

Nanomedicina y Sociedad: Nanopartículas biodegradables aplicadas a Diagnóstico y liberación controlada de fármacos

Nanomedicine and Society: Biodegradable Nanoparticles applied to Diagnostics and controlled drug delivery of Pharmaceutical drugs

Por Gontero, D. [3]; Bracamonte, G. [1]; Boudreau, D. [2]; Veglia, A [1].

[1]. Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba (INFIQC), Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina.

[2]. Departement de chimie et Centre d'optique, photonique et laser (COPL), Université Laval, Québec (QC), Canada, G1V 0A6.

[3]. Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL), Québec (QC), Canada, G1V 4G2.

*Email: gbracamonte@fcq.unc.edu.ar

Resumen: Los fármacos son ampliamente utilizados en diferentes formulaciones y dosificaciones según la enfermedad. El desarrollo de Nanoestructuras biodegradables en la biomedicina ha permitido solucionar problemas presentes en la utilización de fármacos convencionales microparticulados. Su biodisponibilidad puede ser incrementada permitiendo mejorar la dosificación, prolongar el efecto terapéutico, disminuir las reacciones adversas. Su especificidad es incrementada mediante la incorporación de biomoléculas y de anticuerpos permitiendo de esta manera aumentar la concentración local del fármaco. Además, es posible acoplar tratamientos complementarios para una mayor efectividad. La química supramolecular, basada en enlaces no covalentes, y la química de polímeros permiten la obtención de Nanoestructuras con diversas propiedades. Además, materiales orgánicos híbridos en presencia de Nanopartículas inorgánicas adquieren propiedades metálicas, magnéticas, conductoras, plasmónicas, etc.. De dichos materiales aparecen nuevos conceptos de diseños tal como Nanopartículas con corazón metálico recubiertas con espaciadores moleculares, poliméricos, conteniendo drogas de interés farmacéutico, sobre las cuales se le adicionan biomoléculas, anticuerpos, etc. de manera de conferirles especificidad.

Por último es importante mencionar que además de las aplicaciones de liberación controlada, dichas estructuras tienen diversas aplicaciones tal como detección de eventos biológicos, detección y seguimiento de células, diagnóstico por imágenes y nuevas terapias en Nanomedicina que aportan grandes perspectivas futuras en el mercado farmacéutico.

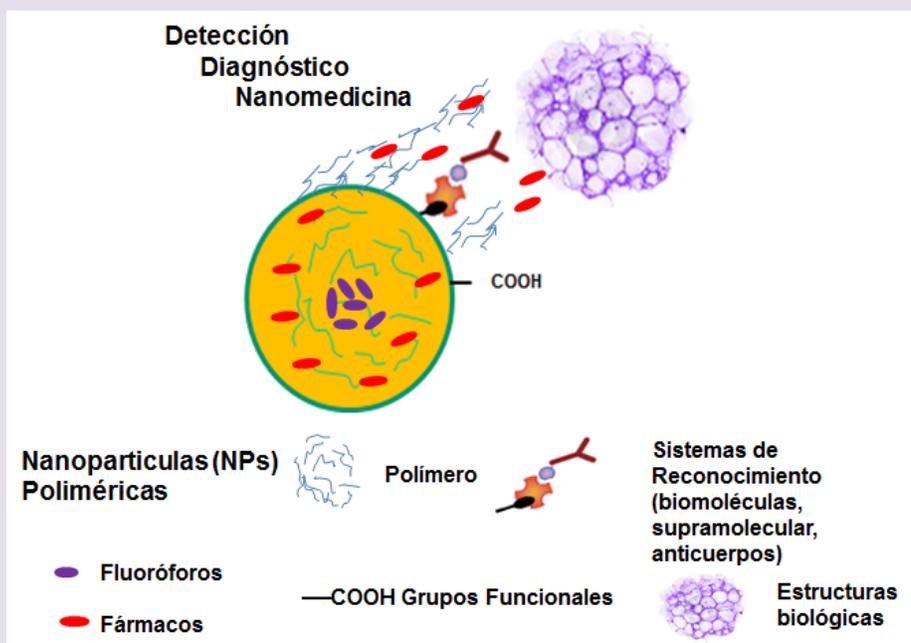
En el presente artículo se presentan resultados obtenidos en la síntesis de diferentes Nanopartículas con aplicación en diagnóstico y Nanomedicina.

