

SÍNTESI DE PÈPTIDS RELACIONATS AMB LA SEQÜÈNCIA RGD. ESTUDI COMPARATIU DE LA SEVA INCORPORACIÓ A LA SUPERFÍCIE DE LIPOSOMES CARREGATS AMB 5-FUR.

Anna Massaguer Vall-Ilovera



UNIVERSIDAD DE BARCELONA



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701649079

Dra. Francesca Reig Isart, Investigadora del C.S.I.C., Centre d'Investigació i Desenvolupament de Barcelona.

Dra. M^a Asunción Alsina Esteller, Catedràtica de Química Física de la Universitat de Barcelona.

Certifiquen:

Que el present treball ha estat realitzat per ANNA MASSAGUER i VALL-LLOVERA sota la seva direcció en el Laboratori de Pèptids del Centre d'Investigació i Desenvolupament, C.S.I.C i a la Unitat de Físico-Química del Departament de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Febrer de 1997.



Dra. Francesca Reig Isart



Dra. M^a Asunción Alsina

A en Jordi

En primer lloc voldria expressar el meu agraïment a les Dres. Francesca Reig i M^a Asunción Alsina per la seva dedicació i per haver-me donat aquesta oportunitat de viure la ciència d'una mica més a prop.

També voldria agrair a la Dra. Isabel Haro els seus consells i suport en la realització del treball.

A tots els meus companys de laboratori els vull donar les gràcies per haver-me ensenyat tantes coses, per donar-me un cop de mà en els moments difícils, pels seus consells (a vegades maternals), per la seva paciència i dedicació, i sobretot per la seva amistat, que ha fet que aquests treball hagi estat una gran experiència.

Finalment, vull dedicar aquest treball als meus pares, àvia i germans, que sempre han estat al meu costat i que són la meva font de il·lusió i voluntat.

ABREVIATURES

aa	Aminoàcid
AAA	Anàlisi d'aminoàcids
ACN	Acetonitril
CF	Carboxifluoresceïna
Chol	Colesterol
DCM	Diclorometà
DIPCDI	Diisopropilcarbodiïmida
DIEA	N-Etilisopropilamina
DMF	Dimetilformamida
DPH	Difenilhexatriè
DPPE	Dipalmitoilfosfatidiletanolamina
DRV	Liposomes obtinguts per deshidratació-rehidratació.
EDC	Etildietilcarbodiïmida
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
Fmoc-aa	Aminoàcid N-protegit amb el grup Fmoc
5-FUR	5-Fluoruridina
HOBt	Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
MBHA	Metilbencidrilamina
MLV	Vesícules multilaminars

MeOH	Metanol
NGPE	N-glutarilfosfatidiletanolamina
NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
PBS	Solució tampó fosfat, ph=7,4
PC	Fosfatidilcolina
PG	Fosfatidilglicerol
Pip/DMF 20%	Piperidina en DMF al 20%
PL	Fosfolípid
PM	Pes Molecular
PVR	Proliferació Vitreo Retiniana
tBu	Terbutil
TAC	Solució d'Acetat Sòdic
Tc	Temperatura de transició
Tr	Temps de retenció
TFA	Àcid trifluoroacètic
UV	Ultravioleta

Aminoàcids

D	Asp	Àcid Aspàrtic
G	Gly	Glicina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina

ÍNDEX

Í N D E X

I. INTRODUCCIÓ	1
1. SISTEMES D'ALLIBERAMENT DE FÀRMACS	1
1.1. Introducció	1
1.2. Sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs a nivell ocular	1
1.3. Liposomes	2
<i>1.3.1. Composició química</i>	3
<i>1.3.2. Propietats fisicoquímiques</i>	5
<i>1.3.3. Classificació dels liposomes</i>	5
2. VITREORETINOPATIA PROLIFERATIVA	6
2.1. Característiques generals	6
2.2. Tractament de la PVR	8
3. PROLIFERACIÓ CEL·LULAR	9
3.1. Fibronectina	9
4. SÍNTESE DE PÈPTIDS EN FASE SÒLIDA	10
4.1. Característiques generals	10
4.2. Formació de la cadena peptídica	11
4.3. Caracterització de les seqüències peptídiques	12
5. CARACTERITZACIÓ FISICOQUÍMICA DEL PÈPTID	13
5.1. Capacitat de formar micelles	13
5.2. Activitat superficial dels pèptids	14
II. OBJECTIUS	15
III. MATERIALS I MÈTODES	16
1. MATERIALS	16
1.1. Dissolvents i reactius	16
1.2. Lípids	17
1.3. Aminoàcids	17
1.4. Solucions preparades	18
1.5. Instrumentació	18
1.6. Suports cromatogràfics	19

2. MÈTODES	20
2.1. Síntesi del pèptid A.1	20
2.1.1. <i>Rentat de la resina</i>	20
2.1.2. <i>Acoblament del "linker" AM i dels aminoàcids</i>	21
<i>-Avaluació dels acoblements: Test de ninhidrina</i>	21
2.1.3. <i>Desprotecció i desancorament del pèptid</i>	22
2.1.4. <i>Caracterització i purificació del pèptid</i>	23
<i>-Cromatografia líquida d'alta eficàcia</i>	23
<i>-Anàlisi d'aminoàcids</i>	24
<i>-Espectrometria de masses: electrospray</i>	24
2.2. Síntesi dels derivats hidròfobs del pèptid A.1	24
2.3. Estudi Físicoquímic del pèptid	25
2.3.1. <i>Estudi de la formació de micel.les</i>	25
2.3.2. <i>Activitat superficial</i>	25
2.4. Síntesi de la N-glutarilfosfatidiletanolamina	26
2.5. Purificació de la Carboxifluoresceïna	27
2.6. Preparació de liposomes amb 5-fluoruridina	27
2.6.1. <i>Liposomes amb 5-fluoruridina</i>	27
2.6.2. <i>Liposomes amb 5-fluoruridina i derivat hidròfob del pèptid A.1</i> ..	28
2.6.3. <i>Liposomes amb 5-fluoruridina i pèptid A.1 unit covalentment</i>	29
2.7. Caracterització dels liposomes	30
2.7.1. <i>Determinació de l'eficàcia d'encapsulació de 5-fluoruridina</i>	30
2.7.2. <i>Determinació quantitativa de fosfolípid</i>	30
2.7.3. <i>Determinació del tamany dels liposomes</i>	31
2.7.4. <i>Determinació del pèptid incorporat als liposomes</i>	31
2.8. Liposomes amb Carboxifluoresceïna	32
2.8.1. <i>Liposomes MLV amb CF</i>	32
2.8.2. <i>Liposomes DRV amb CF i pèptid A.1</i>	32
2.9. Avaluació de la encapsulació de CF en liposomes	33
IV. RESULTATS I DISCUSIÓ	34
1. ELECCIÓ DEL PÈPTID A.1	34
2. PÈPTID A.1	34
2.1. Síntesi	34
2.1.1. <i>Incorporació del "linker" Fmoc-AM</i>	35
2.1.2. <i>Incorporació dels Fmoc-aminoàcids</i>	35
2.2. Desprotecció i desancorament	36
2.3. Caracterització	37
3. DERIVATITZACIÓ HIDRÒFOBA DEL PÈPTID A.1	40
3.1. Síntesi dels derivats	40

3.2. Caracterització	41
3.2.1. <i>Derivat A.1.Mirístic</i>	41
3.2.2. <i>Desprotecció de l'A.1.Mirístic-PMC</i>	43
3.2.3. <i>Derivat A.1.Hexanòic</i>	45
4. SÍNTESI DE LA NGPE	47
5. CARACTERITZACIÓ FÍSICOQUÍMICA DELS PÈPTIDS	48
5.1. Formació de micel·les	48
5.2. Activitat Superficial	49
5.3. Estudi del caràcter hidròfob	50
6. PREPARACIÓ DE LIPOSOMES	51
6.1. Consideracions generals	51
6.2. Optimització de l'encapsulació de 5-FUR	52
6.3. Incorporació del pèptid als liposomes	53
6.3.1. Determinació de la incorporació del pèptid	55
<i>Incorporació dels derivats hidròfobs d'A.1</i>	55
- <i>Liposomes amb A.1.Hexanòic</i>	55
- <i>Liposomes amb A.1. Mirístic</i>	56
- <i>Liposomes amb A.1.Mirístic-PMC</i>	56
<i>Unió covalent d'A.1 a la superfície dels liposomes</i>	57
<i>Estudi comparatiu de la incorporació d'A.1 i els seus derivats</i>	58
6.4. Influència de la presència de pèptids en l'encapsulació de 5.FUR	59
7. PREPARACIÓ DE LIPOSOMES AMB CARBOXIFLUORESCÈINA	60
7.1. Preparació de solució 100 mM de CF	60
7.2. Determinació de la latència dels liposomes	61
7.3. Liposomes amb CF	62
<i>Liposomes MLV sense pèptid</i>	62
<i>Liposomes amb CF i pèptid A.1</i>	62
V.CONCLUSIONS	64
VI. BIBLIOGRAFIA	66

INTRODUCCIÓ

I. INTRODUCCIÓ

1. SISTEMES D'ALLIBERAMENT DE FÀRMACS

1.1. Introducció

El principi general per l'èxit de la farmacoteràpia és que la droga apropiada ha d'estar present al lloc d'acció, en una concentració efectiva i durant el període de temps necessari.

Els principals factors implicats en la localització i manteniment d'una droga al lloc d'acció són les propietats fisicoquímiques de la substància, el vehicle, així com els teixits orgànics i processos fisiològics implicats en l'absorció, distribució i eliminació de la substància.

Durant anys, la investigació farmacològica s'ha centrat en la síntesi o descobriment de nous fàrmacs, però moltes d'aquestes substàncies, amb elevat potencial terapèutic, no han pogut ser desenvolupades degut a problemes pràctics a l'hora de la seva administració, com la falta de solubilitat, poca estabilitat en els medis biològics, baixa absorció tant oral com tòpica, elevada toxicitat, etc. És per això que darrerament s'està dedicant molts esforços per crear sistemes d'alliberament de fàrmacs (drug delivery systems) que puguin solventar aquests problemes.

Dins d'aquests sistemes d'alliberament de fàrmacs s'inclou la modificació de principis actius, tant de forma química (pre-drogues), com unint-los a macromolècules (polisacàrids, pèptids, polimers, anticossos, etc) , o també la seva inclusió en vesícules, com són els liposomes, i la seva retenció a l'interior de bombes o materials polimèrics biodegradables.

1.2. Sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs a nivell ocular

L'ull és un òrgan amb una estructura anatòmica, una fisiologia i uns mecanismes de defensa propis. La seva anatomia i característiques fisiològiques fan que administrar la droga al lloc d'acció apropiat amb una bona biodisponibilitat sigui un dels principals objectius dels sistemes d'alliberament de fàrmacs a nivell ocular.

Durant molts anys les preparacions farmacològiques oculars han consistit en solucions oftàlmiques, suspensions o gels administrats via tòpica. El principal inconvenient d'aquestes formes d'administració és que tenen molt baixa biodisponibilitat. Presenten baixa permanència a la zona precorneal degut al llagrimatge, un drenatge nasolacrimal ràpid de la

droga instil·lada i una escassa absorció a través de la conjuntiva que permet un pas de la droga molt limitat a través de la barrera corneal lipòfila. L'escassa dosi que pot penetrar a l'interior de l'ull té un temps de residència molt curt, el que dona una breu duració de l'acció farmacològica.

La instil·lació tòpica de la droga sovint comporta un augment brusc de la seva concentració ocular seguit d'un ràpid descens. En canvi, una teràpia adequada sol requerir que l'efecte del principi actiu es mantingui un cert període de temps, reduint la freqüència de la seva administració (1).

Recentment s'està investigant diferents mètodes per augmentar el temps de permanença a nivell precorneal i també per millorar la capacitat de penetració del principi actiu. Tot i que les formes convencionals de solucions i suspensions són les més usades, s'estan introduint sistemes d'alliberament controlada per minimitzar els pics de concentració i per mantenir un nivell efectiu de droga durant un període de temps més prolongat. Aquests sistemes inclouen nanopartícules, polímers mucoadhesius, liposomes, pel·lícules carregades amb fàrmacs hidrosolubles, etc. D'entre aquests, els liposomes semblen ser una forma d'administració efectiva i segura per la teràpia ocular (2), (3), (4).

1.3. Liposomes

Els liposomes són vesícules amb un espai aquós interior englobat per una o varies bicapes lipídiques, constituïdes generalment per fosfolípids. Van ser descrits per primera vegada per Bangham i Horne (5) al observar per microscopia electrònica que una suspensió de fosfolípids d'origen cel·lular, aïllats i purificats, formaven de manera espontània vesícules tancades.

Els fosfolípids, donat el seu caràcter amfifílic, es disposen amb la part hidròfila orientada al medi aquós, mentre que la part hidròfoba, constituïda per les cadenes apolars dels àcids grassos, es situa a l'interior. En contacte amb l'aigua les molècules s'ordenen formant bicapes per minimitzar les interaccions desfavorables entre la fase aquosa i les llargues cadenes d'àcid gras. Les interaccions desapareixen quan les bicapes es disposen formant vesícules tancades.

Els liposomes tenen un elevat interès com a elements de transport de fàrmac gràcies a la possibilitat d'encapsular al seu interior substàncies de diferent naturalesa. Les molècules de caràcter lipòfil s'incorporen amb facilitat dins de les bicapes sense alterar l'estructura del liposoma, les substàncies anfipàtiques es situen amb els fosfolípids entre la fase aquosa i l'interior de la membrana, mentre que les molècules solubles en aigua són encapsulades a l'interior aquós dels liposomes (6).

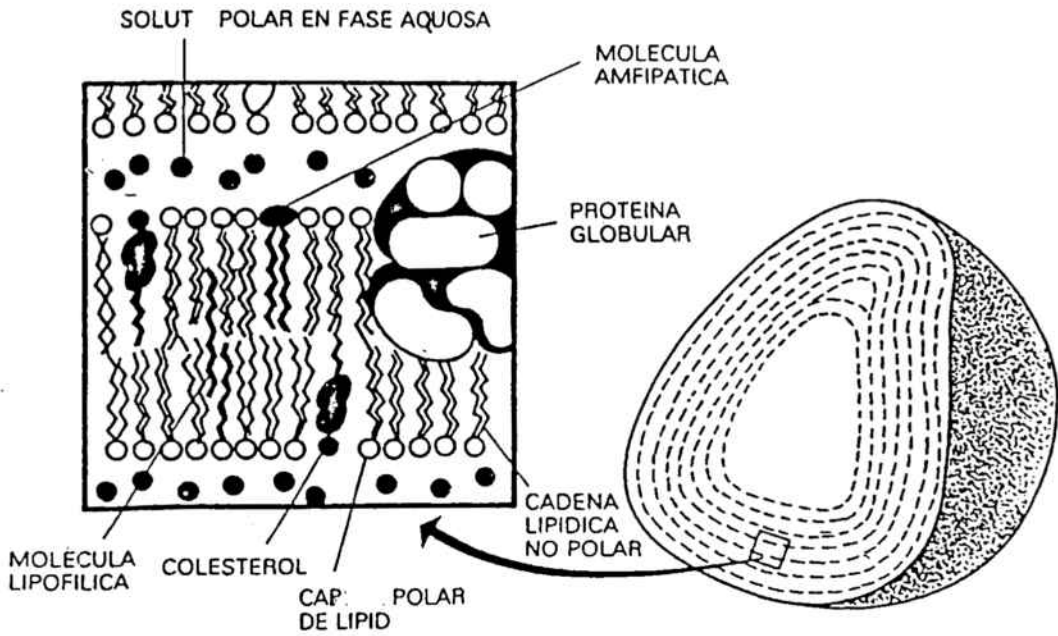


Figura 1: Representació esquemàtica de l'estructura dels liposomes.

Els principals avantatges dels liposomes com a sistemes d'administració de fàrmacs són:

-estan composts de lípids similars als presents a les membranes biològiques, per tant són biocompatibles i biodegradables (7),

-tenen la capacitat d'encapsular compostos hidrosolubles i liposolubles degut al seu caràcter amfipàtic (8), (9),

-poden millorar l'absorció i la localització del fàrmac encapsulat (10), (11),

-poden incrementar la vida mitja del principi actiu encapsulat, protegint-lo de la degradació metabòlica (12).

-en alguns casos poden actuar com a sistemes d'administració retardada, alliberant el seu contingut de forma lenta i gradual, i prolongant l'acció del fàrmac (13),(14).

1.3.1. Composició química.

Els liposomes poden preparar-se a partir de gran varietat de lípids amfifílics, tant sintètics com d'origen natural. Els més emprats són els fosfolípids i el colesterol, ja que són els components majoritaris de les membranes biològiques.

a) *Fosfolípids*. Són els principals components dels liposomes. Són molècules de caràcter amfipàtic que poden classificar-se en dos grups: els fosfoglicèrids i els esfingolípids.

Dins dels fosfoglicèrids es troba la fosfatidilcolina o lecitina (PC), que és el fosfolípid més abundant a la natura i el component lipídic principal de les membranes biològiques. Està constituïda per un esquelet de glicerol que uneix dos molècules d'acid gras (posicions 1 i 2) i una fosforilcolina (posició 3), que constitueix la part polar.

La fosfatidilcolina pot ser d'origen natural o sintètic. La d'origen natural és en realitat una barreja de fosfatidilcolines amb àcids grassos de diferent longitud i grau d'insaturació. S'extreu principalment de rovell d'ou i llavor de soja, seguint la d'origen vegetal la que presenta un nivell més alt d'insaturació. La d'origen sintètic sol estar constituïda per àcids grassos saturats.

Altres fosfolípids que usualment s'utilitzen en la preparació de liposomes són la fosfatidiletanolamina (PE), àcid fosfatidic(PA) i fosfatidilglicerol (PG)-que tenen una càrrega negativa-, i la estearilamina -carregada positivament- .

(a) FOSFOLÍPIDS

(b) COLESTEROL

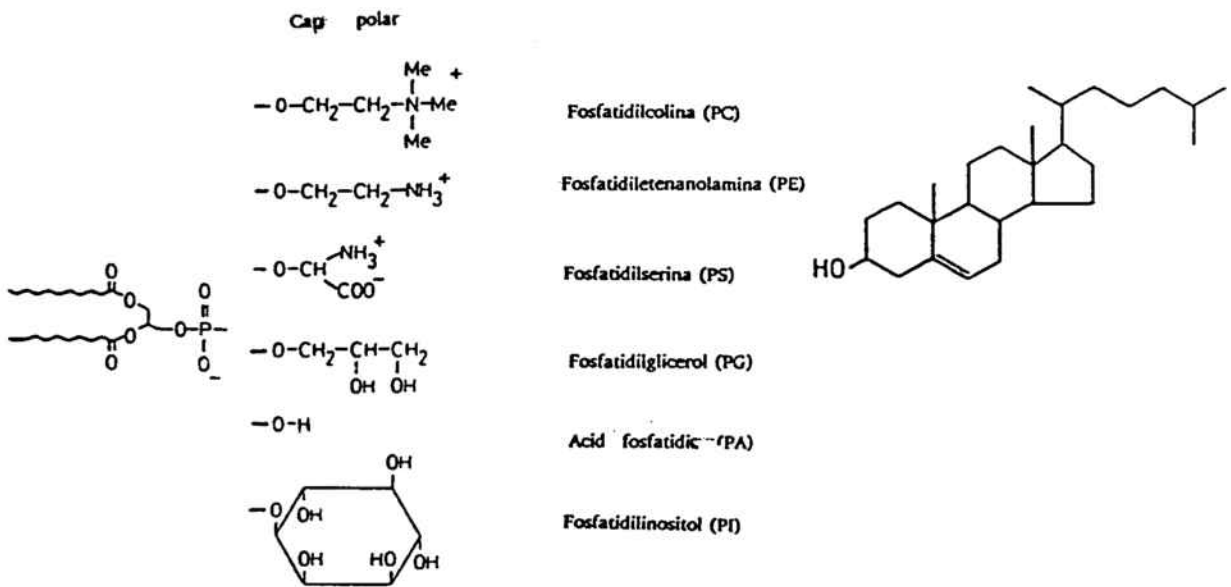


Figura 2: Principals components dels liposomes.

b) Colesterol. Els esterols són components importants de la majoria de membranes naturals. El colesterol és el predominant en membranes de mamífers. Tot i que no forma estructures tipus bicapa per ell mateix, la seva presència a la membrana és important per la seva estabilitat. El seu caracter amfipàtic fa que orienti el grup hidroxil cap a la superfície aquosa i que la resta de la molècula s'intercali entre les cadenes d'acid gras a l'interior de la bicapa.

1.3.2. Propietats fisicoquímiques.

En incrementar la temperatura, els lípids purs constituents de les bicapes liposòmiques passen d'un estat relativament ordenat, denominat *gel*, a un estat desordenat o fluit, *crystal liquid* (15,16). La transició d'un estat a l'altre és un procés endotèrmic que té lloc a temperatura característica, anomenada *temperatura de transició* (T_c). Aquesta temperatura ve determinada per la naturalesa de les cadenes d'àcid gras i dels grups polars del fosfolípid.

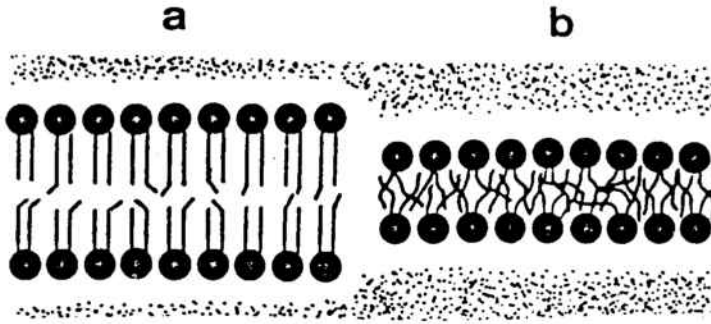


Figura 3. Representació esquemàtica dels estats de la bicapa lipídica: a, estat de gel; b, estat de cristall líquid.

Aquesta transició té gran influència en l'estabilitat i propietats dels liposomes. En el estat de gel les cadenes d'àcids grassos es troben compactades i la seva llibertat de moviment està restringida. Al voltant de la T_c les cadenes presenten major mobilitat i desordre, l'àrea per molècula de fosfolípid és més gran i disminueix el gruix de la bicapa.

Aquesta característica és important donat que s'ha comprovat que els liposomes s'han de preparar a una temperatura superior a la T_c dels lípids. La mobilitat de les cadenes dels àcids grassos és important per tal de que els lípids es compactin i ordenin correctament al formar liposomes. A més per sota de la T_c les vesícules presenten una baixa capacitat per encapsular substàncies.

