure drug and polymer based nanotechnologies for the improved solubility, stability, bioavailability and targeting of anti-HIV drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62:491-502.
- [96] Kovochich M, Marsden MD, Zack JA. Activation of latent HIV using drug-loaded nanoparticles. *PloS one*. 2011;6:e18270.

- [97] Schäfer V, von Briesen H, Andreesen R, Steffan A-M, Royer C, Tröster S, et al. Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug targeting. *Pharmaceutical research*. 1992;9:541-6.
- [98] Bender A, Schäfer V, Steffan A, Royer C, Kreuter J, Rüksamen-Waigmann H, et al. Inhibition of HIV in vitro by antiviral drug-targeting using nanoparticles. *Res Virol*. 1994;145:215-20.
- [99] Mainardes RM, Gremião MPD, Brunetti IL, Da Fonseca LM, Khalil NM. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: Influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;98:257-67.
- [100] Ramana LN, Sharma S, Sethuraman S, Ranga U, Krishnan UM. Investigation on the stability of saquinavir loaded liposomes: implication on stealth, release characteristics and cytotoxicity. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;431:120-9.
- [101] Szebeni J, Wahl SM, Betageri GV, Wahl LM, gartner s, popovic m, et al. Inhibition of HIV-1 in Monocyte/Macrophage Cultures by 2', 3'-Dideoxycytidine-5'-Triphosphate, Free and in Liposomes*. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1990;6:691-702.
- [102] van Meer G, de Kroon AI. Lipid map of the mammalian cell. *J Cell Sci*. 2011;124:5-8.
- [103] Vance D, Vance J. Physical properties and functional roles of lipids in membranes. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 1996;31.
- [104] Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews molecular cell biology*. 2008;9:112-24.
- [105] Feigenson GW. Phase boundaries and biological membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2007;36:63.
- [106] Hao M, Lin SX, Karylowski OJ, Wüstner D, McGraw TE, Maxfield FR. Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle. *J Biol Chem*. 2002;277:609-17.
- [107] Van Meer G. Lipids of the Golgi membrane. *Trends Cell Biol*. 1998;8:29-33.
- [108] Munro S. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*. 2003;115:377-88.
- [109] Simons K, Vaz WL. Model systems, lipid rafts, and cell membranes 1. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2004;33:269-95.
- [110] Rietveld A, Simons K. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. 1998;1376:467-79.
- [111] Almeida PF, Pokorny A, Hinderliter A. Thermodynamics of membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2005;1720:1-13.

- [112] Jan J-T, Chatterjee S, Griffin DE. Sindbis virus entry into cells triggers apoptosis by activating sphingomyelinase, leading to the release of ceramide. *J Virol.* 2000;74:6425-32.
- [113] Bollinger CR, Teichgräber V, Gulbins E. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.* 2005;1746:284-94.
- [114] Mooney JJ, Dalrymple JM, Alving C, Russell P. Interaction of Sindbis virus with liposomal model membranes. *J Virol.* 1975;15:225-31.
- [115] Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997;387:569-72.
- [116] Pike LJ. Lipid rafts bringing order to chaos. *J Lipid Res.* 2003;44:655-67.
- [117] Rajendran L, Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci.* 2005;118:1099-102.
- [118] Yu X, Yuan X, Matsuda Z, Lee T, Essex M. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J Virol.* 1992;66:4966-71.
- [119] Freed EO, Martin MA. Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J Virol.* 1995;69:1984-9.
- [120] Aloia RC, Tian H, Jensen FC. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1993;90:5181-5.
- [121] Chernomordik L, Chanturiya A, Suss-Toby E, Nora E, Zimmerberg J. An amphipathic peptide from the C-terminal region of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein causes pore formation in membranes. *J Virol.* 1994;68:7115-23.
- [122] Trommeshäuser D, Krol S, Bergelson LD, Galla H-J. The effect of lipid composition and physical state of phospholipid monolayer on the binding and incorporation of a basic amphipathic peptide from the C-terminal region of the HIV envelope protein gp41. *Chemistry and physics of lipids.* 2000;107:83-92.
- [123] Callahan MK, Popernack PM, Tsutsui S, Truong L, Schlegel RA, Henderson AJ. Phosphatidylserine on HIV envelope is a cofactor for infection of monocytic cells. *The Journal of Immunology.* 2003;170:4840-5.
- [124] Vincent N, Genin C, Malvoisin E. Identification of a conserved domain of the HIV-1 transmembrane protein gp41 which interacts with cholesteryl groups. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes.* 2002;1567:157-64.
- [125] Sáez-Cirión A, Arrondo JL, Gómara MJ, Lorizate M, Iloro I, Melikyan G, et al. Structural and functional roles of HIV-1 gp41 pretransmembrane sequence segmentation. *Biophys J.* 2003;85:3769-80.