La transició de fase pot estar afectada per la presència de molècules no fosfolipídiques, com és el colesterol. Aquest pot estar present a les bicapes fins a concentracions del 50%. Concentracions creixents de colesterol produeixen una desaparició progressiva de la transició de fase (17,18). S'ha observat que per sota de la T_c , el colesterol té un efecte lleugerament fluidificant, mentre que a temperatures superiors disminueix la fluidesa. A més el colesterol redueix la possibilitat de penetració de certes proteïnes (HLD) a la bicapa lipídica, el que suposa un increment de l'estabilitat dels liposomes "in vitro" en presència de plasma (19) i "in vivo" després d'una injecció intravenosa (20).

1.3.3. Classificació dels liposomes.

Els liposomes es poden classificar en varis grups en funció del seu tamany i forma. El seu diàmetre pot oscilar des de 25 nm (determinat per la màxima curvatura que poden tolerar els caps polars del fosfolípid) fins a tamanys similars a les cèl.lules vives. Poden estar formats per una sola bicapa o per vàries situades concèntricament.

La classificació més freqüent separa els liposomes en tres categories:

- a) *Vesícules multilaminars (MLV)*. En aquest grup s'inclouen els liposomes amb tamany comprès entre 100 i 1000 nm, constituïts generalment per cinc o més bicapes lipídiques concèntriques. Quan consten de poques bicapes també s'anomenen liposomes oligolaminars. Dins d'aquest grup es pot incloure els liposomes DRV (Dried Reconstituted Vesicles), formats en un procés de deshidratació-rehidratació. Es tracta de liposomes oligolaminars i de tamany inferior o igual a 1000 nm, que són especialment apropiats per transportar substàncies hidròfiles, ja que proporcionen elevats percentatges d'encapsulació.
- b) *Vesícules unilaminars petites (SUV)*. Aquest tipus de liposomes estan formats per una única bicapa de lípid que envolta un compartiment aquós. El seu tamany està comprès entre 20 i 100 nm de diàmetre. S'obtenen a partir de MLV mitjançant processos de sonicació o extrusió.
- c) *Vesícules unilaminars grans (LUV)*. Són vesícules constituïdes per una única bicapa, amb un diàmetre de l'ordre de 1000 nm. El principal avantatge que ofereixen és que, degut al seu elevat espai aquós intern, són molt adequats per a la encapsulació de macromolècules, virus o substàncies molt hidròfiles.

En cada cas s'ha de seleccionar el tipus de liposoma més adequat, tenint en compte les característiques de la molècula a encapsular i la finalitat de l'estudi.

2. VITREORETINOPATIA PROLIFERATIVA

2.1. Característiques generals

L'ull està format per tres capes concèntriques de diferent natura. La capa més perifèrica és l'escleròtica, d'histologia fibrosa, que a la part anterior es transforma en una membrana transparent, la còrnea. La capa intermitja és la úvea, i es diferencia en tres parts: la coroides, que és la capa nutricia de la retina, el cos ciliar i l'iris, que té un orifici central, la pupilla. La retina és la membrana més interna, de natura nerviosa.

La patologia de la retina, tot i ser relativament poc freqüent, pot comprometre el mecanisme de la visió, el que li dona excepcional gravetat. Dins de les possibles afeccions destaca per la seva freqüència el desprendiment.

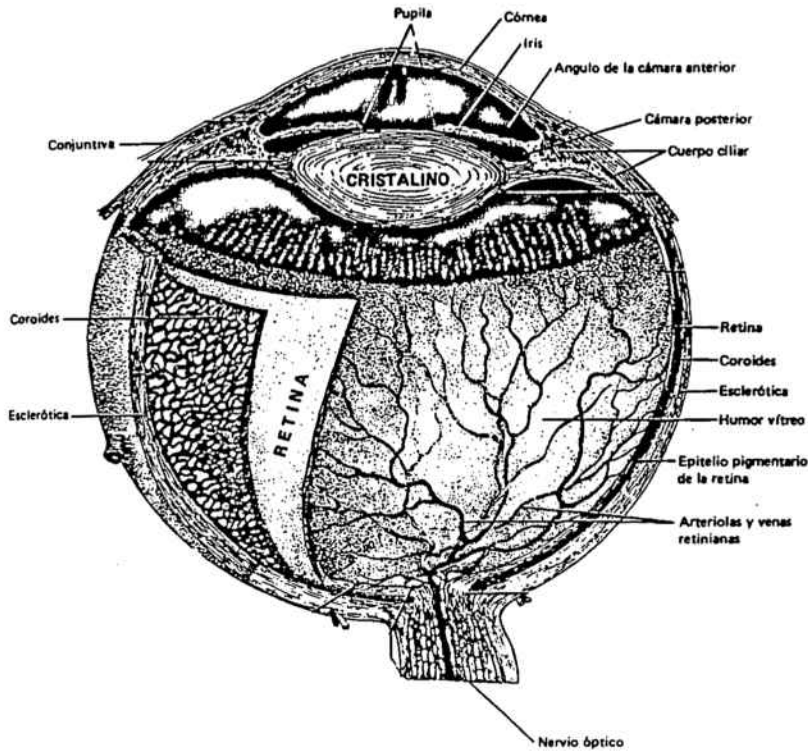


Figura 4. Esquema anatómic de l'ull humà.

La cirurgia del desprendiment de retina és efectiva en la majoria dels casos, de manera que el pronòstic d'aquesta patologia és molt favorable. Tot i això, una de les complicacions més freqüents és la formació de membranes fibrocel·lulars amb capacitat contràctil a la superfície de la retina després de la intervenció, que provoquen una tracció sobre la retina i reproduïxen el desprendiment. Aquest procés s'anomena proliferació vítreo-retiniana (PVR).

La proliferació cel·lular que es produeix és un mecanisme reparador del propi organisme a nivell de retina, similar al que es fa a nivell de ferides cutànies i que origina membranes fibrocel·lulars. Aquest procés comprén una migració i proliferació cel·lular que a nivell d'altres teixits, com la epidermis, tenen una intensa activitat, però limitada. En el cas de la PVR l'activitat cel·lular és persistent, com si hi hagués un estímul continuat. Per tant, la resposta proliferativa que intenta restablir la continuïtat retiniana es fa de forma desproporcionada i sense control i acaba generant una patologia pròpia, la PVR.

Ademés es produeix un procés d'adhesió de les cèl·lules proliferatives, ja sigui entre elles com amb la matriu extracel·lular. L'adhesió cel·lular és un procés biològic implicat en la formació de teixits, l'organogènesi i embriogènesi. També intervé en la recuperació i el manteniment de les funcions de l'organisme en estats inflamatoris, en l'hemostasi i en la cicatrització de ferides (21,22). Entre les principals molècules implicades en el procés d'adhesió hi ha la família de les integrines.

2.2. Tractament de la PVR.

En l'actualitat l'únic tractament efectiu de la PVR és la cirurgia vitreoretiniana, que intenta alliberar la retina de les membranes contràctils. L'inconvenient és que no s'inhibeix el procés proliferatiu i, que en alguns casos, l'intervenció pot ser l'estímul d'una nova proliferació cel.lular.

És per això que s'ha estudiat la utilització de citostàtics, ja que presenten una bona activitat antiproliferativa i poden actuar sobre la migració i contracció cel.lular amb bona efectivitat.

Les fluoropirimidinas han sigut la primera família de citostàtics utilitzats en el tractament de la PVR. Dins d'aquest grup destaca el 5-fluoruracil (5-FU), anàleg sintètic de la pirimidina, que ha estat administrat per diferents vies per tractar gran varietat de neoplàsies (23,24). Quan el procés proliferatiu es produeix a nivell ocular, la via sistèmica no és idònia ja que la toxicitat potencial sobre els teixits normals limita la seva dosificació de forma que no es poden obtenir concentracions efectives dins l'ull. Això fa que en aquests casos l'administració local sigui la més indicada (25).

El 5-FU a les cèl.lules dóna lloc a diferents metabòlits actius com la fluoruridina (5-FUR) i la fluorodesoxiuridina.

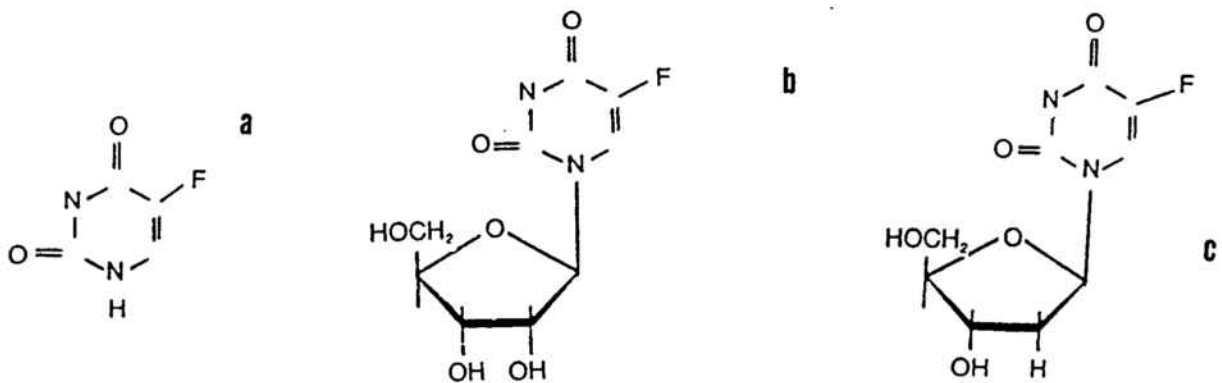


Figura 5: Fórmules químiques del 5-Fluoracil (a), 5-fluoruridina (b) i 5-fluordesoxiuridina (c).

S'ha realitzat múltiples estudis sobre la capacitat inhibidora en cultius cel.lulars d'aquestes pirimidines, comprovant-se que totes elles tenen efecte antiproliferatiu, amb el següent ordre d'eficàcia: fluorodesoxiuridina>fluoruridina>5-fluoruracil (26). Però només el fluoruracil i la fluoruridina presenten efecte anticontràctil, essent la fluoruridina la que presenta una potència més gran i la que requereix menor temps d'exposició (27).

Es va decidir utilitzar la 5-FUR com agent inhibidor de la proliferació vitreoretiniana ja que estudis *in vitro* van demostrar que era 100 vegades més potent que el 5-FU i només 10 vegades més tòxica, pel que el seu índex terapèutic era 10 vegades millor.

Com s'ha detallat a l'inici de la Introducció, l'administració de fàrmacs a nivell ocular presenta l'inconvenient de que la seva vida mitja és baixa, i s'ha de fer continuades administracions per poder mantenir una dosi terapèutica a l'ull. Per solventar aquest problema, s'ha assajat l'encapsulació de 5-FUR en liposomes, de manera que es produeixi una alliberament sostinguda del producte, reduint la freqüència d'administració (28).

L'utilització de liposomes comporta diferents avantatges farmacocinètics, ja que suposa una prolongació del temps d'exposició de les cèl.lules epiretinianes al fàrmac (29,30), i també toxicològics, perquè s'eliminen els pics inicials de concentració de citostàtic. (31).

3. PROLIFERACIÓ CEL.LULAR

Com ja s'ha indicat, en la PVR es produeix un procés de proliferació i adhesió cel.lular, que dóna origen a la patologia. En aquest procés hi ha implicades diferents proteïnes, entre les quals s'ha de destacar la fibronectina.

3.1. Fibronectina

La fibronectina és una glicoproteïna multifuncional que es troba de forma abundant a la matriu extracel.lular i al plasma. Té un important paper en la interacció entre les cèl.lules i la matriu extracel.lular així com amb altres substractes d'adhesió. Aquesta proteïna té diferents dominis, cada un dels quals té afinitat específica per diferents substàncies biològiques com són: fibrina, heparina, col.lagen o integrines (32,33).

Les integrines són una família de glicoproteïnes que actuen com a receptors a la superfície cel.lular i que intervenen en la migració i adhesió cel.lular mitjançant el reconeixement de la seqüència Arg-Gly-Asp (RGD) present a la fibronectina, fibrinogen i altres proteïnes cel.lulars d'adhesió presents a la matriu extracel.lular (34,35).

S'ha comprovat que en les cèl.lules proliferatives o tumorals augmenta l'expressió de les integrines, de forma que aquestes es troben presents a la seva superfície en major proporció que en cèl.lules normals. Aquest canvi és el responsable del augment de l'adhesió cel.lular en els processos proliferatius (36).

S'ha vist que els pèptids amb la seqüència RGD, en general inhibeixen la unió de les proteïnes d'adhesió amb el seu receptor, inhibint els processos d'agregació cel.lular. Si aquest pèptid s'incorporen a la superfície dels liposomes, els hi confereix la capacitat

d'enllaçar-se selectivament a les integrines, inhibint la seva activitat d'adhesió cel.lular, al mateix temps que fan un transport selectiu de la substància encapsulada al teixit proliferatiu, on les cèl.lules presenten una expressió del receptor molt més elevada que les cèl.lules dels teixits normals (37,38).

4. SÍNTESI DE PÈPTIDS EN FASE SÒLIDA.

4.1. Característiques generals.

La síntesi de pèptids en fase sòlida va ser introduïda per Bruce Merrifield el 1962 (39). Està basada en l'addició seqüencial d'aminoàcids protegits en el seu extrem α -amino a una matriu polimèrica insoluble convenientment funcionalitzada, de manera que la cadena peptídica creix en la direcció C \rightarrow N amb l'extrem C-terminal unit covalentment a la matriu.

Els avantatges més destacables de la síntesi en fase sòlida són:

- les reaccions d'elongació es produeixen amb molt bon rendiment.
- no hi ha pèrdues mecàniques de pèptid, ja que la peptidil-resina es manté al mateix recipient durant tota la síntesi.
- el pèptid és separat de la matriu polimèrica en una única etapa final, en la que també poden ser eliminats els grups protectors de les cadenes laterals.
- les operacions físiques requerides (rentat, filtracions, etc) són simples i susceptibles d'automatització.

En el present treball la síntesi s'ha fet seguint l'estratègia Fmoc/tBu (40), que consisteix en la protecció temporal dels grups α -amino amb el derivat 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc) i en la protecció semipermanent de les cadenes laterals dels aminoàcids amb funcions terbutil (mitjançant unions èter i ester), de forma que s'evita que interfereixin a les reaccions d'acoblament dels aminoàcids.

Els grups protectors utilitzats resisteixen les diferents condicions de treball durant la síntesi i poden ser posteriorment eliminats sense afectar els enllaços peptídics ni modificar la quiralitat de la molècula. El grup Fmoc és làbil a bases fortes, com la piperidina, mentre que la resta de grups protectors són làbils en medis àcids, per exemple en presència de l'àcid

trifluoroacètic. Això permet la desprotecció del grup amino, necessària per l'acoblament de cada aminoàcid, sense eliminar la resta de grups protectors. Al finalitzar la síntesi s'eliminen els grups protectors laterals i es desancora el pèptid de la resina, en una única etapa, mitjançant tractament àcid.

La síntesi de pèptids en fase sòlida es pot fer mitjançant un sistema de fluxe continu, en el qual la resina es troba en una columna per la que passen de forma continuada els reactius i els disolvents, o bé, en un sistema estacionari, en el que la resina està continguda en una xeringa amb filtre i els reactius i disolvents són afegits i eliminats de forma manual.

4.2. Formació de la cadena peptídica.

La unió dels Fmoc-aminoàcids per formar la seqüència peptídica es fa mitjançant enllaços amida. Aquesta reacció no es fa de forma espontània, sino que requereix l'activació del grup carbonil. Els reactius d'acoblament utilitzats en aquest treball són la diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) i el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt).

L'elongació de la cadena peptídica es realitza a través de successives etapes de desprotecció, eliminant el grup aminoprotector Fmoc amb piperidina/DMF 20%, i acoblament dels Fmoc-aminoàcids amb els reactius necessaris. Aquest procés es repeteix tantes vegades com aminoàcids tingui el pèptid.

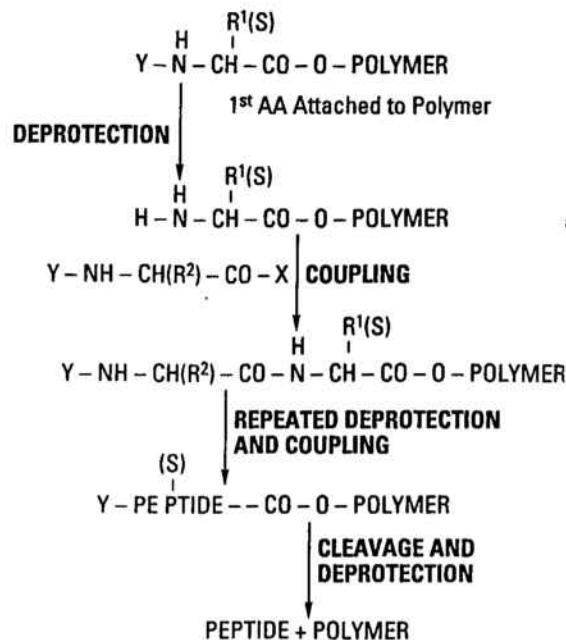


Figura 6. Esquema general de síntesi de pèptids en fase sòlida.

Un cop finalitzada la síntesi, s'elimina el grup amino-protector terminal. Seguidament es procedeix a desancorar el pèptid de la resina i a eliminar els grups protectors laterals dels aminoàcids trifuncionals mitjançant un tractament amb TFA i, depenent dels grups protectors presents a la seqüència peptídica, petits percentatges d'altres substàncies capturadores de carbocacions.

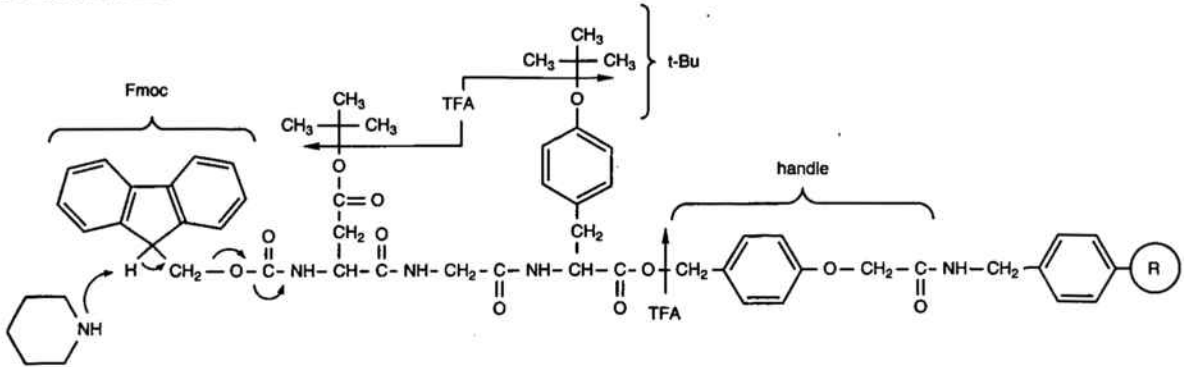


Figura 7: Esquema general dels grups protectors i la desprotecció i desancorament del pèptid.

4.3. Caracterització de les seqüències peptídiques.

Un cop finalitzada la síntesi, es procedeix a la purificació i posterior caracterització del producte obtingut. S'utilitzen diverses tècniques complementàries que permeten conèixer amb exactitud les característiques analítiques del producte:

-Anàlisi d'aminoàcids: és fonamental en la caracterització d'una seqüència peptídica, ja que dona informació sobre la seva composició qualitativa i quantitativa. L'anàlisi permet conèixer el contingut i la proporció dels aminoàcids presents a la mostra i la concentració amb la que es troba el pèptid.

-Cromatografia líquida d'alta pressió: permet determinar la puresa d'un pèptid. El sistema més freqüentment utilitzat per analitzar pèptids sintètics està constituït per una columna de fase reversa C-18, eluïda amb ACN/H₂O en diferents proporcions, als que s'addiciona petites proporcions de TFA (0.1% generalment) que actua com a contraió facilitant el treball en fase reversa.

-Espectroscopia de masses: la tècnica utilitzada en aquest treball ha estat l'electrospray, que proporciona informació sobre el pes molecular del pèptid sintetitzat, de manera que permet confirmar l'existència del producte desitjat a la mostra.

5. CARACTERITZACIÓ FISCOQUÍMICA DEL PÈPTID.

Com a complement del treball dut a terme amb els pèptids, va semblar convenient determinar les seves característiques fisicoquímiques que podien influir en la seva interacció amb els liposomes i en la estabilitat de les preparacions.

És per això, que es van fer dos tipus d'estudis: a) determinació de la seva capacitat per formar agregats, i b) activitat superficial dels pèptids.

5.1. Capacitat de formar micel·les.

La fluorescència és una tècnica ampliament utilitzada en estudis sobre l'estat d'ordenació de fosfolípids a les bicapes lipídiques i la influència d'altres substàncies, com els pèptids. També permet estudiar el comportament de substàncies amfifíliques en un medi aquós i la formació d'agregats macromoleculars.

Els marcadors fluorescents permeten realitzar determinacions de gran sensibilitat, són estables i relativament assequibles. Entre les sondes fluorescents es poden diferenciar aquelles que s'intercalen a la zona hidròfoba de la bicapa o de la estructura macromolecular i les que són solubles en la fase hidròfila. Aquesta diferent localització permet fer estudis selectius.

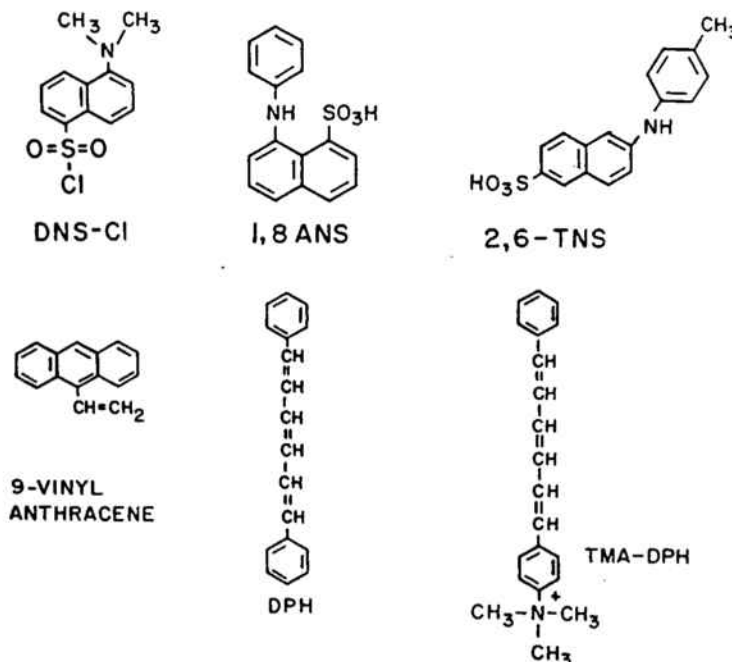


Figura 8. Estructura química d'alguns marcadors fluorescents.

Entre els marcadors lipòfils cal destacar el 1,6-difenilhexatriè (DPH), utilitzat en estudis de fluidesa de membrana, ja que s'integra a la regió hidròfoba permetent estudiar la seva viscositat i la mobilitat (41). En aquest treball el DPH s'ha utilitzat per avaluar si els diferents derivats hidròfobs del pèptid sintetitzats formen agregats micel·lars en medi aquós. Això és possible ja que el DPH sols dona fluorescència si les seves molècules es troben en un entorn hidròfob, tal com és el cas de les micel·les.

5.2. Activitat superficial dels pèptids.

L'activitat superficial dels pèptids es va determinar mitjançant la mesura de canvis en la tensió superficial de solucions aquoses.

El fenomen d'adsorció és produït per substàncies que en solució tenen la propietat de disminuir la tensió superficial del dissolvent, adsorbint-se les molècules en la interfase aire-aigua.

Quan una substància es dissol en un líquid originant una disminució de la tensió superficial, el solut s'acumula a la superfície, tenint una concentració més elevada que en la massa de la dissolució. La relació quantitativa entre la concentració superficial (a) de la substància disolta i la seva quantitat (c) en el líquid, ve donada per l'equació de Gibbs:

$$a = \frac{-c \, dy}{RT \, dc}$$

essent (dy) la variació de la tensió superficial per a una determinada variació de concentració (dc), (R) és la constant dels gasos i (T) la temperatura absoluta.

OBJECTIUS

II. OBJECTIUS

El present treball d'investigació es va plantejar amb la finalitat d'explorar la possible utilització de la 5-fluoruridina encapsulada en liposomes pel tractament de les vitreoretinopaties proliferatives.

Per això, tenint en compte els antecedents descrits a la introducció, es va seleccionar una sèrie de paràmetres

1. Es va decidir treballar amb liposomes tipus DRV, ja que tenen un espai aquós intern elevat, de forma que permeten obtenir bons rendiments d'encapsulació de substàncies hidrosolubles, com és el cas de la 5.FUR. Ademés les vesícules de gran diàmetre tenen semivides més elevades en l'ull.

2. Vectoritzar els liposomes amb la 5.FUR al lloc d'acció, mitjançant un fragment de la Fibronectina, proteïna implicada en els processos d'adhesió, que té per receptor les integrines, que es troben sobreexpressades a la superfície de les cèl.lules proliferatives.

3. Avaluar dues metodologies d'incorporació de pèptids i proteïnes a la superfície dels liposomes. A tal fi es va procedir a:

- a) sintetitzar i caracteritzar els pèptids requerits pel treball.
- b) optimitzar l'encapsulació de 5.FUR en liposomes.
- c) optimitzar la incorporació de pèptid a la superfície de liposomes seguint diferents metodologies.
- d) caracteritzar els pèptids des d'un punt de vista fisicoquímic pel que fa a la seva capacitat de formar agregats i d'interaccionar amb lípids.

4. Per estudiar la distribució dels liposomes a nivell ocular i veure la influència del pèptid a la seva superfície, es va decidir utilitzar preparacions liposòmiques amb un marcador fluorescent encapsulat soluble en aigua. Donada la seva ampla utilització i la seva alta polaritat, es va optar per la utilització de Carboxifluoresceïna com a sonda fluorescent.

MATERIALS I MÈTODES

III. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1. Disolvents i reactius

El cloroform i el metanol utilitzats en la preparació de liposomes van ser de qualitat analítica (*Merck*).

El citostàtic encapsulat en els liposomes va ser una solució de 5-fluoruridina (5-FUR) suministrada per *Sigma* en aigua Milli Q.

Els reactius per la síntesi de la N-glutarilfosfatidiletanolamina (NGPE) van ser: dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE) (*Sigma*), anhidrid glutàric (*Sigma*), trietilamina (*Fluka*) i cloroform de qualitat analítica (*Merck*). La diàlisi de la NGPE es va fer en solucions aquoses d'acetat sòdic i borax, ambdós de *Merck*.

Com a marcadors fluorescents es va utilitzar carboxifluoresceïna (CF) *Eastman Kodak* i 1,6-difenil-1,3,5-hexatriè (DPH) (*Fluka*).

Per hidratar la pel·lícula lipídica es va utilitzar aigua Milli Q i Ringer Lactat estèril (*Grifols*).

El detergent per a trencar els liposomes va ser Tritó^R X-100 (*Fluka*).

La síntesi de pèptids es va fer sobre una resina MBHA (Metilbencidrilamina) (*NovaBiochem*) com a matriu polimèrica insoluble.

Els disolvents per rentar i inflar la resina van ser: N-etildiisopropilamina (DIEA) (*Merck*), àcid trifluoroacètic (TFA) (*Fluka*), dimetilformamida (DMF) (*Scharlau*), diclorometà (DCM) (*Merck*) i èter dietílic (*Ferosa*).

Per les desproteccions del grup Fmoc es va utilitzar piperidina/DMF 20%, preparant la solució a partir de piperidina (*Aldrich*) i DMF (*Scharlau*).

Els reactius utilitzats en les reaccions d'acoblament dels Fmoc-aminoàcids van ser 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) i diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) de *Fluka*.

Per avaluar l'acoblament de cada Fmoc-aminoàcid es va utilitzar el test de ninhidrina. Els reactius per fer aquests assaigs es van preparar amb fenol i cianur potàssic (*Merck*), piridina (*Fluka*), ninhidrina (*Koch-Light Laboratories Ltd.*) i etanol absolut (*Panreac*)

En el desancorament de la cadena peptídica es va utilitzar àcid trifluoroacètic (TFA) (*Fluka*) i aigua Milli Q.

La fase mòbil de la cromatografia d'alta pressió es va preparar amb aigua Milli Q, acetonitril (*Merck*), TFA (*Fluka*) i Metanol (*Merck*).

La preparació de la solució de clorur sòdic al 0.9% es va fer amb clorur sòdic de la casa *Carlo Erba*.

En la reacció d'incorporació del pèptid a la superfície dels liposomes es va utilitzar etildimetilcarbodiimida (EDC) i N-hidroxisulfosuccinimida (NHS), ambdós de *Fluka*.

Els derivats hidròfobs del pèptid es van preparar amb àcid mirístic i àcid hexanoïc (*Sigma*).

Les solucions per ajustar el pH es van fer a partir d'àcid clorhídric fumant 37% (*Merck*) i hidròxid sòdic (*Carlo Erba*).

La determinació quantitativa de fosfolípids es va realitzar amb hidrogenfosfat monosòdic (*Merck*), molibdat sòdic (*Fluka*), àcid ascòrbic (*Fluka*) i àcid perclòric al 70% (*Merck*)

1.2. Lípids

Per la preparació de liposomes es va utilitzar: lecitina Egg phosphatides powder type V (*Asahi chemical Industry Co. Ltd; Tokio, Japan*) -barreja de fosfolípids d'ou, en la que el component majoritari és la fosfatidilcolina (>75%)- (PC), N-glutarilfosfatidiletanolamina (NGPE) -derivat sintètic de dipalmitoilfosfatidiletanolamina (*Sigma*) (PE)-, i Colesterol (*Sigma*) (Chol).

1.3. Aminoàcids

Els aminoàcids utilitzats en la síntesi del pèptid van ser suministrats per *Propeptide*. Tots ells tenen l'extrem amino protegit amb el grup 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc).

Els grups protectors de les funcions de les cadenes laterals dels Fmoc-aminoàcids van ser: 2,2,5,7,8-pentametilmroman-6-sulfonil (Pmc) per Fmoc-Arg i ter-butil (tBu) en Fmoc-Ser i Fmoc-Asp.

1.4. Solucions preparades

Per la síntesi del producte NGPE es van preparar les següents solucions:

-acetat sòdic pH=4.5 (50 mM); es van pesar 4.1 g d'acetat sòdic i es van disoldre en 1 L. d'aigua millipore, ajustant el pH amb HCl 1N.

-borat sòdic pH=8 (10 mM); 3.81 g de bòrax disolts en 1 L d'aigua millipore, ajustant el pH amb HCl 1 N.

La solució de borat pH=7.5 (50 mM) en la que es va disoldre el pèptid per incorporar-lo als liposomes es va preparar a partir de 19.2 g de borat sòdic en 1 L d'aigua, ajustant el pH amb NaOH 0.1 N.

La solució amortidora d'acetat sòdic, TAC (pH=7.4) es va obtenir disolent 2.05 d'acetat sòdic en 100 ml d'aigua. El pH es va ajustar amb àcid acètic 0.1 M.

1.5. Instrumentació

La pesada de mostra es va fer en una balança *Sartorius Analytic A 200S*.

Per la preparació de liposomes es va utilitzar una sonda d'ultrasons *VibraCell* (Sonics and Materials, Inc.), model VC 300, de 300 watts de potència, equipada amb una punta de titani de 13 mm de diàmetre i un bany d'ultrasons model GII2SP1T (*Laboratory Supplies Co, Inc.*); un rotavapor de la marca *Eyela*, amb el que es va evaporar els disolvents; una liofilitzadora *Telstar model Lioalfa*, que genera un buit de 10^{-1} mbars; i dos tipus de centrífuga: *Beckman model J2-21* (refrigerada a 4 °C) proveïda de rotor JA-20.1 i *Beckman GP Centrifuge*.

L'aigua emprada va ser purificada per un aparell Milli Q (*Millipore*).

Les determinacions de pH es van efectuar en un pHímetre *Crison microH 2001*, amb cèl.lula *Ingold*.

L'agitació mecànica es va realitzar mitjançant un *Vibromixer Mixo-tub model 30 (Gricel)* i l'agitació magnètica es va fer amb un agitador magnètic *Heidolf MR 2002*.

En les diferents incubacions en calor es va utilitzar un bany termostatitzat *Tempette TE-8A (Techne)*.

Les diàlisis es van realitzar amb membranes *Visking 2-18/32'' (Medicell International)* de tamany de porus 14000.

La placa calefactora per a la determinació de fosfolípids va ser una *Kowell T-1*

El tamany dels liposomes es va determinar per espectroscopia de correlació fotònica, amb un aparell *Malvern II-C Autosizer* (Malvern Instruments Ltd, GB).

Per a les mesures d'absorvència al UV es va utilitzar un espectrofotòmetre *Ultrospec II* (LKB-Biochrom).

Les mesures de fluorescència es van realitzar en un espectrofluorímetre *Perkin Elmer LS 50*, connectat a un ordinador *EPSON PC Ax2*, provist del programa FL Data Manager

La síntesi de pèptids es va fer en xeringues de polipropilè amb una placa filtrant de polietilè porós. Per l'agitació manual de la resina es va emprar una vareta de tefló.

L'estufa utilitzada va ser de la casa *Heraeus*.

Les anàlisis de cromatografia líquida d'alta pressió es van fer en el sistema *Merck-Hitachi L-6200 intelligent pump*, provist de l'injector *Rheodyne 7125* i amb detector de ultravioleta *Merck L-400*. El registre i la integració de les senyals es va realitzar amb un integrador cromatogràfic *Merck-Hitachi D-200*. També es va utilitzar el sistema *Perkin Elmer* consistent en una bomba binària *LC 250*, un detector de fotodiodes *LC 235*, un integrador *LCI-100* i un injector *Rheodyne 7125*.

Les anàlisis d'aminoàcids van ser efectuats pel Servei d'Anàlisi d'Aminoàcids del CID-CSIC de Barcelona, utilitzant la tècnica del PICO-TAGTM i norleucina com standard intern.

Els espectres de masses es van realitzar al Servei d'Espectroscopia de Masses del CID-CSIC de Barcelona mitjançant la tècnica del Electrospray.

1.6. Suports cromatogràfics.

En la cromatografia en capa fina es van utilitzar plaques de gel de sílice (*Merck*) de 0.2 mm d'espessor amb indicador fluorescent *Kiesegel 60 F254*.

En la cromatografia d'exclusió molecular per a la purificació de la carboxifluoresceïna es va utilitzar com a suport cromatogràfic *Sephadex LH-20* (*Pharmacia*).

La columna emprada per les determinacions per cromatografia líquida d'alta pressió va ser una *Spherisorb ODS C18* de fase reversa, de 25 x 0.4 cm, amb un diàmetre de partícula de 10 µm.

2.MÈTODES

2.1. Síntesi del pèptid A.1

Es va fer la síntesi de la seqüència peptídica GGRGDS-(NH₂), que vam anomenar pèptid A.1, de forma manual seguint el mètode en fase sòlida de Merrifield (1962).

Es va utilitzar una resina MBHA (Metilbenzidrilamina) amb un grau de funcionalització de 0.7 meq./gr de resina. L'esquema bàsic de protecció va ser del tipus Fmoc/tBu, emprant el grup Fmoc (làbil a piperidina/DMF) com a protecció temporal del grup α -amino dels aminoàcids i com a protectors semipermanents de les cadenes laterals dels aminoàcids, a fi d'evitar reaccions secundàries durant la síntesi, esters (Asp) o èters (Ser) tipus t-butílic (làbils al TFA). Un altre grup protector de cadenes laterals (Arg) va ser el pentametilmansulfonil (Pmc).

2.1.1. Rentat de la resina.

Es va pesar 1 gr de resina MBHA i es va preparar per fer la síntesi. Per això se li va fer un rentat previ, en el que es va seguir el següent protocol:

Pas	Reactiu/Disolvent	Repeticions	Temps
1	DCM	4	2'
2	TFA 40% /DCM	3	2'
3	TFA 40% /DCM	1	30'
4	DCM	5	1'
5	DIEA 5% /DCM	3	2'
6	DCM	5	1'
7	DMF	3	1'

2.1.2. Acoblament del "linker" AM i dels aminoàcids.

Tant el "linker" AM (àcid p-((R,S)- α -(1-(9H-Fluoren-9-il)-metoxiformamido)-2,4-dimetoxibencil)-fenoxacètic) con la resta d'aminoàcids es van incorporar a la resina com a derivats carboxílics lliures. Per a tots ells es va seguir el mateix protocol de desprotecció i incorporació, que es detalla a continuació:

Pas	Disolvent/Reactiu	Operació	Repeticions	Temps
1	DMF	Rentat resina	5	1'
2	pip/DMF 20%	Desprotecció α -amino	1	1'
3	pip/DMF 20%	Desprotecció α -amino	1	5'
4	DMF	Rentat	5	1'
		control de Ninhidrina; si + continuar, si - tornar a repetir pas 3.		
5	Fmoc-AA/HOBt/DIPCDI	Acoblament		40'
		control de Ninhidrina; si + deixar més temps, si - continuar pas 1.		

Tant els aminoàcids com els reactius de condensació es van utilitzar amb un excés molar de 2.5 vegades. En el cas del linker AM es va treballar amb un excés de 1.5.

Tots els reactius es van addicionar disolts en DMF, utilitzant la mínima quantitat de disolvent, amb l'objectiu d'aconseguir la màxima concentració de reactiu i accelerar el procés. Cada cicle d'incorporació d'un aminoàcid va transcórrer en 90 minuts aproximadament.

Avaluació dels acoblaments: Test de ninhidrina o de Kaiser.

Aquest assaig es fa per avaluar qualitativament l'extensió dels acoblaments, ja que permet detectar la presència de grups amino primaris en una resina.

Per realitzar aquest test s'utilitzen dos reactius:

-Reactiu A: es va preparar una dissolució en calent de 40 g de fenol en 10 mL de etanol absolut. Paral·lelament, es va preparar una solució de 65 mg de KCN en 100 mL d'aigua i d'aquesta solució es va dissoldre 2 mL en 100 mL de piridina acabada de destil·lar sobre ninhidrina. Ambdues solucions es van agitar per separat amb 4 g de resina Amberlite MB-3 durant 45 minuts. Finalment es van filtrar i es van mesclar.

-Reactiu B: es va fer la dissolució de 2.5 g de ninhidrina en 50 mL d'etanol absolut.

Finalitzat cada cicle de condensació, es va agafar una alíquota de resina en un tub de vidre i es va rentar diverses vegades amb DMF per centrifugació, quedant la resina al fons del tub. Se li va afegir 3 gotes del reactiu A i 2 gotes del reactiu B. Com a blanc es va utilitzar un segon tub que contenia les mateixes quantitats dels dos reactius. Es van escalfar els dos tubs en una estufa a una temperatura de 110 °C durant 3 minuts. Després es va refredar els tubs i es va observar la coloració que havien pres. El color blau indica l'existència de grups amino lliures (assaig positiu), i que l'acoblament és incomplet. Si, pel contrari, no hi ha canvi de coloració i persisteix el color groc-verdós, el test és negatiu, indicant que el rendiment d'incorporació del Fmoc-aminoàcid ha estat superior al 95%.

El test de Ninhidrina es va fer, además, després de cada desprotecció, per comprovar la total eliminació del grup Fmoc de l'últim aminoàcid incorporat. En aquest cas, havia de donar una coloració blava degut a la presència del grup amino lliure del aminoàcid.

2.1.3. Desprotecció i desancorament del pèptid.

Un cop addicionat l'últim aminoàcid, es va procedir a l'eliminació del grup Fmoc de l'extrem amino de la seqüència peptídica. El protocol que es va seguir per fer la desprotecció va ser el següent:

Pas	Reactiu/Disolvent	Repeticions	Temps
1	DCM	4	1'
2	DMF	4	1'
3	Pip/ DMF 20%	1	2'
4	Pip/ DMF 20%	1	15'
5	DMF	5	1'
6	DCM	5	1'
7	Èter	5	1'

Al final del tractament es va deixar la resina ben seca.

Per optimitzar les condicions de desancorament del pèptid de la resina i eliminar els grups protectors de les cadenes laterals, es va tractar de forma paral·lela dues al·lotes de la peptidil-resina seca, que es van posar en dos tubs de plàstic, amb dues solucions o “còctels” de desprotecció diferents. En un tub es va addicionar la solució A constituïda per 95% TFA i 5% H₂O i a l'altre la solució B composta per 95% TFA i 5% Fenol.

Es va deixar reaccionar durant 30 minuts en un bany de gel a 0°C i a continuació 90 minuts a temperatura ambient. Finalitzat el tractament, es va evaporar el TFA amb una corrent de N₂, i es va afegir èter fred als tubs, apareguent un precipitat corresponent al pèptid lliure. Es va centrifugar durant 5 minuts a 3000 rpm i es va decantar el sobrenadant. Aquest procés de rentat es va repetir 5 vegades. Finalment es van eliminar les traces d'èter al dessecador. A cada tub hi havia una barreja de pèptid lliure + resina. Per separar-los es va afegir una solució d'àcid acètic al 10% en la que es va disoldre el pèptid i es va recollir per filtració, a través d'una pipeta de vidre amb cotó a la punta. Es va aspirar el contingut del tub, de forma que a la pipeta només va passar el pèptid dissolt. Es va liofilitzar per obtenir el producte sòlid, que es va caracteritzar per HPLC.

Els resultats obtinguts en les proves de desancorament van fer que s'optés per la utilització del “còctel” A de desprotecció (TFA 95: H₂O 5). Seguidament es va procedir a desancorar 200 mg de peptidil-resina seguint el mateix protocol.

2.1.4. Caracterització i purificació del pèptid.

A continuació es detalla les tècniques utilitzades per caracteritzar el pèptid.

-Cromatografia líquida d'alta pressió.

Aquesta tècnica permet determinar la presència del pèptid sintetitzat a la mostra, i també obtenir unes bones condicions de separació del pic corresponent de la resta de possibles impureses, a fi de poder fer una posterior purificació.

Es va treballar amb una mostra d'una concentració aproximada de 1 mg/mL de pèptid en aigua. Els eluents emprats va ser barreges d'ACN i H₂O amb un 0.1% de TFA amb un fluxe de 1 mL/min. La detecció es va fer a 220 nm. La columna utilitzada va ser una C18 de fase reversa.

Un cop determinades les condicions en les que el pic del pèptid apareixia aïllat de la resta de pics, corresponents a una fase mòbil isocràtica amb un 5% d'ACN a un fluxe de 1 mL/min, es va procedir a la seva purificació, fent repetides injeccions de mostra que van ser recollides selectivament.

-Anàlisi d'aminoàcids.

Permet conèixer els aminoàcids que constitueixen el pèptid i la seva proporció. L'anàlisi es va fer mitjançant la tècnica PICO-TAGTM, en la que hi ha una hidròlisi prèvia de la mostra. Es va utilitzar Norleucina, aminoàcid no inclòs a la seqüència, com patró intern per poder quantificar el percentatge de recuperació de la hidròlisi.

-Espectrometria de masses: electrospray

Es va utilitzar aquesta tècnica per determinar de forma exacta el pes molecular del pèptid sintetitzat i purificat i comprovar que es corresponia amb el teòricament calculat.

Per fer l'anàlisi es va preparar una disolució del pèptid en aigua amb una concentració de entre 100 i 200 pmol/ μ L.

2.2. Síntesi dels derivats hidròfobs del pèptid.

Es va preparar dos derivats hidròfobs del pèptid A.1. mitjançant l'addició de dos àcids grassos a l'extrem amino del pèptid, l'àcid hexanòic i l'àcid mirístic. D'aquesta manera es va obtenir una molècula amfifílica amb una part polar, corresponent al pèptid, i una cadena alquíllica apolar.

Es va fer una síntesi en fase sòlida, unint l'àcid gras a l'extrem amino del pèptid, amb una reacció d'acoblament similar a la realitzada per a la resta d'aminoàcids. El protocol que es va seguir va ser el mateix pels dos derivats peptídics.

Es va partir de 300 mg de peptidil-resina a la que se li va fer el següent tractament de rentat i desprotecció:

Pas	Disolvent/Reactiu	Operació	Repeticions	Temps
1	DCM	Inflat resina	3	1'
1	DMF	Rentat resina	4	1'
2	pip/DMF 20%	Desprotecció α -amino	1	1'
3	pip/DMF 20%	Desprotecció α -amino	1	15'
4	DMF	Rentat	5	1'

control de Ninhidrina; si + continuar, si - tornar a repetir pas 3.