- [126] Long D, Berson JF, Cook DG, Doms RW. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 gp120 binding to liposomes containing galactosylceramide. *J Virol.* 1994;68:5890-8.
- [127] Gadella B, Hammache D, Pieroni G, Colenbrander B, van Golde L, Fantini J. Glycolipids as potential binding sites for HIV: topology in the sperm plasma membrane in relation to the regulation of membrane fusion. *J Reprod Immunol.* 1998;41:233-53.
- [128] Broder CC, Berger EA. CD4 molecules with a diversity of mutations encompassing the CDR3 region efficiently support human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion. *J Virol.* 1993;67:913-26.
- [129] Brand D, Srinivasan K, Sodroski J. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 entry in the CDR2 loop of the CD4 glycoprotein. *J Virol.* 1995;69:166-71.
- [130] Alving CR, Beck Z, Karasavva N, Matyas GR, Rao M. HIV-1, lipid rafts, and antibodies to liposomes: implications for anti-viral-neutralizing antibodies (Review). *Mol Membr Biol.* 2006;23:453-65.
- [131] Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc.* 1963;85:2149-54.
- [132] Solid phase peptide synthesis; a practical approach: E. Atherton and R. Sheppard. 203 pp. 1989. IRL/Oxford University Press, Oxford. \$59 cloth. \$38 paperback. *International Journal of Biochemistry.* 1990;22:1503.
- [133] Kaiser E, Colescott R, Bossinger C, Cook P. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry.* 1970;34:595-8.
- [134] Christensen T. Qualitative Test for Monitoring Coupling Completeness in Solid-Phase Peptide-Synthesis Using Chloranil. *Acta Chemica Scandinavica Series B-Organic Chemistry and Biochemistry.* 1979;33:763-6.
- [135] Hancock WS, Battersby JE. A new micro test for the detection of incomplete coupling reactions in solid phase peptide synthesis using 2,4,6 trinitrobenzene sulphonic acid. *Analytical Biochemistry.* 1976;71:260-4.
- [136] Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics.* 1989;55:R1-R4.
- [137] Habeeb AFSA. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry.* 1966;14:328-36.
- [138] Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B. Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)—a reexamination. *Analytical Biochemistry.* 1979;94:75-81.
- [139] Hope M, Bally M, Webb G, Cullis P. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes.* 1985;812:55-65.

- [140] McConnell ML. Particle size determination by quasielastic light scattering. *Analytical Chemistry*. 1981;53:1007A-18A.
- [141] Chu B. Laser light scattering. *Annual review of physical chemistry*. 1970;21:145-74.
- [142] Brown J, Pusey P, Goodwin J, Ottewill R. Light scattering study of dynamic and time-averaged correlations in dispersions of charged particles. *Journal of Physics A: Mathematical and General*. 1975;8:664.
- [143] Balk LJ. Scanning electron acoustic microscopy. *Advances in Electronics and Electron physics*. 1988;71:1-73.
- [144] Radmacher M, Tillmann R, Fritz M, Gaub H. From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science*. 1992;257:1900-5.
- [145] Albert KS, Raabe A, Garry M, Antal EJ, Gillespie WR. Determination of ibuprofen in capillary and venous plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1984;73:1487-9.
- [146] McClare C. An accurate and convenient organic phosphorus assay. *Analytical Biochemistry*. 1971;39:527-30.
- [147] Magenheim B, Levy M, Benita S. A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers-ultrafiltration technique at low pressure. *International Journal of Pharmaceutics*. 1993;94:115-23.
- [148] Levy M, Benita S. Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model. *International Journal of Pharmaceutics*. 1990;66:29-37.
- [149] Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983;15:25-35.
- [150] Zhou W, Wang Y, Jian J, Song S. Self-aggregated nanoparticles based on amphiphilic poly (lactic acid)-grafted-chitosan copolymer for ocular delivery of amphotericin B. *International journal of nanomedicine*. 2013;8:3715.
- [151] Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, McDanal CB, Matthews TJ. Peptides corresponding to a predictive α -helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91:9770-4.
- [152] Gómara MJ, Lorizate M, Huarte N, Mingarro I, Perez-Payá E, Nieva JL. Hexapeptides that interfere with HIV-1 fusion peptide activity in liposomes block GP41-mediated membrane fusion. *FEBS Letters*. 2006;580:2561-6.
- [153] Gallo SA, Wang W, Rawat SS, Jung G, Waring AJ, Cole AM, et al. θ -defensins prevent HIV-1 Env-mediated fusion by binding gp41 and

blocking 6-helix bundle formation. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281:18787-92.