Un cop es va tenir el grup aminoterminal lliure, mantenint els grups protectors de les cadenes laterals, es va procedir a l'acoblament de l'àcid gras. Per això es va utilitzar un excés de 2.5 vegades, tant de l'àcid gras com dels reactius DIPCDI i HOBt, incorporant-se disolts en poca quantitat de DMF. Es va deixar reaccionar a temperatura ambient, amb agitació ocasional durant 2 hores, i es va fer el test de ninhidrina, que en els dos casos va donar negatiu, indicant que l'acoblament havia estat complert.

A continuació es va fer un nou tractament de rentat i secat de la resina: primer amb DMF durant 1' (4 vegades), després amb DCM 1' (3 vegades) i finalment es va secar fent passar èter durant 1' (x3). Per assecar la resina totalment es va deixar al dessecador.

El següent pas va ser l'eliminació dels grups protectors de les cadenes laterals del pèptid i el desancorament del derivat peptídic de la resina. Això es va fer en un sol pas, mitjançant el tractament un còctel de TFA 95: H₂O 5 (v/v), seguint el mateix procediment que s'ha detallat a l'apartat 2.1.3.

Finalitzada la síntesi i desancorament dels derivats hidròfobs es va procedir a la seva caracterització. Per fer-ho es va utilitzar la *cromatografia líquida d'alta pressió*, ajustant convenientment les condicions d'elució i purificació dels derivats peptídics, *l'anàlisi d'aminoàcids i l'electrospray*. Aquestes tècniques han estat detallades a l'apartat 2.1.4.

2.3. Estudis fisicoquímics del pèptid A.1 i els seus derivats.

A fi de definir el caràcter fisicoquímic dels pèptids es va determinar la seva capacitat de formar micel·les i l'activitat superficial.

2.3.1. Estudi de la formació de micel·les.

Es va estudiar el comportament en medi aquós del pèptid A.1 i els seus derivats hidròfobs per determinar si formaven agregats macromoleculars. Per això es va mesurar la seva interacció amb DPH, sonda fluorescent que interacciona amb estructures hidròfobes.

Es va preparar solucions dels pèptids amb una concentració aproximada de 10^{-5} M. Es va agafar 20 μ L d'aquestes solucions en una cubeta de quars i es van diluir en 3 mL de TAC. Es va addicionar una solució de DPH, preparada per dissolució de 100 μ L de solució mare de DPH en 20 mL de TAC, i es va deixar 10 minuts en agitació magnètica. Les mesures d'intensitat de fluorescència es van fer a temperatura ambient, a una longitud d'ona d'excitació de 365 nm. i d'emissió de 425 nm. Com a referència es va utilitzar la mateixa solució en absència de pèptid.

2.3.2. Activitat superficial.

En les mesures de l'activitat superficial es registra l'increment de pressió superficial produït per l'absorció a la superfície de substàncies previament disoltes a la solució. Aquest procés s'estudia en funció del temps.

Es va omplir una cubeta circular amb 70 mL de solució tampó PBS (pH=7.4), i es van accionar els agitadors magnètics, posant a continuació la làmina de Wilhelmy en contacte amb la superfície de la solució. Seguidament es va injectar a la subfase, mitjançant una xeringa, diferents volums de cada solució de pèptid preparada. En tots els casos es va estudiar l'increment de pressió superficial durant 60 minuts.

2.4. Síntesi de la N-glutarilfosfatidiletanolamina (NGPE)

Es va partir de 280 mg de dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE) i 420 mg d'anhídrid glutàric, disolts en 30 mL de cloroform. A la solució es va afegir lentament i sota agitació 550 µL de trietilamina, per obtenir una solució transparent amb un pH bàsic entre 7 i 8.

Es va deixar la barreja en agitació durant 6 h a temperatura ambient, protegint-la de la humitat amb un colze de CaCl₂ insertat a la boca del matrau.

Per controlar l'evolució de la reacció es va fer cromatografies de capa fina, utilitzant una placa de sílica com a fase estacionària, com a eluent una barreja de cloroform, metanol i aigua (6.3:3.5:0.4 v/v/v) i revelant amb vapors de iode, ninhidrina i toluidina. Es va considerar la reacció finalitzada quan no va aparèixer cap taca violeta corresponent a DPPE sense reaccionar al revelar amb ninhidrina.

Per purificar el producte es va fer diàlisi, utilitzant una membrana de tamany de porus de 14000. Es va utilitzar 3 disolvents amb el següent ordre:

- solució d'acetat sòdic 50 mM a pH=4.5,
- solució de borat sòdic 10 mM a pH=8,
- aigua millipore.

Es va fer una nova cromatografia de capa fina per comprovar la puresa del producte final. Seguidament es va evaporar els disolvents, primer al rotavapor i després liofilitant. La NGPE obtinguda es va redissoldre en cloroform i es va guardar al congelador. Per conèixer exactament la concentració de les solucions obtingudes es va quantificar per anàlisi de fòsfor inorgànic, seguint el mètode de McClare (apartat 2.7.2).

2.5. Purificació de la Carboxifluoresceïna.

La purificació de la carboxifluoresceïna (CF) es va fer per cromatografia en columna seguint el mètode descrit per Leserman i Barbet (42).

Com a suport cromatogràfic es va utilitzar una columna de 25 x 2.5 cm amb una resina Sephadex LH20. La resina havia estat conservada en azida, per tant es va rentar per decantació amb aigua unes 7 vegades abans de ser utilitzada. Seguidament es va omplir la columna amb la resina i es va anar passant aigua millipore.

Es va preparar una disolució de CF en aigua. Per això es va pesar 1.6 mg de CF i es va disoldre en 5 mL d'aigua amb ajuda de NaOH sòlida, en agitació continua. Finalment es va ajustar el pH a 7.5 amb HCl 1 N.

A continuació es va introduir la solució de CF a la part superior de la columna i es va anar afegint lentament aigua com a eluent. En el moment en què van començar a eluir mostres colorejades es va anar recollint fraccions de 10 ml en tubs de plàstic. Els tubs que contenien solució de color entre vermell i taronja, corresponent a la CF pura, es van congelar i liofilitzar. La CF purificada es va conservar en tubs de vidre topazi a 4 °C.

2.6. Preparació de liposomes amb 5-Fluoruridina

2.6.1. Liposomes amb 5-fluoruridina.

Es van preparar liposomes DRV ("Dried Reconstituted Liposomes") seguint el mètode descrit per Kirby i Gregoriadis (1984) (43). Es va pesar 25 mg de PC Asahi i 12.5 mg de Chol, de forma que la relació molar va ser 1:1, i es va disoldre en una barreja de cloroform i metanol (2:1 v/v). Es va agitar bé i es va evaporar els disolvents al rotavapor, mantenint la temperatura del bany a 55 °C, fins a obtenir una fina pel·lícula de lípid sec a la paret del matrau. Després es va liofilitzar les mostres durant 1 hora per eliminar les traces de disolvent.

A continuació es va hidratar els lípids amb 2 ml d'aigua millipore, es va agitar i es va deixar en repòs en un bany a 55 °C durant 1 h., agitant eventualment al vibromixer. D'aquesta manera es van formar liposomes multilaminars grans (MLV).

Les preparacions es van sotmetre a sonicació amb una sonda d'ultrasons, durant un període de 2 min, seguit de 1 min de repòs en atmosfera de nitrogen. Aquest procés es va repetir 6 vegades, mantenint els liposomes a 55 °C mitjançant un bany. Així es va transformar les mostres en liposomes unilaminars petits (SUV), que van ser centrifugats

durant 10 minuts a 3000 rpm per separar les possibles partícules de Titani despreses per la sonda.

Seguidament es va afegir als liposomes 2 ml d'una solució de 5-FUR en aigua, amb una concentració de 10 mg/ml. Es va homogeneitzar bé la barreja, i després es va congelar i liofilitzar durant 24 hores. A continuació es va rehidratar, primer amb 0.1 ml d'aigua millipore, després amb 0.05 ml i 0.4 ml de Ringer Lactat. Després de cada hidratació, es va deixar un període de repòs de 30 min a 55°C, agitant al vibromixer cada 10 min.

Es va afegir 4 ml més de Ringer Lactat a les mostres i es va separar l'excès de 5-FUR que no havia quedat encapsulada als liposomes mitjançant 3 centrifugacions i decantacions successives a 20.000 rpm, a 4°C i durant 25 min. Finalment, es va resuspendre els liposomes en un volum de 1.5 ml de Ringer Lactat.

2.6.2. Liposomes amb 5-fluoruridina i derivat hidròfob del pèptid A.1.

Es va seguir el mateix protocol de preparació que pels liposomes descrits a l'apartat anterior, incorporant els derivats hidròfobs del pèptid a la barreja lipídica inicial. Això va ser possible degut a la natura amfifílica dels derivats hidròfobs, que s'orienten amb la part polar al medi aquós extern i la part apolar dins la bicapa lipídica, com un fosfolípid més.

Es va preparar tres lots de liposomes: un amb el derivat A.1.Mirístic, l'altre amb A.1.Mirístic-PMC i finalment un amb A.1.Hexanòic. En cada lot es va preparar quatre tipus de liposomes: un blanc (amb 5-FUR però sense el pèptid) i tres preparacions a les que es va afegir quantitats creixents del derivat hidròfob, que van ser previament ajustades per evitar la desestabilització dels liposomes.

Així doncs, la composició inicial de les quatre preparacions liposòmiques va ser de 25 mg de PC i 12.5 mg de Chol, i es va addicionar a la barreja lipídica 0.5 mg, 1 mg i 2 mg del derivat d'A.1 dissolt en metanol respectivament, de manera que es va obtenir tres mostres amb diferents quantitats de derivat peptídic i una constituïda únicament per lípids. En el cas de A.1.Mirístic la relació molar en les preparacions va ser, en ordre creixent de derivat addicionat: 1.1%, 2.2% i 4.3%. El percentage d' A.1.Mirístic-PMC respecte els fosfolípids totals va ser del 0.8% , 1.6% i 3.2%. I per A.1.Hexanòic la proporció de derivat va representar el 1.3%, 2.6% i 5.16% molar.

Es va homogeneitzar bé la barreja lipídica amb el pèptid, tot dissolt en una barreja de CHCl₃ i MeOH (2:1), i es va formar la pel·lícula per evaporació dels disolvents. A partir d'aquests punt el protocol que es va seguir va ser el mateix que en l'apartat anterior (2.1.1), obtenint liposomes DRV amb 5.FUR encapsulada a l'interior i pèptid A.1 a la superfície. Aquestes preparacions van ser posteriorment caracteritzades.

2.6.3. Liposomes amb 5-fluoruridina i pèptid A-1 unit covalentment.

Es va pesar 12.5 mg de PC Asahi, 6 mg de Chol i 2,7 mg de NGPE, amb una relació molar de 4.5:4.5:1 (Pc/Chol/NGPE) i es va disoldre en cloroform i metanol (2:1 v/v). Es van evaporar els disolvents, primer al rotavapor i després liofilitzant durant 1 h.

Seguidament es va afegir 1 mL d'aigua millipore a la pel·lícula lipídica obtinguda, es va agitar i es va deixar 1 h de repòs a 55°C, formant-se liposomes grans.

Per obtenir SUV, es va sonicar la mostra 6 vegades en un bany d'ultrasons durant 2 minuts, seguits de 5 minuts de repòs a 55°C. A continuació es va afegir 1 mL de solució de 5-FUR 10 mg/ml. Es va homogeneitzar i es va congelar i liofilitzar 24 h.

Per rehidratar la mostra es va afegir succesivament 0.1 mL d'aigua millipore, 0.05 mL i 0.2 de Ringer Lactat. El procés es va fer mantenint els liposomes a una temperatura de 55°C durant 30 minuts en cada addició, i agitant cada 10 minuts.

El pèptid s'incorpora a la superfície dels liposomes enllaçant-se covalentment amb el grup carboxil de la NGPE. Per fer la reacció es va ajustar el pH de la mostra a 5.5 amb una solució de HCl 0.012N i es va afegir 37 mg de etildietilcarbodiimida (EDC) i 18 mg de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) com a activadors de la reacció. Es va deixar 10 minuts incubant a temperatura ambient. A continuació es va neutralitzar el pH a 7.5 amb NaOH 0.1N.

Es va preparar varis lots de diferents tipus de liposomes, en els quals es va modificar la quantitat de pèptid addicionat a cada preparació. En cada lot es va preparar una mostra sense pèptid que es va utilitzar com a blanc, i 3 mostres més amb una quantitat creixent de pèptid, corresponents a 1mg, 1.5 mg i 2 mg d' A.1 disolt en solució borat a pH 7.5. Es va deixar la reacció durant 1 nit a la nevera.

Per eliminar la 5.FUR no encapsulada i l'excès de pèptid es va fer una diàlisi front 1L de solució NaCl 0.9%, utilitzant una membrana amb tamany de porus de 14000.

Finalment es van recollir els liposomes en un tub, ajustant el volum final a 1.5 mL amb Ringer Lactat.

2.7. Caracterització dels liposomes.

2.7.1. Determinació de l'eficàcia d'encapsulació de la 5-fluoruridina.

Per expressar aquest paràmetre s'ha utilitzat el percentatge d'encapsulació, calculat a partir del quocient entre la quantitat de fàrmac contingut en l'interior dels liposomes al final del procés i la quantitat inicial addicionada, i la relació fàrmac-fosfolípid a les preparacions finals, expressada en mg 5-FUR/ μ mol de PL.

La determinació quantitativa del contingut de 5-fluoruridina en les preparacions liposòmiques es va realitzar per *cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC)*. La fase mòbil va estar constituïda per una barreja de metanol i aigua (5:95), amb un fluxe constant de 1 mL/min. Com a fase estacionària es va emprar una columna Spherisorb ODS 2, de tamany de partícula de 10 μ m (25 x 0.4 cm). La detecció de la 5-FUR es va fer per absorció al ultravioleta a una longitud d'ona de 268 nm.

La quantificació de 5-FUR es va fer seguint el mètode del patró extern, a partir de les àrees dels pics corresponents al fàrmac.

Es va determinar la concentració de 5-FUR continguda en les mostres de liposomes, diluint previament 1/10 i injectant 20 μ L de mostra en cada anàlisi. També es va mesurar el fàrmac lliure present en el sobrenedant de cada una de les centrifugacions fetes per purificar els liposomes, o de l'aigua de diàlisi en els casos en què es va seguir aquesta tècnica de purificació.

2.7.2. Determinació quantitativa de fosfolípid.

Es convenient conèixer la concentració exacta de lípid als liposomes finals, ja que durant la preparació pot haver-hi pèrdues en diferents punts del procés, com pot ser la formació de petits aerosols al sonicar, pèrdues al transvassar continguts, en les centrifugacions i diàlisi, Per fer aquesta determinació es va seguir el mètode de McClare (44) que quantifica el fosfolípid de forma indirecta, valorant el contingut de fòsfor a la mostra colorimètricament.

Els reactius utilitzats van ser:

-Solució patró de fosfats: El patró inorgànic va ser NaH_2PO_4 secat a 110°C fins a pes constant. Es va utilitzar una solució d'aquesta sal en aigua amb una concentració de 14.48 μ g/ml (equivalent a 3.16 μ g/mL de fòsfor).

-Solució A: Es va pesar 2 g de molibdat amònic i es va disoldre en aigua. Se li va afegir 16 mL d'àcid perclòric al 70% i es va afegir més aigua fins a un volum final de 120 mL.

-Solució B: Es va disoldre 2 g d'àcid ascòrbic en 80 mL d'aigua.

El mètode d'anàlisi que es va seguir va ser:

Primer es va preparar la corba patró, afegint quantitats creixents de solució patró a tubs de Pyrex: 0.25, 0.5, 0.75, 1 i 1.5 mL. Ademés es va preparar tubs amb la mostres de liposomes (10 o 20 μ L segons la seva concentració de fosfolípids), de manera que el contingut de fòsfor aproximadament a cada tub fos de 50 μ g. Totes les mostres es van determinar per duplicat.

Seguidament es va evaporar els disolvents continguts als tubs en una placa calefactora a 220 °C durant uns 10 minuts. Es va afegir 0.5 mL d'àcid perclòric a cada tub i es van carbonitzar les mostres a la placa calefactora a 220°C durant 30 minuts.

A continuació es va barrejar lentament la solució A i la B i es va afegir 9.5 mL de la solució A+B a cada tub. Es va agitar bé i es va deixar 1 hora a un bany a 55 °C. Finalment es va deixar refredar els tubs i es va determinar la seva absorvència a 825 nm, establint un valor de referència amb un blanc que contenia únicament els reactius.

2.7.3. Determinació del tamany dels liposomes.

El tamany promig de les preparacions liposòmiques es va determinar per espectroscopia de correlació fotònica.

Aquesta tècnica es basa en l'anàlisi de les fluctuacions de la intensitat de la llum dispersada d'un raig làser que es fa incidir en la mostra problema; aquestes fluctuacions es deuen al moviment Brownià de les partícules en suspensió. La llum dispersada és recollida per un fotomultiplicador situat a un angle de 90 ° respecte la llum incident.

Per fer la mesura es va diluir la mostra convenientment amb solució salina isotònica i es va mantenir constant la temperatura a 25 °C per evitar fluctuacions en la viscositat de la solució.

2.7.4. Determinació del pèptid incorporat als liposomes.

Per quantificar el pèptid present als liposomes al final del procés, tant en el cas del pèptid unit per enllaç covalent a NGPE com en els derivats hidròfobs, es va realitzar un Anàlisi d'Aminoàcids seguint la tècnica PICO-TAGTM.

2.8. Liposomes amb Carboxifluoresceïna.

2.8.1. Liposomes MLV amb CF.

Es va pesar 25 mg de PC Asahi, 12.5 mg de Chol i 5.5 mg de NGPE i es va disoldre en una barreja de CHCl₃: MeOH (2:1). Es va homogeneitzar bé i es va evaporar els disolvents, primer al rotavapor a 55°C i després durant 1 hora a la liofilitzadora.

A continuació es va preparar una solució 100 mM de CF en aigua, pesant 75.26 mg de CF en 2 mL i es va ajustar el seu pH a 7 amb una solució de HCl 0.1 N. Amb aquesta solució es va hidratar la pel·lícula lipídica, agitant al vibromixer fins a tenir una solució homogènia i es va mantenir 55 °C durant 1 h, amb agitacions eventuais. D'aquesta manera es van formar liposomes MLV amb CF encapsulada a l'interior.

Per eliminar l'excés de CF del medi aquós extern, es va afegir 5 ml de solució salina isotònica (NaCl 0.9%) a la mostra i es va rentar per centrifugació a 20.000 rpm durant 25 minuts a 4 °C. Es va decantar el sobrenadant, i amb els liposomes sedimentats es va tornar a repetir el procés. Per completar la eliminació de la CF no encapsulada, es va fer una diàlisi front 1 L de solució de NaCl 0.9%. El volum final dels liposomes obtinguts va ser de 2 mL.

2.8.2. Liposomes DRV amb CF i pèptid A.1.

Aquests liposomes van ser preparats seguint el protocol descrit a l'apartat 2.6.3. La seva composició de lípids va ser la mateixa: 25 mg PC Asahi, 12.5 mg Chol i 5.5 mg de NGPE, però en aquests cas el procés d'hidratació de la pel·lícula lipídica es va fer amb 2 mL de una solució 100 mM de CF amb un pH de 7.2, obtinguda per disolució de 75.26 mg de CF en 2 mL d'aigua.

Els processos de sonicació, liofilització, rehidratació i d'unió del pèptid es van fer segons els mètodes descrits en l'apartat 2.6.3. Per fer la reacció d'unió del pèptid es va partir de 3.12 mg de pèptid A.1 i de les mateixes quantitats descrites d'activadors de la reacció (37 mg d'EDC i 18 mg de NHS).

L'eliminació de l'excés de CF es va fer rentant amb Ringer Lactat mitjançant 3 centrifugacions successives durant 25 minuts a 20.000 rpm i 4°C de temperatura. Seguidament es va fer una diàlisi dels liposomes front NaCl 0.9%, durant 12 hores. Finalment es va enrasar el volum de la preparació a 2 mL amb Ringer Lactat.

2.9. Avaluació de la carboxifluoresceïna encapsulada en liposomes.

Per determinar l'encapsulació de CF en liposomes es va mesurar la seva Latència.

Per això es va agafar alíquotes de les preparacions liposòmiques (10 a 25 µL segons la seva concentració) i es van diluir convenientment amb NaCl 0.9%. Es va homogeneitzar i es va llegir la fluorescència inicial (F_0) al espectrofluorímetre. Seguidament s'addicionà 50 µL de Tritó^R X-100 (que no té fluorescència intrínseca significant) a cada cubeta i es va agitar bé. D'aquesta manera es va trencar els liposomes i alliberant tota la CF continguda al seu interior. Es va tornar a mesurar a l'espectrofluorímetre obtenint un valor corresponent a la fluorescència total (F_T).

Per saber el percentatge de CF que s'havia perdut de l'interior dels liposomes es va aplicar la fórmula:

$$\text{Latència: } \frac{F_T - F_0}{F_T} \times 100$$

RESULTATS I DISCUSSIÓ

IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. ELECCIÓ DEL PÈPTID A.1

Tal i com s'ha indicat a la introducció, a la superfície de les cèl·lules existeixen uns receptors anomenats integrines que intervenen en diferents processos d'adhesió mitjançant el reconeixement de la seqüència RGD, que està present a la fibronectina, fibrinogen, laminines i d'altres proteïnes relacionades amb l'adhesió.

Atés que en el procés de proliferació que estem estudiant intervenen algunes d'aquestes proteïnes, es va decidir treballar amb aquesta seqüència a fi de:

- a) direccionar els liposomes amb 5-FUR cap a les cèl·lules que expresen els seus receptors, i
- b) al mateix temps inhibir l'adhesió per ocupació dels receptors amb la seqüència RGD.

Tenint en compte el tamany del pèptid vàrem creure convenient allargar-lo amb dues glicines a fi de que sobresortís més de la superfície del liposoma i pogués així ésser reconegut més fàcilment pels receptors de membrana. Així doncs, la seqüència sintetitzada va ser GGRGDS(NH₂).

Així mateix, per millorar la seva afinitat per la bicapa lipídica, es van preparar derivats hidròfobs unint un residu d'àcid hexanòic i àcid mirístic al grup aminoterminal; d'aquesta manera, la incorporació del pèptid al liposoma es podria dur a terme de forma més senzilla, utilitzant-lo com a un component més de la capa lipídica, la qual cosa suposaria un estalvi de temps i manipulació.

2. PÈPTID A.1

2.1. Síntesi

La síntesi del pèptid A.1 es va realitzar de forma manual seguint el protocol de síntesi de pèptids en fase sòlida amb estratègia Fmoc/tBu.

Es va treballar amb una resina p-metilbenzidrilamina, que és la habitualment utilitzada en la síntesi de pèptids-amida amb el mètode Fmoc. Interessava obtenir un pèptid amb un extrem amino i l'altre extrem amb un grup amida, enlloc de carboxil, de forma que el pèptid,

que només està constituït per 6 aminoàcids, tingués una estructura més similar a una resta proteïca amb un enllaç peptídic terminal. Per això es va unir al grup amino de la resina el "linker" Fmoc-AM, que en el tractament de desancorament es trenca deixant un grup amino unit a l'extrem carboxiterminal del pèptid.

2.1.1. Incorporació del "linker" Fmoc-AM.

Es va partir de 1 g de resina p-MBHA, amb un grau de funcionalització de 0.7 meq/g. En la incorporació del "linker" Fmoc-AM es va treballar amb un excés de 1.5, degut a l'elevat preu del producte. La reacció d'unió del linker va ser la mateixa que la d'incorporació dels aminoàcids. Després de 90 minuts de reacció, es va fer el test de Ninhidrina, que detecta l'existència de grups amino lliures. Va aparèixer una coloració blava, indicativa de que el resultat era positiu i que quedaven grups reactius de la resina lliures. Com que la incorporació del "linker" AM no havia estat complerta, es va rentar la resina i es va repetir la reacció, que es va deixar durant una nit. Es va realitzar novament el test de ninhidrina, que en aquesta ocasió va donar negatiu.

2.1.2. Incorporació de la resta de Fmoc-aminoàcids.

Les quantitats necessàries de cada Fmoc-aminoàcid i dels reactius d'acoblament (HOBt i DIPCI) es van calcular a partir del grau de funcionalització de la resina i dels seus pesos moleculars, afegint-se un excés de 2.5 vegades.

Abans de començar cada acoblament es va desprotegir la funció amino de l'últim Fmoc-aminoàcid incorporat amb una solució de piperidina/DMF 20%. Per comprovar que l'eliminació del grup protector era total es va realitzar el test de ninhidrina, que en aquest cas havia de donar una coloració blava, indicant la presència de grups amino lliures preparats per a la incorporació del següent Fmoc-aminoàcid.

El temps mig de cada reacció d'acoblament va ser de 60 minuts. Després es va realitzar la prova de ninhidrina per confirmar si l'acoblament s'havia produït de forma complerta. Quan el resultat era negatiu, el color groc indicava absència de grups amino lliures, s'afegia el següent Fmoc-aminoàcid.

Al finalitzar la síntesi, la seqüència d'aminoàcids continuava unida a la resina amb l'últim extrem amino protegit, a l'igual que els grups laterals. Es va rentar bé la columna i es va assecar, primer addicionant èter i després al dessecador fins a tenir pes constant. Es va pesar la peptidil-resina, que va tenir un pes de 2.32 g, i es va calcular el rendiment, per diferència respecte el pes teòric esperat.

Pes real= 2.32 g

Pes teòric= Pes resina + Pes pèptid protegit = 1 g + 1 g resina x $\frac{0.72 \text{ meq}}{1 \text{ g resina}} \times \frac{1.477 \text{ g}}{1 \text{ meq pèptid}} = 1.83 \text{ g}$

Rendiment= $\frac{2.32}{1.83} \times 100 = 126.8 \%$

El rendiment obtingut va ser superior al 100 %. Això és degut a que les resines tenen un grau de funcionalització variable, segons les condicions de fabricació. Es va considerar que la resina utilitzada tenia una funcionalització de 0.7 meq/g, però el resultat obtingut indicava que el nombre de punts reactius reals per gram de resina era superior del esperat, podent-se sintetitzar més quantitat de pèptid.

2.2. Desprotecció i desancorament

Realitzada la síntesi, es va procedir al desancorament del pèptid i a la desprotecció de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals.

Inicialment es va fer proves per determinar el còctel de desancorament idoni i el temps de reacció necessari. Per això es va partir d'una alíquota de peptidil-resina i se li va fer un tractament amb piperidina/DMF 20% per eliminar el grup amino protector Fmoc. Es va controlar que la desprotecció fos total amb el test de ninhidrina, que va donar un color blau intens.

Un cop la peptidil-resina va estar desprotegida i seca, es va agafar dos fraccions de 15 mg cada una i es van posar en un tub. Cada un d'ells es va tractar amb un còctel de desancorament diferent. En un es va addicionar una solució de TFA 95%:H₂O 5% (Còctel A) i a l'altre una solució formada per TFA 95%: Fenol 5% (Còctel B). El TFA és un àcid fort que desancora el pèptid de la resina, i al mateix temps elimina els grups protectors laterals dels aminoàcids. Es va deixar la reacció 30 minuts a 0 °C i després 90 minuts a temperatura ambient.

Acabada la reacció es va afegir èter fred, apareguent un precipitat corresponent al pèptid lliure. Es va rentar el tub per centrifugacions successives i es va secar, recollint el pèptid desprotegit i desancorat dissolt en àcid acètic al 10%.

Les dues mostres obtingudes pel tractament amb els dos còctels de desancorament es van analitzar per HPLC, en condicions standard del 5% al 85% d'ACN, amb un 0.5% de TFA. Però atesa la gran hidrofília del pèptid i el seu petit tamany, pràcticament no quedava retingut en la columna C18 utilitzada, sortint amb el front junt amb l'acètic, i no apareixia cap altre pic. Per això es va modificar les condicions, utilitzant un gradient baix en ACN, de 5 a 10% ACN durant 10 minuts, seguit d'un gradient fort de 10 a 85% d'ACN a fi de rentar la columna i eliminar traces d'impureses hidròfobes.

En el registre de la figura 9, apareix el cromograma realitzat en aquestes darreres condicions corresponent al cru peptídic obtingut per tractament amb el còctel A.



Figura 9: Cromograma del peptid tractat amb el Còctel A.
Columna C₁₈. Detecció a 220 nm. Flux: 1 ml/min. Eluents ACN/H₂O + 0.1 % TFA. Gradient 5-10% ACN (10') + 10-85% (10')

Com es pot apreciar, primer surt l'acètic en el volum mort de la columna (2.7'), i després el peptid a 4.13'.

L'aspecte del cromograma del peptid obtingut emprant el còctel B va ser idèntic, de manera que es va optar per utilitzar el còctel A per el desancorament i desprotecció de tota la peptidil-resina.

Un cop es va determinar el protocol de desprotecció i desancorament idoni, es va agafar 200 mg de peptidil-resina i es va sotmetre al mateix tractament. El peptid lliure, dissolt en TFA:H₂O, es va separar de la resina per filtració i es va evaporar el TFA passant pel tub una corrent de N₂. Per eliminar les restes de subproductes i disolvents es va fer varies extraccions consecutives amb èter i acetona. Finalment es va deixar secar la resina en una bomba de buit i es va liofilitzar.

La quantitat total de peptid A-1 obtingut va ser de 54,1 mg. El rendiment de la síntesi va ser quantitatiu, tenint en compte que el nou grau de funcionalització de la peptidil-resina al final de la síntesi va ser de 0.39.

2.3. Caracterització

El cru peptídic obtingut per desancorament del peptid de la resina es analitzar per *HPLC analítica*. Per fer la determinació cromatogràfica, es va dissoldre el peptid en H₂O, obtenint una solució perfectament transparent. Es va començar treballant amb un gradient del 5-55 % ACN, per detectar possibles impureses presents a la mostra. A una longitud d'ona de 220 nm. es va obtenir un pic majoritari corresponent al peptid A.1 a un temps de retenció de

4.04', que representava el 83.02 % de l'àrea. Així mateix no s'observaren impureses importants, essent la resta de pics atribuïbles a sorolls de fons de la columna.

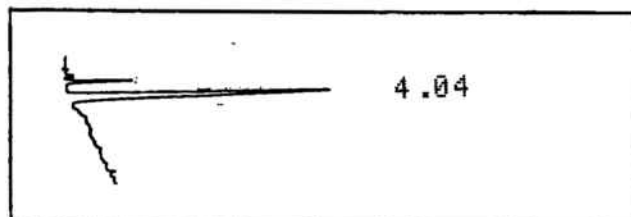


Figura 10. Cromatograma corresponent al cru peptídic obtingut en la desprotecció i desancorament. Columna C₁₈. Detecció a 220 nm. Flux: 1 ml/min. Eluents ACN/H₂O + 0.1% TFA. Gradient: 5-45% ACN. 15'.

A fi de caracteritzar-lo de forma adequada es va purificar per HPLC semipreparativa. Es va buscar unes condicions d'elució isocràtiques, en les que el pic corresponen a A.1 aparegués aïllat de la resta d'impureses. Finalment es va fixar una fase mòbil amb un 5% d'ACN. Es va injectar quantitats superiors de mostra, recollint el pic del pèptid. Aquesta operació es va repetir varies vegades i després de liofilitzar el pèptid es va tornar a cromatografiar per HPLC analítica donant el següent espectre:

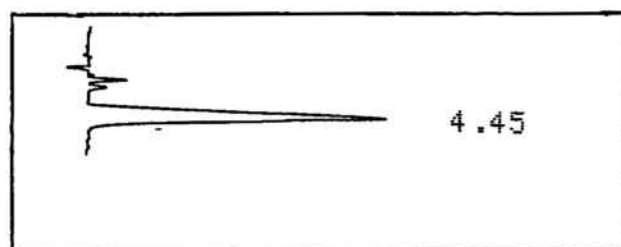


Figura 11. Cromatograma del pèptid purificat per HPLC. Condicions analítiques iguals que en la figura 10, amb una fase mòbil isocràtica del 5% ACN.

De forma paral·lela, es va fer un *electrospray MS* del pèptid purificat. Aquesta tècnica permet determinar el pes molecular dels components d'una mostra, i va donar l'identificació definitiva de la seqüència.

El pes molecular calculat del pèptid A.1 és de 546.6 g/mol i en l'espectre s'observa un pic majoritari a 274.2, que respon a la fórmula: $\frac{PM + 2 H^+}{2}$, ja que el pèptid es protona dues vegades.

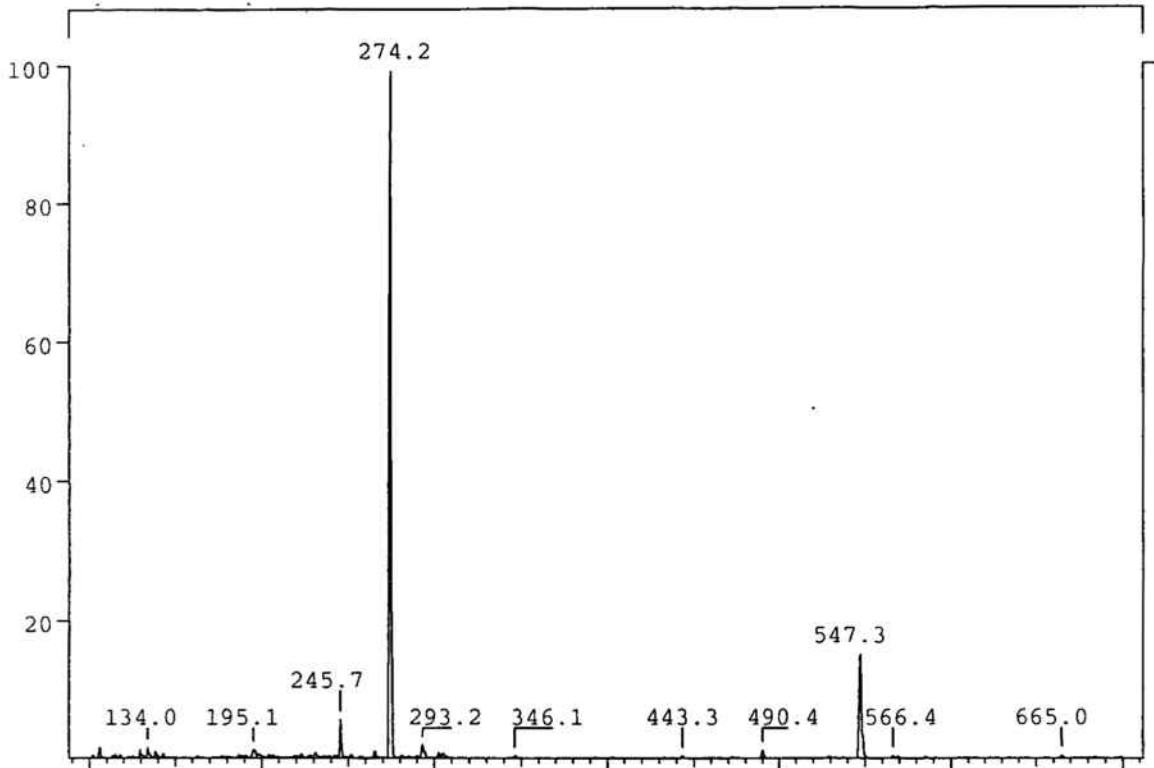


Figura 12: Electrospray corresponent al pèptid A.1.

Ademés es va fer un *Anàlisi d'aminoàcids* qualitatiu per determinar el contingut i la proporció dels aminoàcids existents a la mostra peptídica. Els resultats de l'anàlisi qualitatiu es van ajustar al contingut d'aminoàcids teòric de la seqüència A.1, tal i com es mostra a la següent taula.

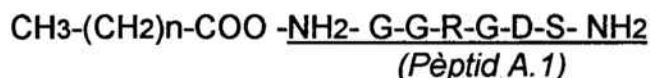
Anàlisi d'Aminoàcids qualitatiu del pèptid A.1

Asp.....	1.10	(1)
Ser.....	0.63	(1)
Gly.....	2.76	(3)
Arg.....	1.15	(1)

* Valors teòrics entre parèntesis

3. DERIVATITZACIÓ HIDRÒFOBA DEL PÈPTID A.1

A partir del pèptid A.1 es va sintetitzar dos derivats amb una àcid gras unit al extrem amino-terminal del pèptid mitjançant un enllaç amida. D'aquesta forma es va obtenir compostos amb un caracter amfifílic, similar als fosfolípids, que permetien unir el pèptid A.1 als liposomes incorporant la seva part apolar a la bicapa lipídica. L'estructura general d'aquests derivats és la següent:



essent $n=12$ pel derivat A.1.Mirístic i $n=4$ pel derivat A.1.Hexanòic

3.1. Síntesi dels derivats

Per la síntesi dels derivats hidròfobs, es va partir de 300 mg de peptidil-resina corresponent a la síntesi d'A.1. A la resina hi havia ancorat el pèptid amb l'extrem amino i els grups laterals dels aminoàcids protegits. Inicialment es va fer un tractament de desprotecció amb DMF/piperidina 20% i es va realitzar el test de ninhidrina que va confirmar que la desprotecció havia estat total.

Un cop l'extrem amino va estar lliure, es va incorporar l'àcid gras (àcid mirístic o àcid hexanòic) i els reactius d'acoblament (HOBt i DIPCI). Les quantitats adicionades es van calcular tenint en compte el nou grau de funcionalització de la resina (0.39 meq/g) i treballant amb un excés de 2.5. Es va deixar un temps de reacció de 60 minuts i es va fer un test de ninhidrina per controlar l'incorporació. El test va donar negatiu, indicant que la unió havia estat completa, i es va procedir al rentat de la columna i al secat mitjançant èter.

El pas següent va ser el desancorament del derivat de la resina. No va ser necessari fer un tractament previ de desprotecció amb piperidina ja que l'àcid gras no tenia cap grup protector. Per desancorar el pèptid i eliminar els grups protectors dels aminoàcids, es va tractar la peptidil-resina amb un còctel constituït per TFA 95%:H₂O 5%. Es va deixar 30 minuts a 0 °C i 2 hores a temperatura ambient. A continuació es va recollir el pèptid desancorat per filtració i es va rentar amb èter. Es va liofilitzar i el producte final es va pesar.

En el cas del derivat A.1.Mirístic es va obtenir 86.5 mg de producte, obtinguent un rendiment de síntesi del 86.5 %. Per A.1.Hexanoïc la quantitat final de producte va ser de 77.7 mg, que representava un rendiment del 106.1%.

3.2. Caracterització

Per caracteritzar els productes obtinguts es va seguir els mateixos criteris que en el cas del pèptid A.1. Així doncs, cada un dels derivats peptídics sintetitzats van ser sotmesos a les tècniques anteriorment descrites per a la seva identificació i posterior purificació.

3.2.1. Derivat A.1.Mirístic.

Atesa la diferència de hidrofobicitat del pèptid, deguda a la seva derivatització, abans de fer la determinació per HPLC es va fer proves de solubilitat del derivat A.1.Mirístic. L'addició d'una resta apolar va fer que el caràcter hidròfob de la molècula augmentés, gelatinitzant al ser disolta amb una barreja d'H₂O/ACN. Es va fer una nova dissolució amb DMF/ACN (1:2), però el DMF interferia en la determinació cromatogràfica, ja que era detectat a 220 nm. Finalment es va decidir disoldre el derivat en metanol, ja que donava una bona dissolució i a 220 nm no originava cap pic cromatogràfic.

Es va utilitzar el sistema d'HPLC Perkin-Elmer, ja que permet obtenir l'espectre d'absorció al UV dels pics seleccionats. Es va utilitzar una columna C₈ de fase reversa i es va llegir a 220 i 280 nm. Inicialment la mostra va originar un primer pic majoritari corresponent a DMF, ja que encara no s'havia descartat la seva utilització com a disolvent, i dos pics corresponents al producte de la síntesi i a alguna impuresa.

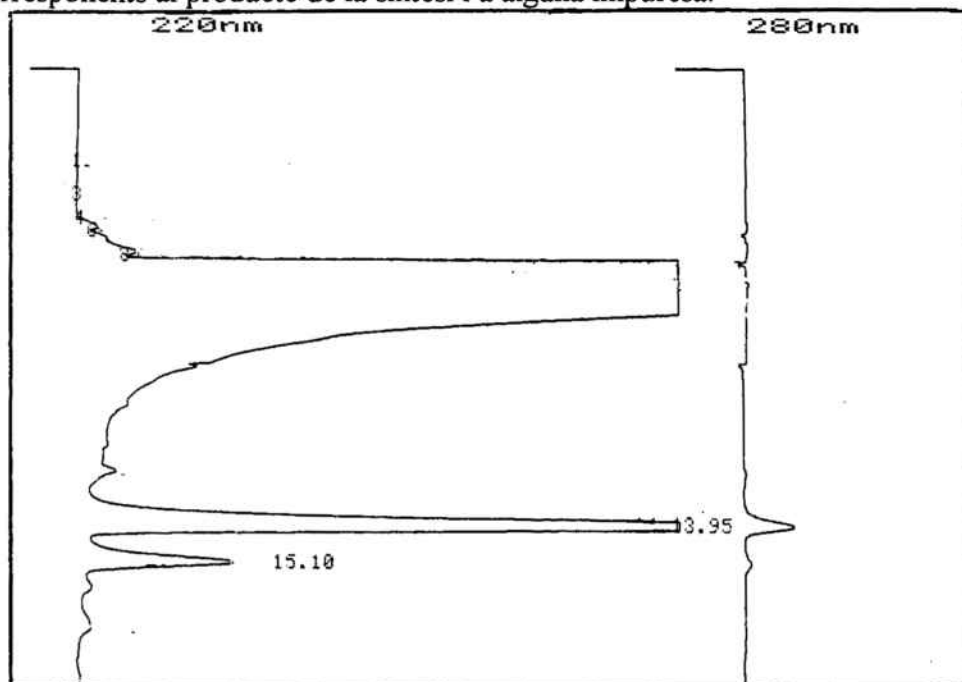


Figura 13: Cromatograma del producte de síntesi d'A.1.Mirístic.
Columna C₈. Detecció a 220 i 280 nm. Flux: 1 ml/min. Eluents ACN/H₂O + 0.1% TFA.
Isocràtic 70% ACN.

Al cromatograma s'observa que a 280 nm apareix un petit pic, que correspondria al derivat peptídic. A aquesta longitud d'ona es detecta principalment aminoàcids aromàtics, i el pèptid A.1 no hauria de donar senyal. Al observar els espectres d'UV es va poder veure que hi havia un registre que corresponia al grup protector PMC (2,2,5,7,8-Pentametilcroman-6-sulfonil), que podia ser detectat a 280. Això ens va portar a pensar que el procés de desprotecció dels grups laterals dels aminoàcids no havia estat complert i que teníem un subproducte amb el grup PMC incorporat encara al residu d'arginina.

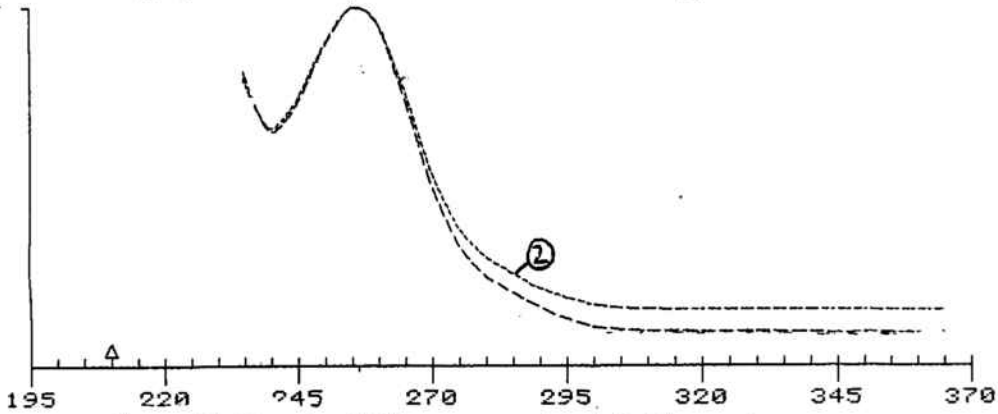


Figura 14: Espectre d'UV corresponent al pic 2 del cromatograma.

A fi de confirmar aquesta hipòtesi es van realitzar l'espectre de masses del pic, previament aïllat per HPLC semipreparativa. Al determinar el pes molecular del pic es va veure que no era l'esperat per A.1.Mirístic (756.4), sino que apareixia un pic majoritari de PM 1023.6 g/mol. Això va confirmar que el pèptid conservava el grup protector PMC incorporat al residu d'Arg., ja que el pes molecular del PMC és de 266.35 i correspon a la diferència entre el PM del producte analitzat i l'A.1.Mirístic.