[154] Gustchina E, Louis JM, Bewley CA, Clore GM. Synergistic Inhibition of HIV-1 Envelope-Mediated Membrane Fusion by Inhibitors Targeting the N and C-Terminal Heptad Repeats of gp41. *Journal of molecular biology*. 2006;364:283-9.

[155] Jiang S, Lu H, Liu S, Zhao Q, He Y, Debnath AK. N-substituted pyrrole derivatives as novel human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors that interfere with the gp41 six-helix bundle formation and block virus fusion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48:4349-59.

[156] Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival - Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*. 1986;89:271-7.

[157] Anastassopoulou CG, Ketas TJ, Klasse PJ, Moore JP. Resistance to CCR5 inhibitors caused by sequence changes in the fusion peptide of HIV-1 gp41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106:5318-23.

[158] Kopetzki E, Jekle A, Ji C, Rao E, Zhang J, Fischer S, et al. Closing two doors of viral entry: Intramolecular combination of a coreceptor- and fusion inhibitor of HIV-1. *Virology Journal*. 2008;5.

[159] Lorizate M, Gómara MJ, de la Torre BG, Andreu D, Nieva JL. Membrane-transferring Sequences of the HIV-1 Gp41 Ectodomain Assemble into an Immunogenic Complex. *Journal of molecular biology*. 2006;360:45-55.

[160] Wang RR, Yang LM, Wang YH, Pang W, Tam SC, Tien P, et al. Sifuvirtide, a potent HIV fusion inhibitor peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;382:540-4.

[161] Fernández-Vidal M, Cubero MD, Ercilla G, Gómara MJ, Haro I. Application of a chimeric synthetic peptide in the development of a serologic method for the diagnosis of hepatitis G virus infection. *Protein and Peptide Letters*. 2007;14:865-70.

[162] Haseman JK, Allen DG, Lipscomb EA, Truax JF, Stokes WS. Using fewer animals to identify chemical eye hazards: revised criteria necessary to maintain equivalent hazard classification. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011;61:98-104.

[163] Talsma DM, Leach CL, Hatoum NS, Gibbons RD, Roger J-C, Garvin PJ. Reducing the number of rabbits in the Draize eye irritancy test: A statistical analysis of 155 studies conducted over 6 years. *Fundam Appl Toxicol*. 1988;10:146-53.

[164] Kay J, Calandra J. Interpretation of eye irritation tests. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. 1962;13:281-9.

- [165] Benita S. Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 1999;53:193-206.
- [166] Singh-Joy SD, McLain VC. Safety assessment of poloxamers 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, and 407, poloxamer 105 benzoate, and poloxamer 182 dibenzoate as used in cosmetics. *International journal of toxicology*. 2007;27:93-128.
- [167] Zhang N, Chittasupho C, Duangrat C, Siahaan TJ, Berklund C. PLGA Nanoparticle–Peptide Conjugate Effectively Targets Intercellular Cell-Adhesion Molecule-1. *Bioconjugate Chemistry*. 2007;19:145-52.
- [168] Popielarski SR, Hu-Lieskovan S, French SW, Triche TJ, Davis ME. A nanoparticle-based model delivery system to guide the rational design of gene delivery to the liver. 2. In vitro and in vivo uptake results. *Bioconjugate Chemistry*. 2005;16:1071-80.
- [169] Nikouei NS, Lavasanifar A. Characterization of the thermo- and pH-responsive assembly of triblock copolymers based on poly (ethylene glycol) and functionalized poly (ϵ -caprolactone). *Acta Biomater*. 2011;7:3708-18.
- [170] Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Analytical Chemistry*. 1997;69:4751-60.
- [171] Vega E, Egea M, Calpena A, Espina M, García M. Role of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on freeze-dried and gamma-irradiated PLGA and PLGA-PEG diblock copolymer nanospheres for ophthalmic flurbiprofen delivery. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:1357.
- [172] Schoenwald R, Stewart P. Effect of particle size on ophthalmic bioavailability of dexamethasone suspensions in rabbits. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1980;69:391-4.
- [173] Chittasupho C, Xie S-X, Baoum A, Yakovleva T, Siahaan TJ, Berklund CJ. ICAM-1 targeting of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles to lung epithelial cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;37:141-50.
- [174] Avgoustakis K, Beletsi A, Panagi Z, Klepetsanis P, Livaniou E, Evangelatos G, et al. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA–mPEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003;259:115-27.
- [175] Alimohammadi S, Salehi R, Amini N, Davaran S. Synthesis and Physicochemical Characterization of Biodegradable PLGA-Based Magnetic Nanoparticles Containing Amoxicilin. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2012;33:3225-32.
- [176] Park TG. Degradation of poly (D, L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. *Journal of Controlled Release*. 1994;30:161-73.

- [177] Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64, Supplement:72-82.
- [178] Feng S-s, Huang G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers. *Journal of Controlled Release*. 2001;71:53-69.
- [179] Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*. 1999;57:171-85.
- [180] Vandervoort J, Ludwig A. Ocular drug delivery: nanomedicine applications. *Nanomedicine*. 2007;2:11-21.
- [181] Yin Win K, Feng S-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*. 2005;26:2713-22.
- [182] Mathew A, Fukuda T, Nagaoka Y, Hasumura T, Morimoto H, Yoshida Y, et al. Curcumin loaded-PLGA nanoparticles conjugated with Tet-1 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *PloS one*. 2012;7:e32616.
- [183] Mu L, Feng SS. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *Journal of Controlled Release*. 2003;86:33-48.
- [184] Lamprou D, Venkatpurwar V, Kumar M, Kreplak L. Atomic Force Microscopy Images Label-Free. *Drug Encapsulated Nanoparticles In Vivo and Detects*. 2013.
- [185] Montasser I, Fessi H, Coleman A. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2002;54:281-4.
- [186] Majumdar D, Singhal S. Medicinal chemistry and nanomedicine for reproductive cancer therapeutics. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2012;4:2029.
- [187] Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, Kawashima Y. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D, L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *Journal of Controlled Release*. 1993;25:89-98.
- [188] Hopfenberg H, Apicella A, Saleeby D. Factors affecting water sorption in and solute release from glassy ethylene—vinyl alcohol copolymers. *J Membr Sci*. 1981;8:273-82.
- [189] Lee P. Dimensional changes during drug release from a glassy hydrogel matrix. *Polymer Communications*. 1983;24:45-7.
- [190] Peppas N, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000;50:27-46.

- [191] Gamisans F, Lacoulonche F, Chauvet A, Espina M, Garcia M, Egea M. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999;179:37-48.
- [192] von Burkersroda F, Gref R, Göpferich A. Erosion of biodegradable block copolymers made of poly (D, L-lactic acid) and poly (ethylene glycol). *Biomaterials*. 1997;18:1599-607.
- [193] Siparsky GL, Voorhees KJ, Dorgan JR, Schilling K. Water transport in polylactic acid (PLA), PLA/polycaprolactone copolymers, and PLA/polyethylene glycol blends. *J Environ Polymer Degradation*. 1997;5:125-36.
- [194] Clapper JD, Skeie JM, Mullins RF, Guymon CA. Development and characterization of photopolymerizable biodegradable materials from PEG-PLA-PEG block macromonomers. *Polymer*. 2007;48:6554-64.
- [195] Essa S, Rabanel JM, Hildgen P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;75:96-106.
- [196] Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57:1595-639.
- [197] Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57:1556-68.
- [198] Vila A, Gill H, McCallion O, Alonso MaJ. Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. *Journal of Controlled Release*. 2004;98:231-44.
- [199] Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006;58:1131-5.
- [200] Prausnitz MR, Noonan JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1998;87:1479-88.
- [201] Pfister RR, Burstein N. The effects of ophthalmic drugs, vehicles, and preservatives on corneal epithelium: a scanning electron microscope study. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1976;15:246-59.
- [202] Qaddoumi MG, Ueda H, Yang J, Davda J, Labhasetwar V, Lee VH. The characteristics and mechanisms of uptake of PLGA nanoparticles in rabbit conjunctival epithelial cell layers. *Pharmaceutical research*. 2004;21:641-8.
- [203] Wood RW, Li VHK, Kreuter J, Robinson JR. Ocular disposition of poly-hexyl-2-cyano[3-14C]acrylate nanoparticles in the albino rabbit. *International Journal of Pharmaceutics*. 1985;23:175-83.
- [204] Calvo P, Thomas C, Alonso MJ, Vila-Jato J, Robinson JR. Study of the mechanism of interaction of poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules with the cornea by confocal laser scanning microscopy. *International Journal of Pharmaceutics*. 1994;103:283-91.