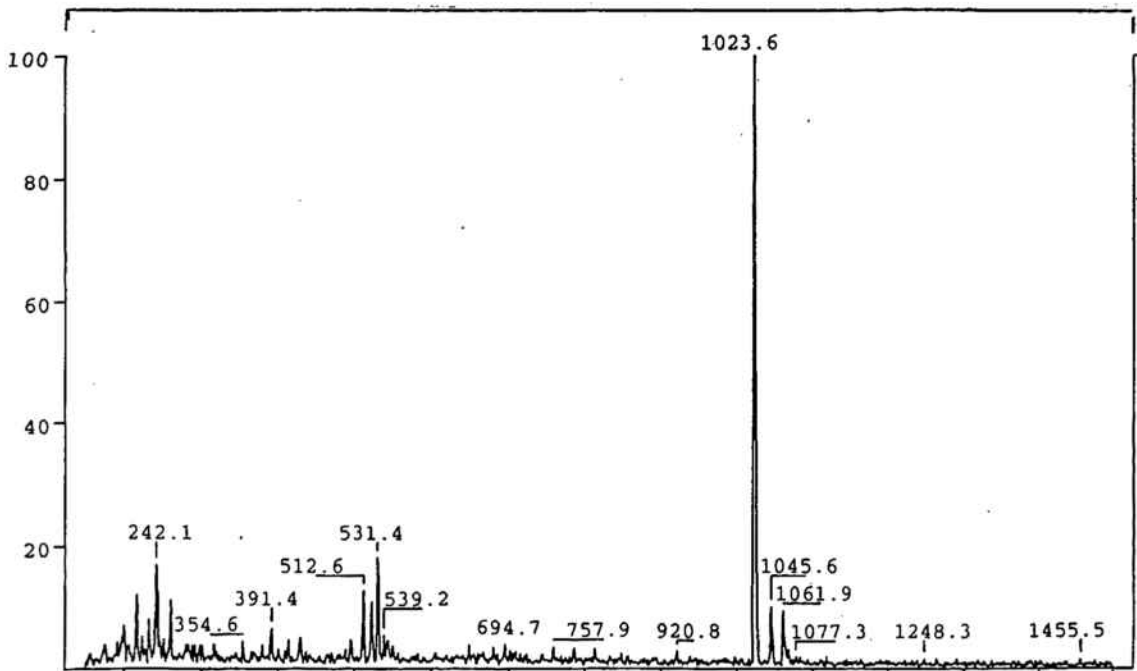


Figura 15: Espectre de masses del producte de síntesi d'A.1.Mirístic.

El producte obtingut es va conservar com A.1.Mirístic-PMC, i va ser posteriorment utilitzat en la preparació de liposomes per estudiar la influència d'un grup voluminos i apolar en l'incorporació del derivat peptídic als liposomes.

3.2.2. Desprotecció de A.1.Mirístic-PMC

Per obtenir el derivat peptídic totalment desprotegit, es va fer un tractament a 25 mg de A.1.Mir.PMC. Es va tornar a preparar el còctel de desprotecció amb TFA 95%:H₂O 5% i es va addicionar al tub que contenia el derivat. Es va deixar 30 minuts a 0°C i 2 hores a temperatura ambient. Seguidament es va rentar amb èter i es va liofilitzar, obtenint un producte final amb un pes de 20.2 mg.

Es va fer una caracterització d'aquest nou producte per verificar si la desprotecció havia estat total. Es va punxar el derivat A.1.Mirístic dissolt en metanol al sistema cromatogràfic Perkin-Elmer, amb un gradient de 5 a 85 % ACN i es va llegir a 220 i 280 nm.

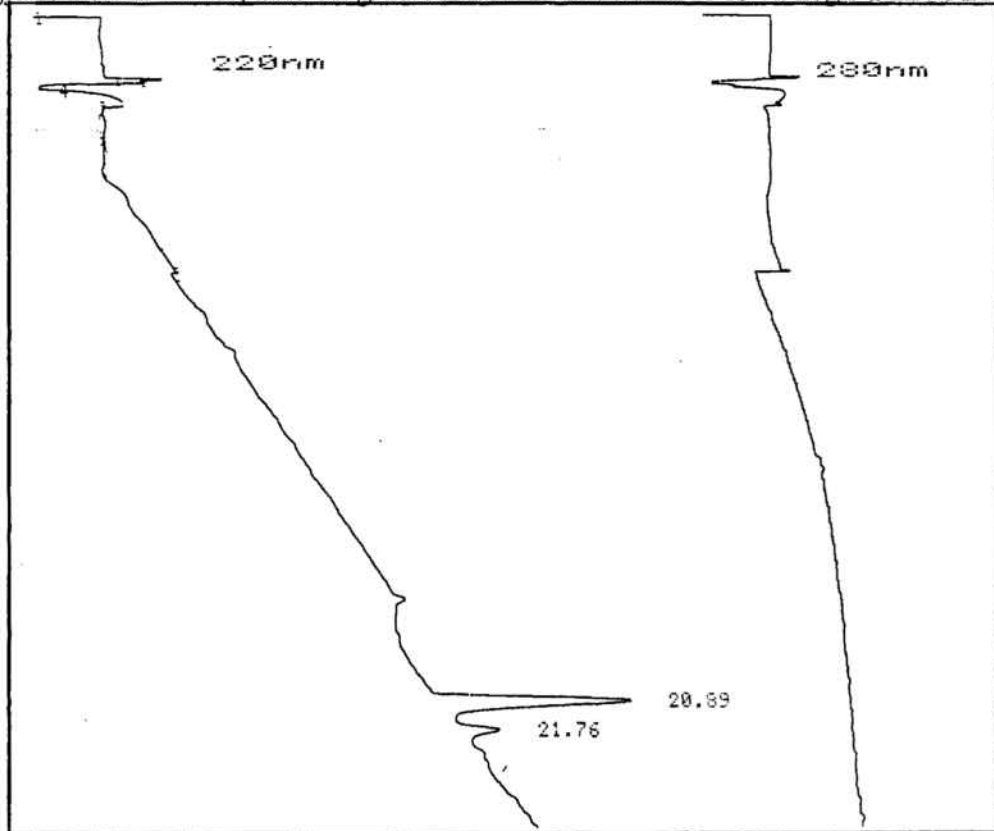


Figura 16. Cromatograma corresponent al producte de desprotecció d'A.1.Mir. Columna C₁₈. Detecció a 220 i 280 nm. Flux: 1 ml/min. Eluents: ACN/H₂O + 0.1 % TFA. Gradient 5-85 % ACN (25')

A la lectura a 280 nm no s'observa cap pic corresponent a PMC. Per comprovar l'eliminació del grup protector es va fer l'espectre d'UV dels tres pics i es va veure que cap d'ells tenien un registre corresponent al PMC. Això va confirmar que la desprotecció havia estat total.

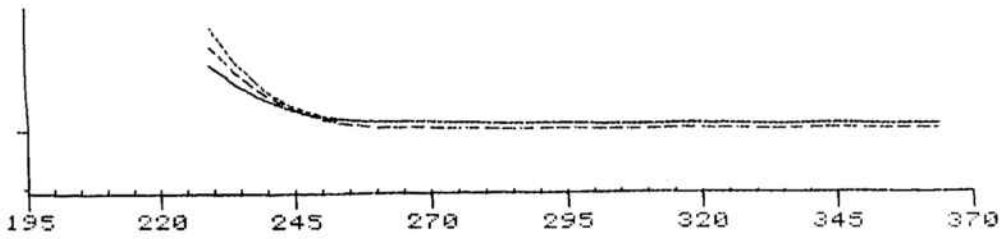


Figura 17: Espectre d'UV dels tres pics del cromatograma.

En el cromatograma corresponent a A.1.Mirístic es va observar tres pics dels quals un corresponia al producte i calia aïllar-lo de la resta d'impureses. Amb el sistema cromatogràfic Merck es va treballar amb diferents proporcions de ACN:H₂O, a fi d'obtenir una fase mòbil isocràtica que permetés una bona separació dels pics, amb uns temps de retenció adequats. Es va fixar la relació ACN 55:H₂O 45 com a òptima per a purificar el derivat peptídic. En aquestes condicions es va fer diverses injeccions de A.1.Mirístic dissolt en metanol i es va recollir en tres tubs les fraccions corresponents a cada pic.

La fracció corresponent a A.1.Mirístic es va tornar a injectar per HPLC per comprovar la seva puresa, obtenint un pic aïllat, del que es va fer un electro spray.

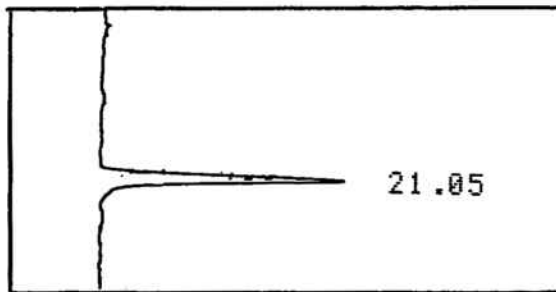


Figura 18. Cromatograma corresponent a A.1.Mir. purificat
Columna C₁₈. Detecció a 220 nm. Flux 1 ml/min. Eluents ACN/ H₂O + 0.1 % TFA.
isocràtic 55% ACN.

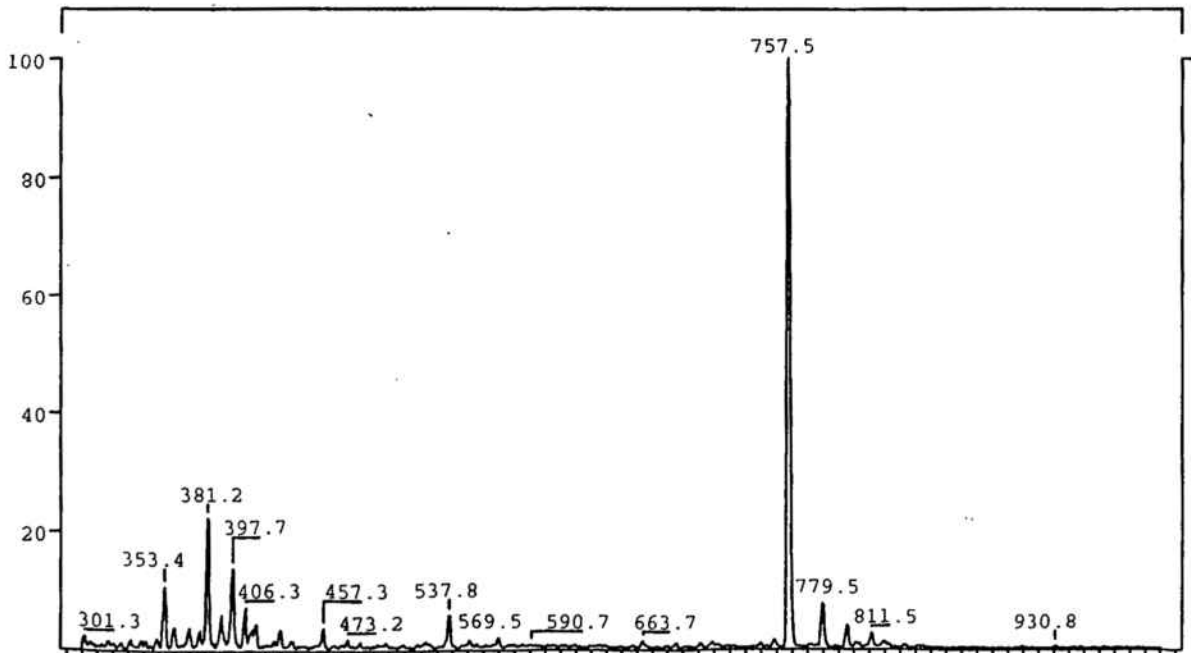


Figura 19. Electro spray de A.1.Mirístic purificat.

Amb l'electrospray es pot comprovar que la desprotecció ha estat completa i que la fracció purificada correspon a A.1.Mirístic, ja que el pes molecular determinat correspon exactament al del derivat desprotegit.

3.2.3. Derivat A.1.Hexanòic.

Per caracteritzar aquest producte es van seguir els mateixos criteris.

Inicialment es va procedir a disoldre el derivat. Donat que la cadena hidròfoba addicionada al pèptid era curta, li va conferir poca apolaritat, i es va poder disoldre perfectament en aigua.

A continuació es va fer una cromatografia per *HPLC* utilitzant un gradient de 5 a 45% ACN, observant-se la presència d'un sol majoritari pic, que es va procedir a purificar.

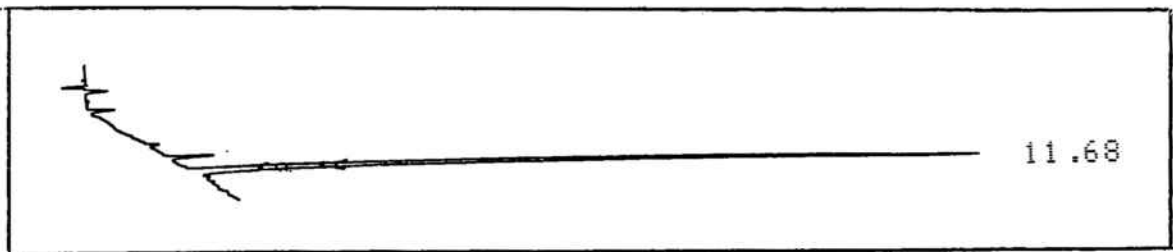


Figura 20: Cromatograma del producte de síntesi d'A.1.Hexanòic.

Columna C₁₈. Detecció a 220 nm. Flux: 1 ml/min. Eluents ACN/H₂O +0.1%TFA.Gradient: 4-45% ACN (15')

Es va buscar una fase mòbil que permetés aïllar el pic de la resta de impureses, establint un isocràtic amb 18% ACN com a condició idònia. Es va recollir les fraccions corresponents a A.1.Hexanòic i es van tornar a injectar per comprovar la seva puresa, obtenint el següent registre:

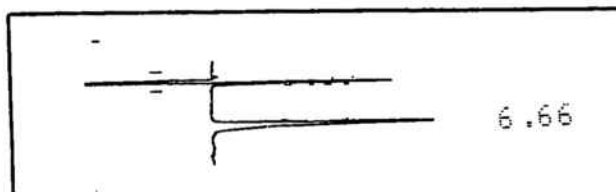


Figura 21: Cromatograma corresponent a A.1.Hexanòic purificat per HPLC.

Condicions cromatogràfiques iguals que en la figura 11, amb una fase mòbil isocràtica del 18% ACN.

Es va fer un electrospray de la mostra purificada, que va donar un pic a un PM corresponent al esperat per A.1.Hexanòic. Això ens va confirmar que la síntesi havia estat correcta.

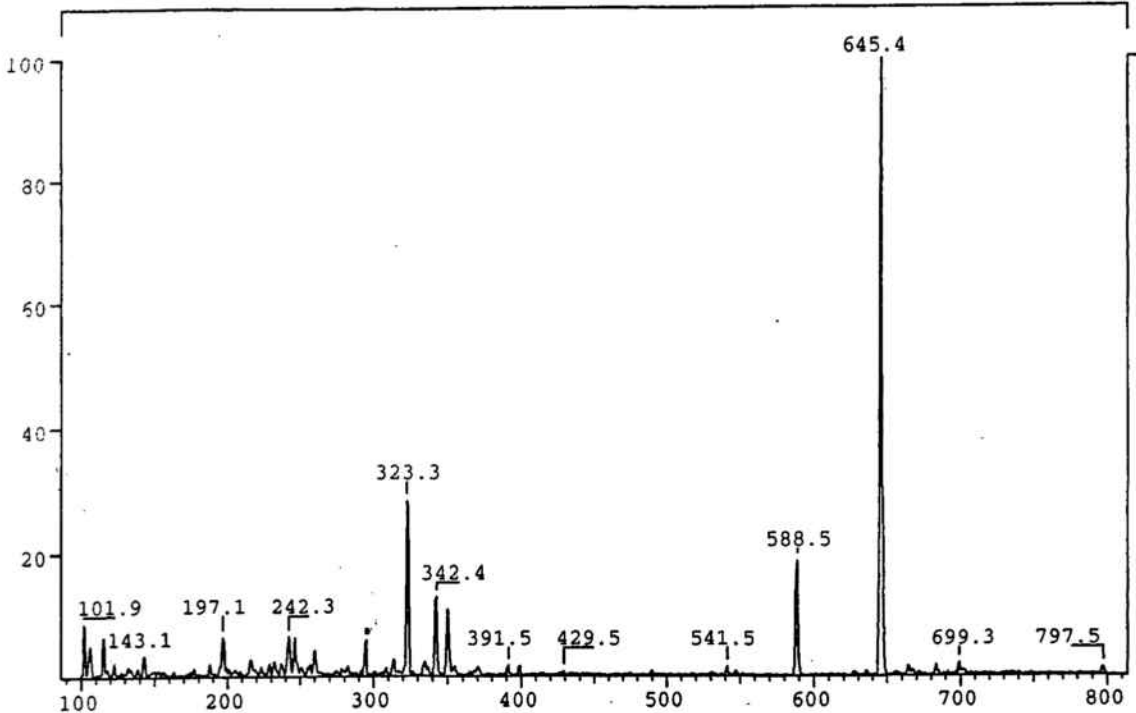


Figura 22: Electropray de A.1.Hexanòic purificat.

A més es va realitzar un Anàlisi d'Aminoàcids qualitatiu en el que es va poder observar una correspondència entre la seqüència del pèptid A.1 i els aminoàcids presents al derivat peptídic.

Anàlisi d'Aminoàcids qualitatiu del derivat A.1.Hexanòic

Asp.....	0.97	(1)
Ser.....	0.61	(1)
Gly.....	2.91	(3)
Arg.....	1.12	(1)

* Valors teòrics entre parèntesis

4. SÍNTESI DE NGPE

La preparació de N-glutarilfosfatidiletanolamina es va fer seguint el procés descrit a l'apartat 2.4. L'esquema de la reacció es representa a continuació:

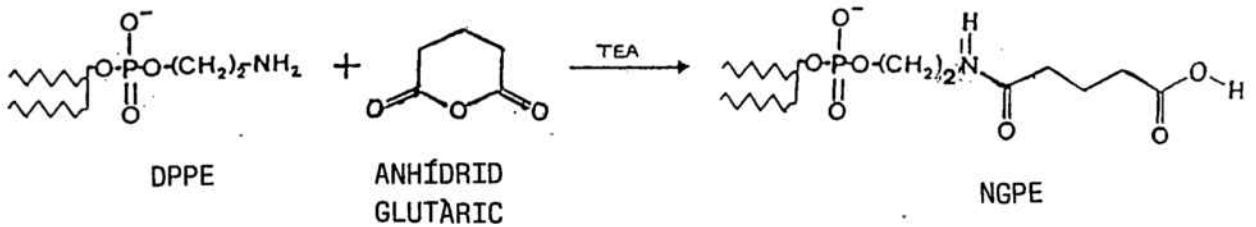


Figura 23: Síntesi de la NGPE

El producte de síntesi va ser purificat per successives diàlisis i per comprovar la seva puresa es va fer una cromatografia en capa fina, utilitzant-se com a eluents cloroform:metanol:aigua (65:35:4). El revelat de la capa fina es va fer amb vapors de iode, ninhidrina i toluidina.

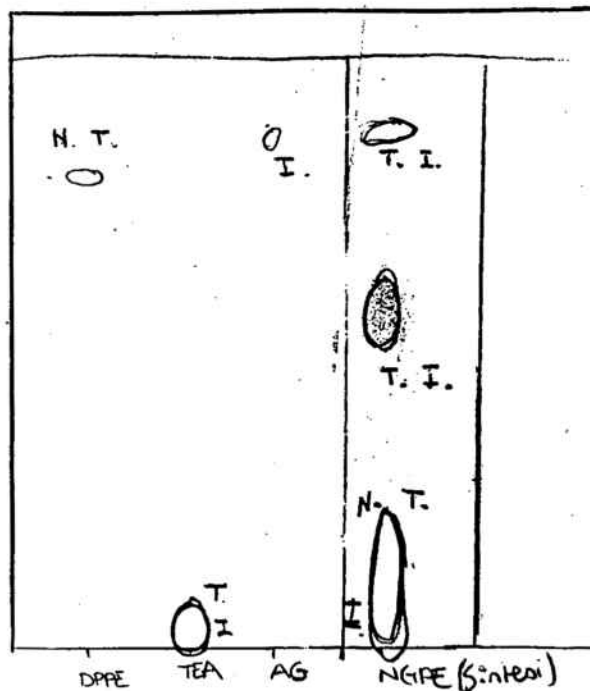


Figura 24. Cromatografia en capa fina de la NGPE sintetitzada (cru de desprotecció).

Es va obtenir 336 mg de NGPE, el que va correspondre a un rendiment quantitatiu de la síntesi. La NGPE es va dissoldre en cloroform i es va quantificar la concentració de la solució mitjançant anàlisi de fosfats.

5. CARACTERITZACIÓ FÍSICOQUÍMICA DELS PÈPTIDS.

5.1. Formació de micel·les

Abans de començar a estudiar la incorporació dels pèptids als liposomes, es va creure convenient conèixer les característiques fisicoquímiques dels mateixos. Un punt important és la seva capacitat per formar micel·les, ja que al ser molècules amfifíliques era molt probable que en medi aquós donessin algun tipus d'agregat.

Per fer aquest estudi es va utilitzar DPH, molècula fluorescent insoluble en aigua i que només dona fluorescència quan està en un entorn hidròfob.

Per fer les determinacions es va preparar solucions 10^{-5} M de pèptid A.1 i dels derivats A.1.Mir, A.1.Mir.PMC i A.1.Hex en TAC. Es va posar 20 μ L de la solució en un cubeta de quars i es va portar fins a 3 mL amb TAC. Es va addicionar una solució de DPH i es va deixar 10 minuts en agitació magnètica. Les lectures es van fer a una longitud d'ona d'excitació de 365 nm. i d'emissió de 425 nm. Com a referència es va utilitzar la solució en absència de pèptid.

En els registres obtinguts només s'observa variació de la intensitat de fluorescència en el cas de A.1.Mir i A.1.Mir.PMC. La diferència en l'intensitat d'aquests dos productes es deu a les solucions preparades tenien diferents concentracions, ja que només es buscava observar l'interacció del marcador fluorescent amb la part apolar del agregat micel·lar.