- [205] Pauwels R, Balzarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, Herdewijn P, et al. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J Virol Methods*. 1988;20:309-21.
- [206] Twentyman P, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer*. 1987;56:279.
- [207] Chan JM, Zhang L, Yuet KP, Liao G, Rhee J-W, Langer R, et al. PLGA–lecithin–PEG core–shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials*. 2009;30:1627-34.
- [208] Tavaszi J, Budai P. The use of HET-CAM test in detecting the ocular irritation. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. 2007;72:137.
- [209] Diepold R, Kreuter J, Guggenbuhl P, Robinson J. Distribution of poly-hexyl-2-cyano-acrylate nanoparticles in healthy and chronically inflamed rabbit eyes. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989;54:149-53.
- [210] Zimmer AK, Maincent P, Thouvenot P, Kreuter J. Hydrocortisone delivery to healthy and inflamed eyes using a micellar polysorbate 80 solution or albumin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 1994;110:211-22.
- [211] Rafalski M, Lear J, DeGrado W. Phospholipid interactions of synthetic peptides representing the N-terminus of HIV gp41. *Biochemistry*. 1990;29:7917-22.
- [212] Schön A, Madani N, Klein JC, Hubicki A, Ng D, Yang X, et al. Thermodynamics of binding of a low-molecular-weight CD4 mimetic to HIV-1 gp120. *Biochemistry*. 2006;45:10973-80.
- [213] Koedel Y, Eissmann K, Wend H, Fleckenstein B, Reil H. Peptides derived from a distinct region of GB Virus C glycoprotein E2 mediate strain specific HIV-1 entry inhibition. *J Virol*. 2011;JVI. 02366-10.
- [214] Ingallinella P, Bianchi E, Ladwa NA, Wang Y-J, Hrin R, Veneziano M, et al. Addition of a cholesterol group to an HIV-1 peptide fusion inhibitor dramatically increases its antiviral potency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106:5801-6.
- [215] Wexler-Cohen Y, Shai Y. Demonstrating the C-terminal boundary of the HIV 1 fusion conformation in a dynamic ongoing fusion process and implication for fusion inhibition. *The FASEB journal*. 2007;21:3677-84.
- [216] Paskaleva EE, Xue J, Lee DY, Shekhtman A, Canki M. Palmitic acid analogs exhibit nanomolar binding affinity for the HIV-1 CD4 receptor and nanomolar inhibition of gp120-to-CD4 fusion. *PloS one*. 2010;5:e12168.
- [217] Luo G, Yu X, Jin C, Yang F, Fu D, Long J, et al. LyP-1-conjugated nanoparticles for targeting drug delivery to lymphatic metastatic tumors. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;385:150-6.

- [218] Liu Z, Jiang M, Kang T, Miao D, Gu G, Song Q, et al. Lactoferrin-modified PEG-co-PCL nanoparticles for enhanced brain delivery of a NAP peptide following intranasal administration. *Biomaterials*. 2013;34:3870-81.
- [219] Gómez-Gaete C. Nanopartículas poliméricas: Tecnología y aplicaciones farmacéuticas. *Rev. Farmacol. Chile*. 2014; 7(2).
- [220] Riley T, Stolnik S, Heald C, Xiong C, Garnett M, Illum L, et al. Physicochemical evaluation of nanoparticles assembled from poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol)(PLA-PEG) block copolymers as drug delivery vehicles. *Langmuir*. 2001;17:3168-74.
- [221] van Broekhoven CL, Parish CR, Demangel C, Britton WJ, Altin JG. Targeting Dendritic Cells with Antigen-Containing Liposomes A Highly Effective Procedure for Induction of Antitumor Immunity and for Tumor Immunotherapy. *Cancer Res*. 2004;64:4357-65.
- [222] Zhang L, Rozek A, Hancock RE. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J Biol Chem*. 2001;276:35714-22.
- [223] Forssmann W-G, Stoll M, Adermann K, Albrecht U, Tillmann H-C, Barros K, et al. Short-term monotherapy in HIV-infected patients with a virus entry inhibitor against the gp41 fusion peptide. *Science translational medicine*. 2010;2:63re3-re3.
- [224] Münch J, Ständker L, Adermann K, Schulz A, Schindler M, Chinnadurai R, et al. Discovery and Optimization of a Natural HIV-1 Entry Inhibitor Targeting the gp41 Fusion Peptide. *Cell*. 2007;129:263-75.
- [225] Smaby JM, Momsen M, Kulkarni VS, Brown RE. Cholesterol-Induced Interfacial Area Condensations of Galactosylceramides and Sphingomyelins with Identical Acyl Chains. *Biochemistry*. 1996;35:5696-704.
- [226] Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews| drug discovery*. 2005;4:145.
- [227] Liu S, Lu H, Niu J, Xu Y, Wu S, Jiang S. Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280:11259-73.
- [228] Bolognesi DP, Matthews TJ, Wild CT. Synthetic peptide inhibitors of HIV transmission. *Google Patents*; 1995.
- [229] Kilby JM, Eron JJ. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *New Engl J Med*. 2003;348:2228-38.
- [230] Cervia JS, Smith MA. Enfuvirtide (T-20): a novel human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitor. *Clin Infect Dis*. 2003;37:1102-6.
- [231] Sánchez-Martín MJ, Urbán P, Pujol M, Haro I, Alsina MA, Busquets MA. Biophysical Investigations of GBV-C E1 Peptides as Potential Inhibitors of HIV-1 Fusion Peptide. *Chemphyschem*. 2011;12:2816-22.
- [232] Galatola R, Vasconcelos A, Pérez Y, Cruz A, Pujol M, Alsina MA, et al. A cyclic GB virus C derived peptide with anti-HIV-1 activity targets the

fusion peptide of HIV-1. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;86:589-604.

[233] Pellecchia M, Bertini I, Cowburn D, Dalvit C, Giralt E, Jahnke W, et al. Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age. *Nature reviews drug discovery*. 2008;7:738-45.

[234] Meyer B, Peters T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angewandte Chemie International Edition*. 2003;42:864-90.

[235] Lepre CA, Moore JM, Peng JW. Theory and applications of NMR-based screening in pharmaceutical research. *Chemical reviews*. 2004;104:3641-76.

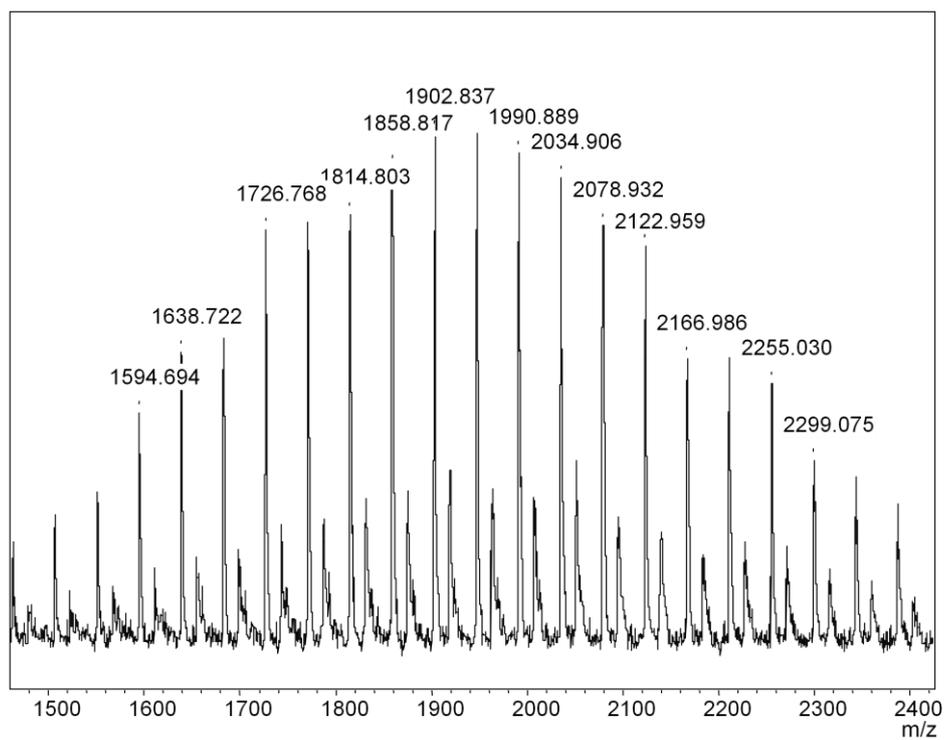
[236] Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr at V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 2012;161:505-22.