Per tant, els resultats indiquen que aquests dos derivats en medi aquós s'agreguen formant micel·les, de forma que les cadenes d'acid mirístic queden orientades cap a l'interior i les cadenes de pèptid es situen a la part externa. Aquesta ordenació permet incloure la molec de DPH al seu interior. En el cas de A.1 i A.1.Hexanòic no s'observa cap tipus d'interacció, degut a que tenen menor caràcter hidròfob. Aquest comportament concorda amb la solubilitat de les mostres.

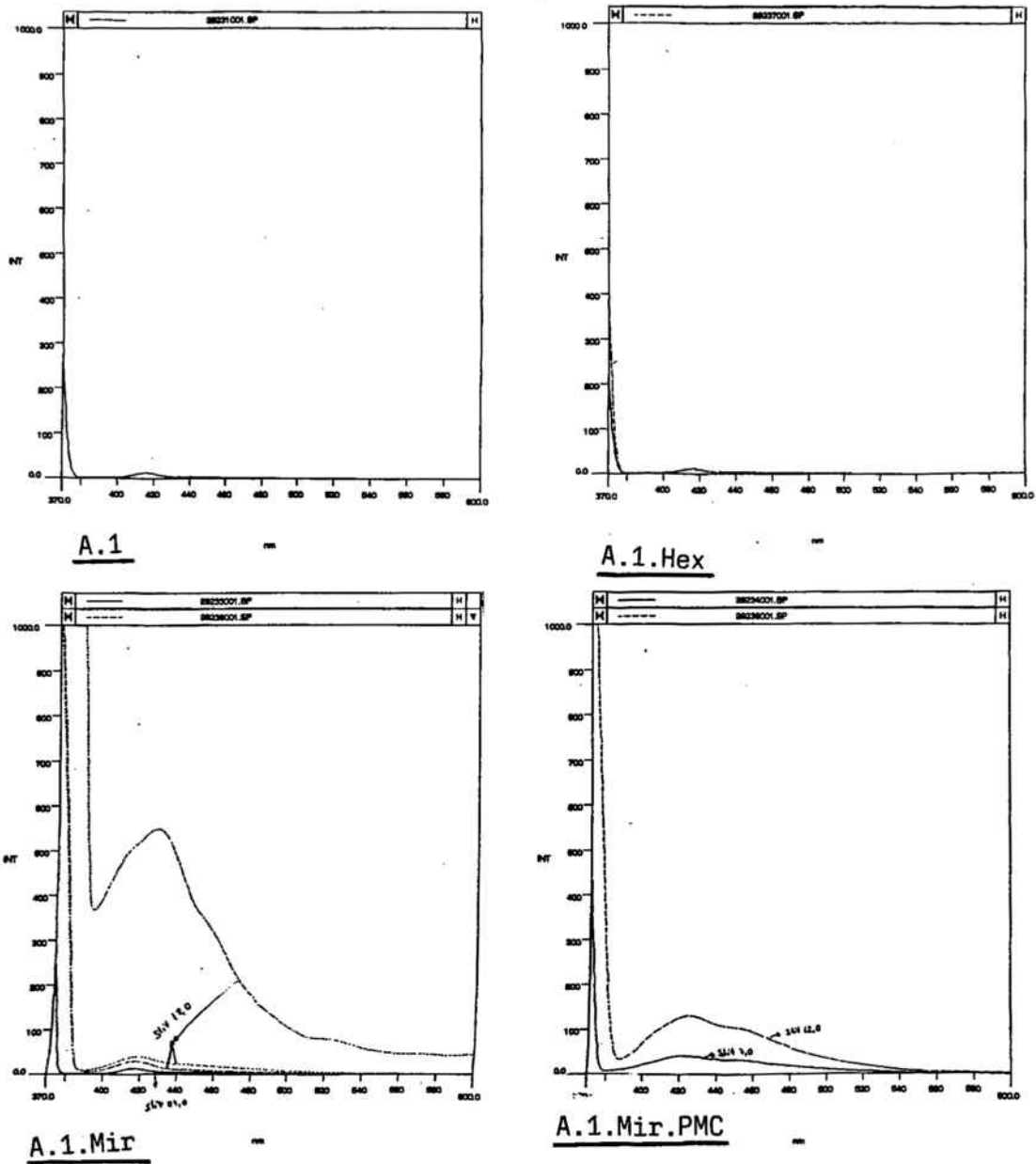


Figura 25: Registres de la intensitat de fluorència.

5.2. Activitat superficial.

Seguint el procés descrit a la part experimental es va determinar l'activitat superficial dels péptids sintetitzats mitjançant l'increment de pressió superficial de les seves solucions.

Es va treballar en una cubeta cilíndrica provista d'un forat lateral que permetia injectar la solució concentrada de péptid directament a la subfase.

Les determinacions es van fer de manera acumulativa i/o discontinua i en ambdós casos es va determinar l'increment de pressió superficial en funció de la concentració.

Els resultats obtinguts indiquen que només el pèptid A.1.Mirístic té activitat superficial i en canvi l'A.1.Hexanòic pràcticament no modifica la pressió superficial. El pèptid sense derivatitzar és completament inactiu.

En la figura 26 ve representada l'activitat superficial de A.1.Mirístic i A.1. Hexanòic.

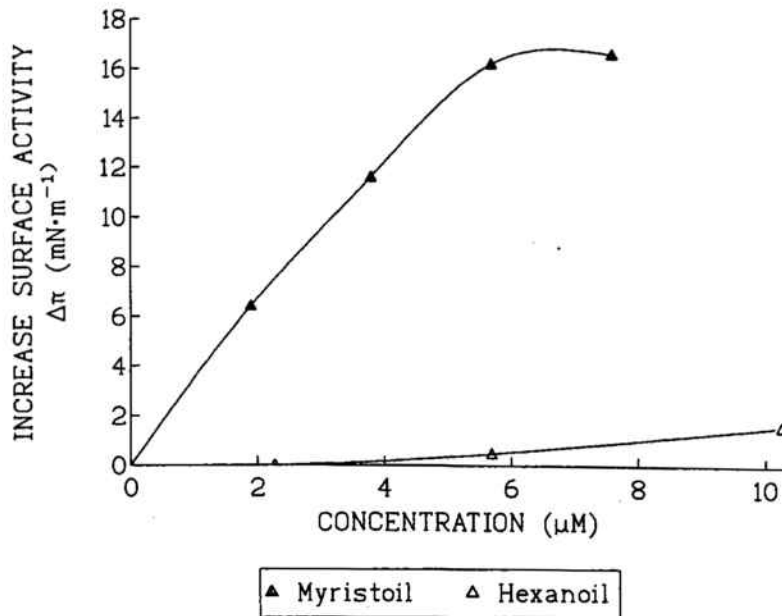


Figura 26. Representació de l'increment de l'activitat superficial en funció de la concentració.

Aquestes dades concorden amb la solubilitat i la capacitat de formar micel.les detectades en anteriors experiments.

5.3. Estudi del caràcter hidròfob.

Per avaluar la diferent hidrofobicitat dels quatre compostos peptídics sintetitzats es va fer una cromatografia per HPLC amb una fase mòbil del 5-85% ACN en 25 minuts de cada un dels productes. Totes les lectures es van fer a 220 nm.

D'aquesta manera l'única variable entre les mostres era el seu caràcter hidròfob, detectant-se el pic a major temps de retenció com més hidròfoba fos la molècula, ja que la seva afinitat per l'ACN (eluent apolar) era major, i era eluïda a un temps en què la fase mòbil era rica en el disolvent apolar.

Els cromatogrames obtinguts van donar els següents temps de retenció:

Taula 1: Estudi comparatiu dels temps de retenció dels pèptids.

<i>Mostra</i>	<i>Temps de Retenció</i>
Pèptid A.1	4.75
A.1.Hexanòic	11.04
A.1.Mirístic	20.90
A.1.Mirístic.PMC	23.06

el que confirma que la hidrofobicitat augmenta al addicionar un àcid gras al pèptid, i que és més elevada com més llarga és la cadena alquílica i quan hi ha un grup apolar i voluminós (PMC) incorporat.

6.PREPARACIÓ DE LIPOSOMES

6.1. Consideracions general

Tal i com s'ha indicat a la Introducció, en aquest estudi es va decidir utilitzar la 5-fluoruridina com agent inhibidor de la proliferació vitreoretiniana, ja que el seu índex terapèutic és major que el de la resta de citostàtics.

Tot i que la 5-fluoruridina constitueix el tractament més adequat per la PVR (45), presenta l'inconvenient de que les solucions convencionals tenen curt temps de permanença a l'ull i presenten elevada toxicitat. Això va fer pensar en la utilització de sistemes d'alliberació controlada per millorar l'acció terapèutica.

Com que la 5-FUR té una natura altament polar, amb una bona solubilitat en aigua, es va pensar en liposomes tipus DRV (Dried Reconstituted Vesicles) per a la seva administració controlada, ja que són uns liposomes amb una relació de volum aquòs/lípid elevada, que permeten obtenir alts rendiments d'encapsulació de substàncies polars.

Per la composició dels liposomes es va optar per lípids saturats i colesterol per donar estabilitat a les vesícules en contacte amb els fluids biològics. Els liposomes es van preparar amb un tamany mig de 0.5 μm de diàmetre, ja que segons la literatura (46) presenten un temps de permanença a l'ull més prolongat que liposomes homòlegs de menor tamany.

A més, donada la presència de fenòmens de proliferació i la seva relació clara amb processos d'adhesió vinculats a Integrines, es va desenvolupar un nou tipus de forma

liposomal en la que es va unir a la superfície un pèptid relacionat amb la seqüència RGDS. Aquesta seqüència correspon a la utilitzada per la Fibronectina per fixar-se als fibroblastes, cèl·lules implicades en la proliferació vitreoretiniana, de forma que permet dirigir més selectivament els liposomes al seu lloc d'acció.

Aixímateix, per estudiar la capacitat d'acumulació selectiva d'aquests liposomes a la membrana proliferativa, es va preparar liposomes amb Carboxifluoresceïna encapsulada. Es va fer dos tipus de preparacions amb el marcador fluorescent, una amb el pèptid unit a la superfície dels liposomes i en l'altre sense. D'aquesta manera es va poder contrastar l'influència del pèptid en la distribució dels liposomes a nivell ocular.

6.2. Optimització de l'encapsulació de 5-FUR.

En la preparació de liposomes, només una part de la substància a encapsular queda retinuda dins les vesícules. Això depèn en gran mesura del tipus de liposoma, del procediment seguit en la preparació i de la hidrofobicitat de la molècula a encapsular .

Es imprescindible doncs conèixer de forma exacta la quantitat de fàrmac que es troba retingut a l'interior dels liposomes abans de fer posteriors estudis, tant físics com biològics. És per això que es va determinar la concentració del fàrmac encapsulat en totes les preparacions liposòmiques i es va estudiar els paràmetres que inflüen en l'eficàcia d'encapsulació.

Es va preparar diferents lots de liposomes DRV amb 5-FUR, amb una relació molar inicial entre els seus components PC:Chol:5-FUR de 1:1:2.65. En cada lot es va determinar la quantitat de fàrmac encapsulat a l'interior dels liposomes per cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC), tal com es detalla a l'apartat 2.7.1., i es va calcular el percentatge d'encapsulació tenint en compte la quantitat inicial de 5-FUR addicionada. El resultat també es va expressar en relació a la concentració de fosfolípid final, en mg 5-FUR/ μ M de PL., ja que pot haver-hi pèrdues de mostra en el procés preparatiu.

Els valors obtinguts es recullen a continuació:

Taula 2: Encapsulació de 5.FUR en liposomes

<i>Conc .final 5.FUR (mg/mL)</i>	<i>% Encapsulació</i>	<i>mg 5-FUR/μMol PL</i>
5.483	41.12	0.325
5.677	42.57	0.343
4.337	32.52	0.276

Els valors promigs obtinguts va ser:

-Concentració final 5-FUR: 5.16 mg/mL

-% Encapsulació: 38'74 %

-mg 5-FUR/ μ Mol PI: 0.314

Aquests resultats concordaven amb els rendiments d'encapsulació que es poden trobar a la bibliografia (47), per tant es va considerar que aquests liposomes podrien ser utilitzats com a valor de referència en l'estudi de la influència del pèptid A.1 i els seus derivats en l'encapsulació de 5.FUR.

6.3. Incorporació del pèptid als liposomes

La incorporació del pèptid als liposomes es va realitzar seguint dos mètodes diferents:

- per unió covalent a N-Glutarilfosfatidiletanolamina (NGPE) un cop formats els liposomes,
- i preparant derivats hidròfobs del pèptid A.1 que van ser incorporats a la barreja inicial de fosfolípids en el procés de preparació dels liposomes.

En ambdós casos es va quantificar la concentració final de pèptid als liposomes i el seu rendiment d'incorporació.

Unió covalent del pèptid als liposomes

Per incorporar el pèptid a la superfície dels liposomes es va utilitzar el derivat NGPE, que es va addicionar a la barreja inicial de fosfolípids en una proporció del 10% molar.

La NGPE és una molècula amfifílica que es disposa als liposomes amb la part hidròfoba, que correspon a la fosfatidiletanolamina (PE), incorporada dins la bicapa, quedant el grup glutàric predominantment orientat cap a la fase aquosa. D'aquesta manera el grup carboxil del glutàric, que és el punt reactiu, queda a la superfície dels liposomes per poder reaccionar amb el pèptid.

Els liposomes DRV estan formats per vèries capes concèntriques de fosfolípid, de manera que part de la NGPE queda a l'interior dels liposomes, inaccessible al pèptid. Això fa que disminueixi el nombre de punts reactius i que la incorporació de pèptid als liposomes sigui més baixa de l'esperada si es tractés de liposomes unilaminars.

La unió del pèptid es fa mitjançant un enllaç amida entre l'extrem amino de la cadena peptídica i el grup carboxiterminal de la NGPE. La reacció té una etapa inicial en la que s'activa el grup carboxil amb N-hidroxisulfosuccinimida, formant-se un ester succinimida, en presència de etildietilcarbodiïmida com a catalitzador. A continuació es fa la reacció en medi neutre entre el grup amino del pèptid i l'ester actiu.

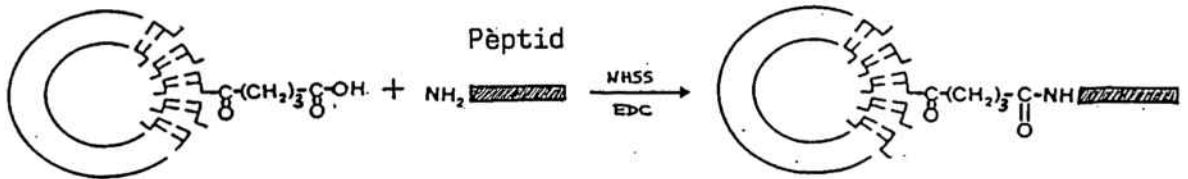


Figura 27. Reacció d'unió del pèptid a la superfície dels liposomes.

En totes les etapes de la reacció es va utilitzar un excés de tres vegades de reactiu. Per calcular la quantitat inicial de pèptid a addicionar es va tenir en compte els mols de NGPE reactius.

Finalitzada la reacció es va eliminar l'excés de reactiu i de pèptid no unit per diàlisi front NaCl 0.9%.

Incorporació dels derivats hidròfobs del pèptid

Un altre mètode per incorporar el pèptid A.1 als liposomes consisteix en utilitzar derivats amb una cadena hidròfoba, en aquest cas un àcid gras, unit mitjançant un enllaç ester al extrem amino del pèptid. D'aquesta forma obtenim una molècula amfifílica que es comporta com la resta de fosfolípids, orientant la seva part polar, constituïda per la cadena peptídica, cap al medi extern i intercalant la cadena alquílica dins de la bicapa lipídica.

Es va addicionar diferents quantitats del derivat hidròfob d'A.1 a la barreja inicial de fosfolípids a l'hora de formar la pel·lícula lipídica en la preparació de liposomes. Es va seguir el mètode habitual per obtenir DRV i es va valorar la concentració d'A.1 a la mostra final. També es va quantificar el percentatge d'incorporació del derivat del pèptid als liposomes, tenint en compte la quantitat inicial addicionada i la quantitat final present a la preparació.

Es va treballar amb dos tipus de derivats hidròfobs del pèptid: A.1.Mirístic i A.1.Hexanòic. A més es va utilitzar un subproducte de la síntesi d'A.1.Mirístic que conservava un grup protector (PMC) incorporat al pèptid.

La diferent longitud de la cadena alquíllica dóna diferents característiques de hidrofobicitat, essent la de 14 C molt més apolar i per tant molt més afí a la bicapa lipídica. A la pràctica això es va traduir en un percentatge d'incorporació als liposomes més elevat en el cas d'A.1.Mirístic, mentre que el derivat A.1.Hexanòic quedava distribuït entre la fase aquosa i la fase lipídica, incorporant-se en menor proporció.

6.3.1. Determinació de la incorporació de peptid als liposomes

Incorporació dels derivats hidròfobs d'A.1

Liposomes amb A.1.Hexanòic.

Es va fer una Anàlisi d'Aminoàcids quantitativ per determinar la concentració exacta de la solució d'A.1.Hexanòic de partida i la quantitat de peptid present als liposomes finals. A partir de la quantitat inicial de derivat peptídic addicionada a la barreja de fosfolípids i de la final unida als liposomes es va determinar el percentatge d'incorporació.

Taula 3: Incorporació del derivat A.1.Hexanòic als liposomes.

mg A.1.Hex. inicial	0.5	1	2
mg A.1.Hex. final	0.196	0.420	0.589
% incorporació	39.28	42.03	29.47
concentració A.1 final (mg/mL)	0.112	0.237	0.333

Es va utilitzar quantitats creixents d'A.1.Hexanòic que corresponien a una relació molar del 1.3%, 2.6% i 5.16% respectivament. Es va utilitzar aquestes proporcions degut a que el derivat peptídic s'ha d'intercalar entre la bicapa lipídica i quantitats majors podrien desestabilitzar-la.

Els resultats obtinguts indiquen que hi ha una relació proporcional entre la quantitat inicial de A.1.Hexanòic addicionada i la quantitat final als liposomes, essent aquesta més gran al augmentar la quantitat de partida. Però al mateix temps es pot observar una disminució en el percentatge d'incorporació quan la relació molar és del 5.16 %, el que pot indicar una saturació de la bicapa lipídica, de forma que el derivat hexanoil en excés queda a la fase aquosa.

En tots els casos veiem que la incorporació no és quantitativa, tot i que s'esperava que A.1.Hex. es comportés com un fosfolípid i que quedés unit per la part apolar sense pèrdues significants. Això és degut a que la cadena apolar del derivat és curta i li dona poc caràcter hidròfob, quedant en part dissolt a la fase aquosa.

Liposomes amb A.1.Miristic.

Igual que a l'apartat anterior, es va determinar per Anàlisi d'Aminoàcids la concentració de la solució d'A.1.Miristic adicionada inicialment i la concentració final als liposomes. A partir d'aquests valors s'obté el percentatge d' incorporació.

En aquest cas es va ampliar l'estudi i es va addicionar als liposomes 6 quantitats diferents d'A.1.Miristic. Els resultats obtinguts es recullen a la següent taula.

Taula 4: Incorporació d'A.1.Miristic en liposomes.

mg A.1 inicials	0.35	0.50	0.705	1.0	1.411	2.0
mg A.1 finals	0.321	0.50	0.704	0.820	1.214	1.712
% incorporació	91.83	quantitatiu	quantitatiu	82.14	86.05	85.64
concentració A.1 final(mg/mL)	0.214	0.268	0.307	0.395	0.809	0.825

Els resultats indiquen que la incorporació del derivat miristoil als liposomes en tots els casos és més elevada que la de A.1.Hexanòic, amb un rendiment que va del 82% a valors quantitatius. Es pot observar que la unió de pèptid és independent de la quantitat d'A.1.Mir de partida, que està compresa entre una relació molar del 0.75 al 4.15 %. Per tant, el derivat amb la cadena alquilica de 18 C té un caràcter hidròfob superior que li dona molta més afinitat per quedar unit a la bicapa lipídica, amb un comportament similar a la resta de fosfolípids.

Liposomes amb A.1.Miristic-PMC.

En el procés de síntesi del derivat miristoil del pèptid A.1 es va obtenir un subproducte en el que el pèptid conservava el grup protector 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonil (PMC) unit a l'Arg. Atés que aquest derivat era encara una mica més hidròfob que

l'anterior es va assajar també la seva capacitat d'incorporar-se als liposomes, seguint el mateix protocol que en els altres casos.

Es van fer les mateixes determinacions que en els casos anteriors, obtenint els següents resultats.

Taula 5: Incorporació de A.1.Mir.PMC als liposomes.

mg A.1.Mir.PMC inicials	0.5	1	2
mg A.1.Mir.PMC finals	0.378	0.519	1.128
% incorporació	75.55	51.88	56.41
concentració A.1 final (mg/mL)	0.112	0.154	0.335

El percentatge d'incorporació d'aquest derivat és menor que el de A.1.Mirístic i decreix al augmentar la quantitat addicionada. Això sembla indicar que tot i l'increment d'hidrofobicitat, el grup PMC produeix un impediment estèric que dificulta l'incorporació de la molècula a la bicapa lipídica. Atesa la seva estructura química, el pèptid forma micelles, com s'ha comprovat a l'apartat 5.1, que probablement coexisteixen al medi aquós amb els liposomes i aquesta pot ser la raó de la menor incorporació.

Unió covalent del pèptid A.1 als liposomes.

La determinació de la quantitat de pèptid unit covalentment a la superfície dels liposomes es va fer per Anàlisi d'Aminoàcids quantitatiu.

La reacció es va fer partint de diferents quantitats inicials de pèptid, tenint en compte els mols de NGPE reactius que hi ha als liposomes i utilitzant un excés de 3 vegades de pèptid. La finalitat era ajustar la quantitat de partida de forma s'aconseguís el major % d'unio amb les mínimes pèrdues de pèptid possible.

El percentatge d' unió d'A.1 es va calcular prenent com a valor teòric el nombre de mols de pèptid que poden reaccionar amb la NGPE de la superfície dels liposomes i com a valor real els mols d'A.1 units al final del procés.

Taula 6. Unió covalent d'A.1 als liposomes.

<i>mg A.1 inicials</i>	0.51	0.77	1.02	1	1.5	2
<i>mg A.1 finals</i>	0.112	0.116	0.227	0.168	0.241	0.246
<i>% unió d'A.1</i>	17.76	18.44	36.07	26.69	38.34	39.10
<i>conc. d'A.1 final (mg/mL)</i>	0.056	0.058	0.1137	0.099	0.1422	0.1450

En els resultats de la taula es pot observar que si la quantitat inicial d'A.1 és baixa, la reacció no és completa i queden punts sense unir al pèptid. Al partir de una quantitat de pèptid de compresa entre 1 i 2 mg veiem que el %unió oscila entre el 26 i el 39, que són valors normals descrits a la literatura (48).