[237] Astete CE, Sabliov CM. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2006;17:247-89.

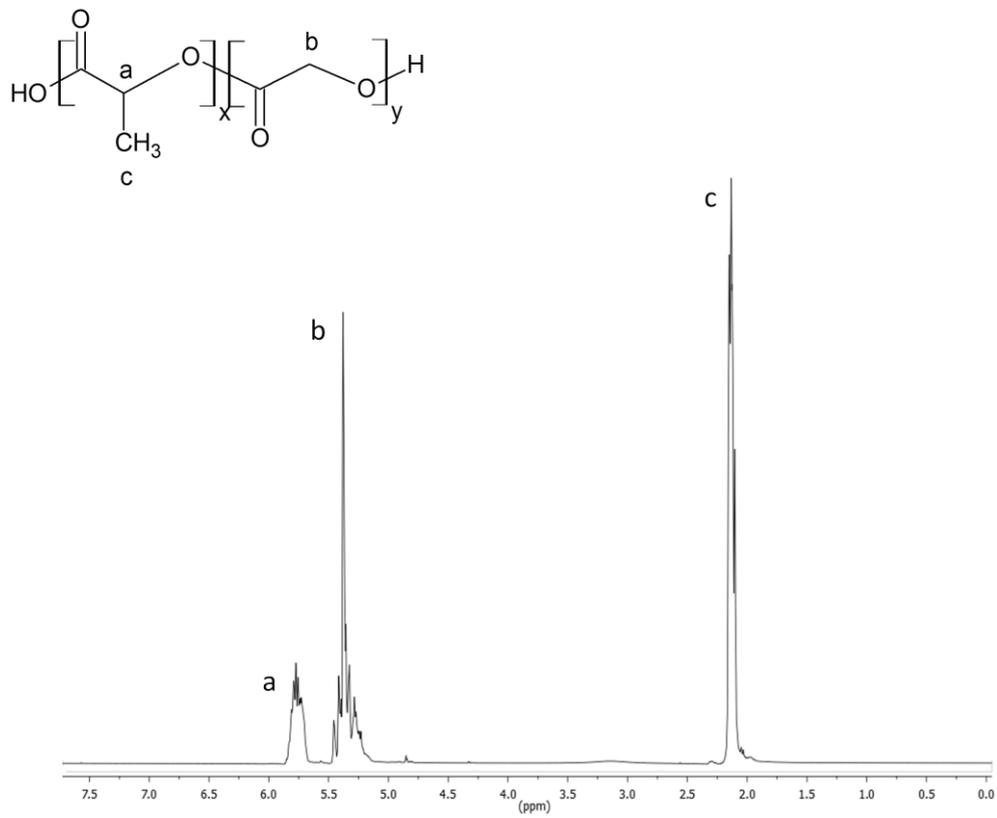
[238] Kliger Y, Aharoni A, Rapaport D, Jones P, Blumenthal R, Shai Y. Fusion Peptides Derived from the HIV Type 1 Glycoprotein 41 Associate within Phospholipid Membranes and Inhibit Cell-Cell Fusion Structure-function study. *J Biol Chem*. 1997;272:13496-505.

7. ANEXOS

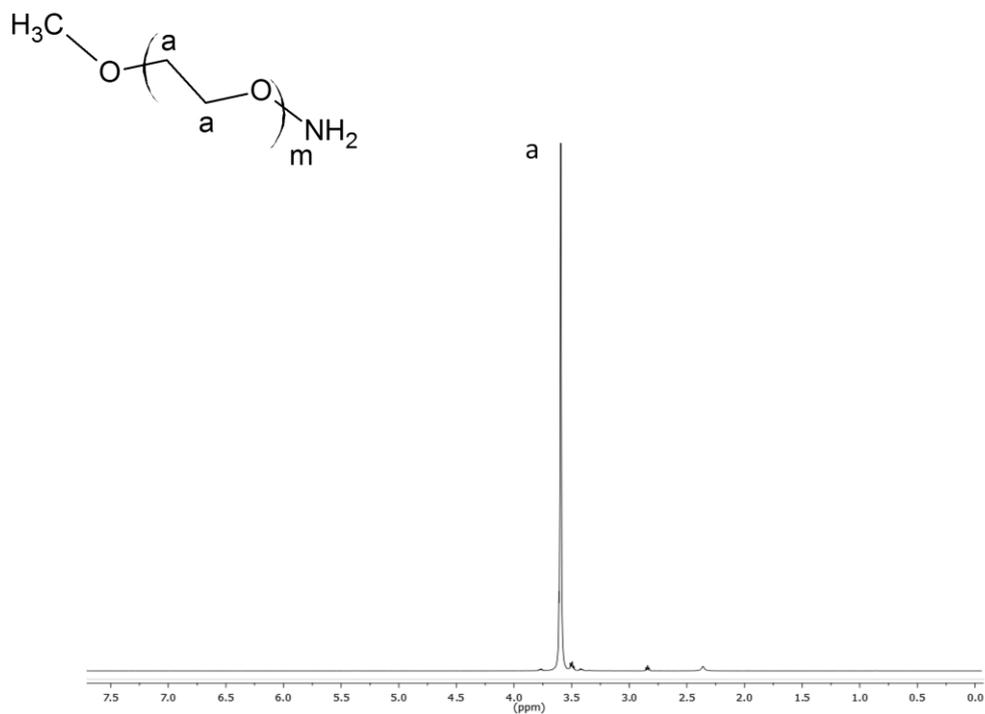
Anexo 1. Espectro MALDI-TOF del NH₂-PEG-Maleimido (2000 Da)



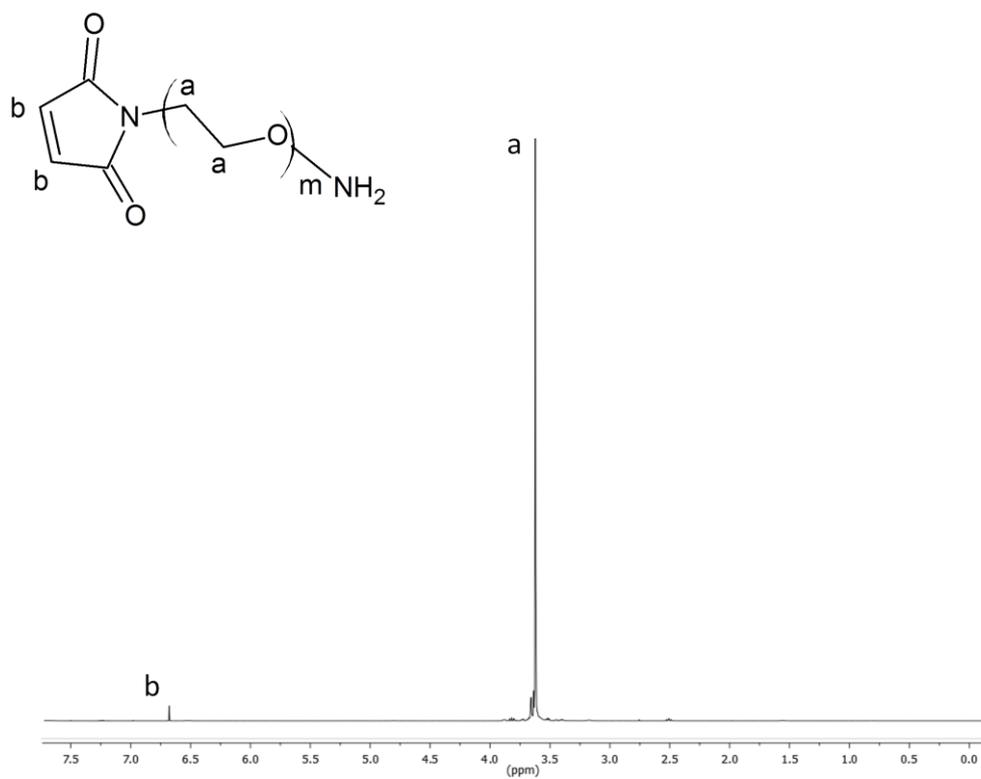
Anexo 2. Espectro de RMN-¹H del polímero PLGA-H



Anexo 3. Espectro de RMN-¹H del polímero NH₂-PEG-metoxi



Anexo 4. Espectro de RMN-¹H del polímero NH₂-PEG-Maleimido.



Anexo 5. Espectro FTIR de las NPs PLGA, PLGA-PEG-NPs, PLGA-PEG-POD-NPs y PLGA-PEG-Tat-HIV-NPs sin FB.