Estudi comparatiu del rendiment d'incorporació.

A continuació es representa gràficament la relació entre la quantitat de pèptid o derivat hidròfob de partida front a la concentració final de pèptid als liposomes. D'aquesta manera es pot comparar els diferents mètodes i veure quin té un rendiment d'incorporació més elevat i que permet minimitzar les pèrdues de pèptid en el procés de preparació dels liposomes.

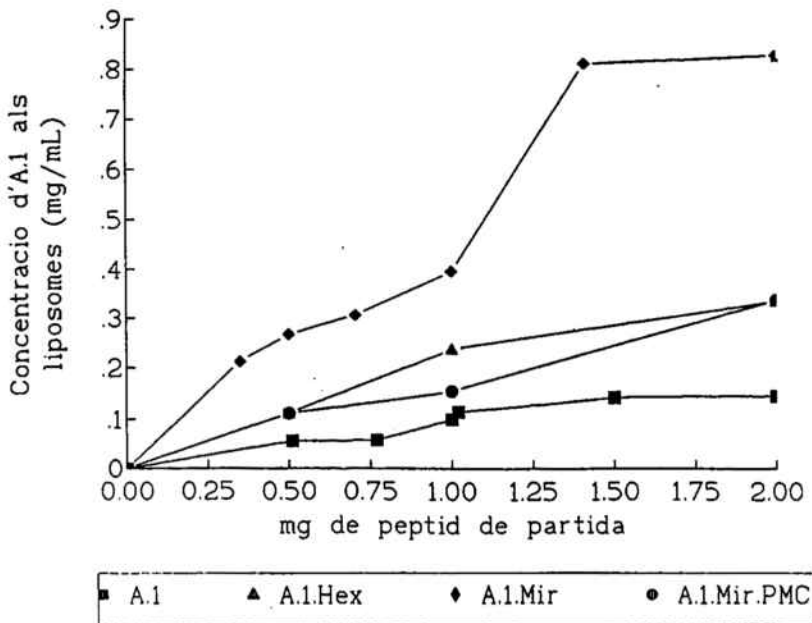


Figura 28: Estudi comparatiu del rendiment d'incorporació d'A.1 i els seus derivats.

La gràfica permet fer un estudi comparatiu dels 4 mètodes d'incorporació del pèptid A.1 als liposomes. Es posa de manifest que el procediment que té millor rendiment i dona la concentració final de pèptid més elevada és la incorporació del pèptid previament modificat per reacció amb àcid mirístic i incorporat a l'inici de la preparació dels liposomes.

6.4. Influència de la presència de pèptids en l'encapsulació de 5-FUR

Un cop estudiades les característiques d'encapsulació de 5-FUR i d'incorporació del pèptid en els liposomes, es va procedir a analitzar la influència de concentracions creixents de derivats hidròfobs de pèptid i de la unió covalent d'A.1 en l'encapsulació del fàrmac.

Per això es va valorar la 5-FUR encapsulada en els diferents lots de liposomes en els que s'havia incorporat tant el pèptid A.1 com els seus derivats hidròfobs. La determinació de la concentració de 5-FUR es va fer per HPLC, com ja s'ha detallat anteriorment (apartat 2.7.1), i es va calcular el percentatge d'encapsulació de 5-FUR. La quantitat de fàrmac encapsulat també es va expressar en funció de la concentració de fosfolípid als liposomes finals (mg 5-FUR/ μ M de PL).

A la següent taula es recull la relació entre la concentració final d'A.1 als liposomes i el % d'incorporació de 5-FUR, distingint entre els diferents mètodes d'unió del pèptid.

Taula 7. Encapsulació de 5-FUR en liposomes amb pèptid A.1 unit.

<i>Lot de liposomes</i>	<i>Conc.A.1.final (mg/mL)</i>	<i>Conc. 5.FUR final (mg/mL)</i>	<i>%Encapsulació</i>	<i>mg5-FUR/μMolPL.</i>
Blancs	—	5.16	38.73	0.313
A.1.Hexanòic	0.112	3.050	22.83	0.186
	0.237	1.948	14.75	0.126
	0.333	1.471	11.04	0.087
A.1.Mirístic	0.214	1.76	13.09	0.117
	0.268	2.62	19.65	0.146
	0.307	1.60	12.04	0.097
	0.395	2.79	20.98	0.175
	0.809	2.70	20.33	0.159
A.1.Mir.PMC	0.825	2.75	20.63	0.183
	0.112	2.24	17.90	0.178
	0.154	1.95	14.66	0.153
A.1	0.335	1.57	11.81	0.132
	0.057	2.24	33.22	0.191
	0.1137	1.95	29.618	0.185
	0.1422	1.575	27.47	0.244

A la taula es pot observar que l'addició del pèptid, ja sigui per unió covalent, o mitjançant derivatització hidròfoba, interfereix en la encapsulació de 5.FUR, siguent aquesta major en els liposomes sense pèptid (blancs). Això pot explicar-se degut a que l'addició del derivat hidròfob implica l'incorporació d'un àcid gras a la bicapa lipídica que pot influir augmentant la seva permeabilitat al pas de la 5.FUR, ja que pot donar una certa discontinuïtat a la bicapa. En el cas de l'unió covalent del pèptid, veiem que la concentració final de 5.FUR no queda tan afectada, tinguent una menor disminució. En aquest cas, no hi ha una interacció amb la bicapa lipídica, però si hi ha major manipulació dels liposomes, que són sotmesos a diverses reaccions químiques, que possiblement són les que produeixen aquests descens d'encapsulació de fàrmac.

7. LIPOSOMES AMB CARBOXIFLUORESCEÏNA

Els liposomes amb carboxifluoresceïna encapsulada a l'interior es van preparar per fer estudis "in vivo" amb els animals d'experimentació amb la finalitat de poder visualitzar la disposició dels liposomes DRV un cops injectats a l'ull.

La carboxifluoresceïna és un marcador fluorescent que permet, utilitzant diferents tècniques que detecten la fluorescència, controlar la localització dels liposomes als teixits oculars i quantificar-los. (49)

7.1. Preparació de solució 100 mM de CF.

Es va preparar una solució de CF lliure en medi aquós que va ser utilitzada com a blanc per poder avaluar la influència de la encapsulació en liposomes tant en la distribució com en la vida mitja del marcador a nivell ocular.

Degut al fenomen de "self-quenching" que presenta la CF, es va ajustar la concentració inicial de la solució, de forma que un cop injectada a l'ull la dosis habitual i diluïda dins en el volum de líquid intraocular (3mL), la concentració de CF es trobés dins de la zona de linealitat entre fluorescència i concentració, que correspon al marge comprés entre 30 μM i 3 μM .

Per obtenir una concentració final 10 μM , tenint en compte que s'injecta 100 μL de solució de CF en un volum final de 3 mL, es va preparar una solució de partida amb una concentració 300 μM i es va ajustar el seu pH a 7, que correspon al pH fisiològic intraocular.

7.2. Determinació de la latència dels liposomes.

La latència és un paràmetre que ens permet controlar l'existència de CF encapsulada a l'interior dels liposomes. Això és possible degut al fenomen de "self quenching" que presenta la CF, que fa que la intensitat de fluorescència sigui proporcional al nombre de partícules presents per sota de concentracions 10 mM i que aquesta intensitat disminueixi ràpidament al augmentar la concentració de la solució de CF, degut a la interacció entre molècules fluoròfores veïnes.

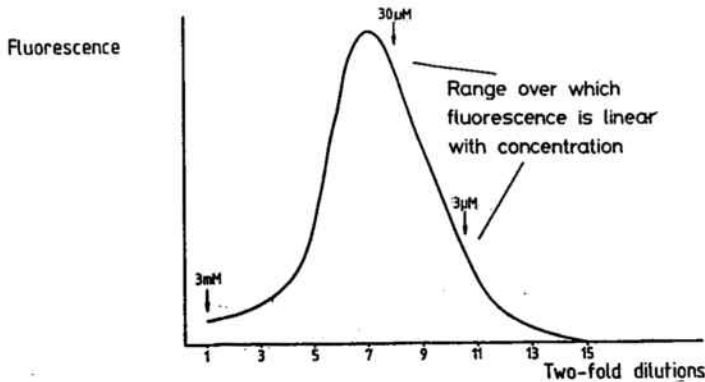


Figura 29. Variació de la fluorescència de la CF segons la concentració.

Per tant, la intensitat de fluorescència inicial de una suspensió de liposomes és molt dèbil, ja que la CF es troba encapsulada a concentracions superiors a 10 mM. Al alliberar-se al medi per acció d'un tensioactiu que trenca els liposomes, la CF es dilueix en tot el volum exterior donant una intensitat de fluorescència proporcional al nombre de partícules presents a la solució.

Per valorar la presència de marcador fluorescent a l'interior dels liposomes es mesura la seva latència. Aquest paràmetre informa de l'existència de CF a l'interior dels liposomes i del seu percentatge respecte a la CF lliure a la solució aquosa externa. La determinació de la latència de les diferents preparacions liposòmiques es va realitzar seguint el protocol descrit a l'apartat 2.9. La fórmula utilitzada va ser:

$$\text{Latència: } \frac{F_t - F_o}{F_t} \times 100$$

on F_t correspon a la fluorescència degut a la CF total present a la solució després de trencar els liposomes i que s'alliberi el seu contingut.

i F_o correspon a la fluorescència inicial de la solució de liposomes, deguda a traces de CF no encapsulada, que queda disolta al medi aquós.

En les diferents preparacions de liposomes es va considerar que latències superiors al 70 % eren correctes i que la quantitat de marcador fluorescent encapsulat era suficient per poder detectar la disposició dels liposomes a nivell ocular.

7.3. Liposomes amb carboxifluoresceïna.

Es va preparar diferents lots de liposomes amb CF a l'interior:

Liposomes MLV sense pèptid.

El motiu pel qual es va preparar MLV és que el mètode de preparació és més senzill i els liposomes resultants tenen un tamany similar als DRV, diferint principalment en la capacitat d'encapsulació, que és més baixa. En el cas de la CF, aquesta diferència no influeix en el resultat final, ja que petites quantitats del marcador donen una fluorescència elevada que pot ser fàcilment detectada.

Les característiques del liposomes preparats es detallen a la següent taula:

Taula 8. Liposomes amb Carboxifluoresceïna.

<i>conc. fosfolípid teòrica (mg/mL)</i>	<i>conc. fosfolípid real (mg/mL)</i>	<i>tamany promig (nm.)</i>	<i>latència (%)</i>
17.75	12.37	348	77.3

Liposomes amb CF i pèptid A.1

Es va preparar DRV amb CF encapsulada als que es va controlar la latència, obtenint un valor elevat. A continuació es va unir el pèptid A.1 als liposomes, mitjançant un enllaç amida amb el grup carboxil de la NGPE present a la superfície dels liposomes. D'aquesta manera es va obtenir liposomes amb un marcador fluorescent a l'interior i pèptid A.1 a la superfície, que van ser probats in "vivo" per estudiar l'influència del pèptid en el procés de "targeting".

A la següent taula es detalla les característiques d'aquesta mostra:

Taula 9. Liposomes amb CF i pèptid A.1.

conc. PL inicial (mg/mL)	conc. PL final (mg/mL)	Latència (%)	conc. final A.1 (mg/mL)	% unió d'A.1
15	6.51	78.6	0.334	47.7

Es pot observar que la concentració final de fosfolípids d'aquest liposomes és bastant més baixa de l'esperada. Això és degut a que en el procés de preparació es va produir una pèrdua de mostra en l'etapa de sonicació.

Es va fer un nou control de la latència de la mostra 20 dies després de la seva preparació, per comprovar l'estabilitat dels liposomes i es va trobar que la latència era del 77%, practicamente la mateixa que en el moment de preparació. Això indica que els liposomes amb CF són estables i la incorporació del pèptid a la seva superfície no els desestabilitza.

Aquestes preparacions han estat assajades al Servei d'Oftalmologia de l'Hospital de la Vall d'Hebron pel grup que dirigeix el Dr. García Arumí. Els resultats obtinguts demostren que es produeix una clara acumulació dels liposomes que contenen el pèptid en les zones de proliferació. Això indica que es produeix efectivament un direccionament de les vesícules i que de manera similar es podrà direccionar la 5-FUR a les cèl.lules diana.

CONCLUSIONS

V. CONCLUSIONS.

1. La síntesi del pèptid A.1 es va fer amb un bon rendiment i sense la formació de subproductes. El pèptid va ser perfectament soluble en H₂O i es va poder caracteritzar i purificar sense problemes.

2. En la preparació dels derivats hidròfobs del pèptid A.1 es va obtenir un elevat rendiment, el que confirma que el mètode seguit és l'idoni per la derivatització hidròfoba de pèptids. En la síntesi del derivat Miristoil es va produir un subproducte que fàcilment va ser desprotegit, obtenint-se el derivat pur, soluble en Metanol. El derivat Hexanoil es va preparar sense subproductes, solubilitzant-se perfectament amb aigua.

3. Al fer els estudis fisicoquímics dels pèptids es va poder observar que la seva hidrofobicitat augmentava al afegir un àcid gras, essent aquesta major com més llarga era la cadena alquílica. A més es va poder comprovar que ni el pèptid lliure, ni el derivat Hexanoil formaven agregats macromoleculars en solució aquosa, mentre que els derivats Miristoil s'agrupaven originant micel·les. Així mateix només aquests últims van presentar activitat superficial.

4. Els liposomes DRV van permetre obtenir una bona eficàcia d'encapsulació de 5-FUR, amb un valor promig aproximat del 38 %, el que representa una relació de fàrmac/fosfolípid de 0.314 mg 5-FUR/ μ M PL.

5. La incorporació del pèptid A.1 als liposomes es va produir amb diferent rendiment segons la tècnica utilitzada. En el cas de la derivatització hidròfoba el rendiment va ser més elevat que en la unió covalent.

-Pel derivat A.1.Hex la incorporació es va fer amb rendiments menors al 50%, el que es pot explicar donat el seu baix caracter hidròfob, que fa que tingui una poca afinitat per incloure's a la bicapa lipídica, i quedi parcialment dissolt a la solució aquosa.

-Pel contrari, a A.1.Mirístic la cadena apolar li confereix una hidrofobicitat que fa que es comporti com un fosfolípid més de la bicapa, unit-se als liposomes de forma practicament quantitativa, per relacions molars que van del 0.45 al 4.15 %.

-El subproducte de la síntesi del A.1.Mirístic, al conservar el grup protector PMC, va tenir més impediment estèric per incorporar-se als liposomes.

-Quan l'unió d'A.1 als liposomes es va fer de forma covalent, es va observar que per quantitats de pèptids que corresponien a un excés de 3 vegades els punts reactius de NGPE presents al liposomes, el percentage d'unió va ser aproximadament del 39%.

Per tant, el fer l'estudi comparatiu entre la quantitat de pèptid de partida i la concentració final d'A.1 als liposomes, es va poder constatar que la tècnica amb un rendiment d'incorporació més elevat va ser l'utilització del derivat Miristoil del pèptid.

6. Es va estudiar la influència del pèptid en l'encapsulació de 5.FUR i es va veure que en les dues tècniques d'incorporació del pèptid es produïa una disminució de concentració de fàrmac als liposomes, essent aquesta més important en el cas de la derivatització hidròfoba del pèptid. Això fa pensar que el pèptid deu produir alteracions a l'estructura de la bicapa que poden ocasionar la pèrdua de fàrmac de l'interior.

7. Dels resultats obtinguts sembla deduir-se que les dues opcions millors són la utilització del derivat miristoil i la del pèptid lliure unit a liposomes preformats.

La decisió final sobre quin dels dos processos és més convenient dependrà del cost, possibilitat d'escalat, i concentracions terapèutiques d 5-FUR assolides en ambdós preparacions.

8. La incorporació del pèptid a la superfície del liposoma permet un alliberament selectiu del seu contingut a fibroblastes. Aquest sistema és doncs capaç de direccionar els liposomes, inhibint la proliferació vitreoretiniana, i reduint els efectes secundaris de la 5-FUR.

BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

- (1) Lee, V.H.L., and Robinson, J.R., *J. Ocul. Pharmacol.*, 2, (1986), 67-108.
- (2) Meisner, D., Mezei, M., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, (1995), 75-93.
- (3) Schaeffer, H.E., and Krohn D.L., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 21, (1982), 220-227.
- (4) Niesman, M.r., *Crit. Rev. Drug Carriers Syst.*, 9, (1992), 1-38.
- (5) Bangham, A.D., Horne, R.W., *Nature*, 186, (1962), 952.
- (6) Kirby, C., and Gregoriadis, G., *Biotechnology*, 2, (1984), 979-984.
- (7) Foong, W.C., Harsanyi, B.B. and Mezei, M., *J. Biomed. Mater. Res.*, 23, (1989), 1213-1229.
- (8) Singh, K., Mezei, M., *Int.J. Pharm.*, 16, (1983), 339-344.
- (9) Taniguchi, K., Yamazawa, N., Itakura, K., Morisaki, K., Hayashi, S., *J. Pharmacobiodyn.*, 11, (1988), 39-46.
- (10) Lee, V.H.L., Urrea, P.T., *Surv. Ophthalmol.*, 29, (1985), 335-348.
- (11) Meisner, D., Pringle, J. and Mezei, M., *Int. J. Pharm.*, 55, (1989), 105-113.
- (12) Patel, H.M., *Biochem. Soc. Trans.*, 13, (1985), 513-516.
- (13) Joondeph, B.C., Peyman, G.A. and Kloobehi, B., *Ophthalm. Surg.*, 19, (1989), 252-256.
- (14) Aldhadyan, A.A., Peyman, G.A., Khoobehi, B., Milner, S. and Liu, K.R., *Int. Ophthalmol.*, 12, (1988), 109-112.
- (15) Chapman, D., *Quat. Rev. Biophys.*, 8, (1975), 185-235.
- (16) Lee, A.G., *Biochim. Biophys. Acta*, 472, (1977), 226-228.
- (17) Oldfield, E., Chapman, D., *FEBS Lett.*, 23, (1972), 285-297.
- (18) Demel, R.A., De Kruijff, B., *Biochim. Biophys. Acta*, 457, (1976), 109-132.
- (19) Damen, J.A., Regts, J., Scherphof, G., *Biochim. Biophys. Acta*, 443, (1976), 629-634.

-
- (20) Senior, J., Gregoriadis, G., Mitropoulos, K.A., *Biochim.Biophys.Acta*, 760, (1983), 111-118.
- (21) Weiss, L., Orr, F.W., Honn, K.V., *FASEB J.*, 2, (1988), 12-21.
- (22) Zetter, B.R., *N. England J. Med.*, 322, (1990), 605-612.
- (23) Cohen, J.L., Irwin L.E., Marshall, G.J., et al., *Cancer Chem Rep*, 58, (1974), 723-731.
- (24) Klein, E., Staff, H., Hilgrew, H., et al., *J. Invest. Dermatol.*, 44, (1965), 351-353.
- (25) Blumenkranz, M.S., Claffin, A., Hajek, A.S., *Ophthalmology*, 91, (1984), 122-130.
- (26) Blumenkranz, M.S., Hartzler, M.K., Hajek, A.S., *Arch. Ophthalmol.*, 105, (1987), 396-399.
- (27) Heath, T.D., López, N.G., Lewis, G.P., Stern, W., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 27, (1986), 940-945.
- (28) Simmons, S.T., Sherwood, M.B., Nichols, D.A., Penne, R.B., Sery, T. and Spaeth, G.L., *Br. J. Ophthalmol.*, 72, (1988), 688-691.
- (29) Assil, K.K. and Wienreb, R.N., *Ophthalmic Surgery*, 19, (1988), 408-413.
- (30) Assil, K.K., Hartzler, M., Weinreb, R.N., Nehorayan, M., Ward, T., Blumenkranz, M., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 32, (1991), 2891-2897.
- (31) Moritera, T., Ogura, Y., Yashimura, N., Honda, Y., Wada, R., Hyon, S., Ikada, Y., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 33, (1992), 3125-3130.
- (32) Fumio, F., Hiroshi, T., Yoshiko, H., Naoko, K. and Takashi, K., *Biochem. and Biophys. Research Commun.*, 220, (1996), 394-398.
- (33) Hynes, R.G., *Cell*, 69, 11-25.
- (34) Kathryn, R.E., Thomas, K., Ramadurgam, K., *Protein Engineering*, Vol 8, 8, (1995), 823-825.
- (35) Beck, K., Hunter, I. and Engel, J., *FASEBJ*, 4, (1990), 148-160.
- (36) Helen Liapis, M.D., Alanna Flath, B.S., Soheikitazawa, M.D., *Diagnostic Molecular Pathology*, 2, (1996), 127-135.
- (37) Kimikazu, H., Yasuko, V., Fusao, K. and Koiti, T., *J. Biochem.*, 119, (1996), 604-609.
- (38) Pytela, R., Pierschbacher, M.D. and Rouslahti, E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, (1985), 5766-5770.

- (39) Merrifield, R.B., *J. Am. Chem. Soc.*, 85, (1963), 2149-2154.
- (40) Fields, G.B., Noble, R.L., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 35, (1990), 3, 161-214.
- (41) Fiorini, R., Curatoha, G., Kantar, A., Giorgi, P.L., Bertoli, E. i Tanfani, F., *Biochemistry Internacional*, 20, (1990), 4.
- (42) Leserman, L.D. i Barbet, J., *Methodologie des liposomes*, Ed. INSERM: Paris, (1982), 135.
- (43) Kirby, C., and Gregoriadis, G., *Liposome Technology*, Vol. I, CRC Press, (1986), 19.
- (44) McClare, C.W.F., *Anal. Bio. Chem.*, 39, (1971), 527-530.
- (45) García Arumí, J., *Tesis Doctoral*, Universidad de Barcelona, (1990).
- (46) Barza, M., Stuart, M. and Skoza, F. Jr., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 28, (1987), 893-900.
- (47) Fonseca, M.J., *Tesis Doctoral*, Universidad de Barcelona, (1994).
- (48) Kung, V.T. and Redemann C.T., *Biochimica et Biophysica Acta*, 862, (1986), 435-439.
- (49) Weinstein, J.N., Yoshikami, S., Henkart, P., Blumenthal, R. and Hagens, W.A., *Science*, 195, (1977), 489-491.