Abstract: Pharmaceutical drugs are highly used in different formulation and dosifications depending of the health problem. The development of biodegradable Nanostructures in biomedicine allows to find solutions to present problems for the application, dosing and controlled treatments with microparticulated pharmacophores. The bioavailability could increase allowing improve the dosification, improving the therapeutic effect and diminishing adverse reactions. The specificity is enhanced, by increasing with incorporation of biomolecules and antibodies, and by this manner the local pharmacophore concentration is increased. These Biodegradable Nanostructures could be coupled to other treatments for an enhanced effectivity.

The Nanostructures can be obtained by many chemical structures. From the Supramolecular Chemistry based on non-covalent interactions and polymer chemistry it could be synthesized Supramolecular Nanoparticles and Nanoaggregates with applications in a new field named Supramolecular Nanomedicine. Moreover, in presence of Hybrids Materials from the combination of organic materials and inorganic Nanoparticles it could be obtained Nanomaterials with additional properties as metallic, magnetics, conductors, plasmonics, etc., that in combination with organic materials give as result a multifunctional structure. From this concepts new structures as core-shell Nanoparticles, with polymeric and molecular spacers loaded with fluorophores and pharmacophores, can be used as platforms for targeting of biological structures. It is important that the new trends of developments shows that these Nanostructures are applied not only to drug delivery, but also to Diagnostics and Nanomaging developing new therapies based on Nanomedicine.

In the present Article is presented results in the different topics mentioned in this interdisciplinary field that it is Diagnostics and Nanomedicine.

Resumen Gráfico



Introducción

Los fármacos son ampliamente utilizados en diferentes formulaciones y dosificaciones según la enfermedad. El desarrollo de Nanoestructuras biodegradables en la biomedicina ha permitido solucionar problemas presentes en la utilización de fármacos convencionales microparticuladosⁱ ⁱⁱ. Su biodisponibilidad puede ser incrementada permitiendo mejorar la dosificación, prolongar el efecto terapéutico, disminuir las reacciones adversas. Su especificidad es incrementada mediante la incorporación de biomoléculas y de anticuerpos permitiendo además aumentar la concentración local del fármaco. Además, acoplar tratamientos complementarios para una mayor efectividad.

La utilización de estas Nanopartículas permiten aumentar la solubilidad debido a su mayor relación área/volumen y con esto una mayor biodisponibilidad y menor toxicidadⁱⁱⁱ.

Estas Nanoestructuras, de dimensiones variables entre 10-500 nm, pueden ser obtenidas mediante la utilización de diversas estructuras químicas. La química supramolecular aporta diversas estructuras con la capacidad de formar complejos de inclusión huésped receptor y arreglos auto-ensamblados basados en interacciones no covalentes.^{iv} Por otra parte la química de polímeros permite la obtención de estructuras con diversas propiedades dependiendo de sus monómeros que la componen. De la combinación de ambas áreas de la química, pueden obtenerse polímeros modificados con sistemas supramoleculares los cuales poseen propiedades producto de la combinación de cada uno de sus componentes. Además, materiales orgánicos híbridos en presencia de Nanopartículas inorgánicas le confieren propiedades metálicas, magnéticas, conductoras, plasmónicas, etc.. De dichos materiales aparecen nuevos conceptos de diseños tal como Nanopartículas con corazón metálico recubiertas con espaciadores moleculares, poliméricos, conteniendo drogas de interés farmacéutico, sobre las cuales se le adicionan biomoléculas, anticuerpos, etc. de manera de conferirles especificidad.

Por otra parte, se han desarrollado Nanopartículas formadas por liposomas modificados, polímeros de cadena corta, micelas y sistemas organizados híbridos compuestos por metales con ciertas propiedades físicas y químicas que permiten liberar una droga con alta eficiencia y baja toxicidad^{v.vi}.

Por último es importante mencionar que además de las aplicaciones de liberación controlada, dichas estructuras tienen diversas aplicaciones tal como detección de eventos biológicos, detección y seguimiento de células, diagnóstico por imágenes y nuevas terapias en Nanomedicina que aportan grandes perspectivas futuras en el mercado farmacéutico.

Materiales y métodos

Los polímeros biodegradables son copolímero formados de la combinación de pares de monómeros tal como los ácidos láctico, gálico y málico, entre otros. Su síntesis consta de un método de emulsificación espontánea por la difusión del solvente^{vii}. Los parámetros más importantes a tener en cuenta en la síntesis fueron el emulsificante (PVA, peso molecular 20000) y su relación de R= copolímero/emulsificante; y además la relación entre los solventes utilizados (Rs= H₂O, Acetona, Etanol).

Para la síntesis de Nanopartículas Poliméricas Supramoleculares, según el diseño planteado concentraciones variables de ciclodextrinas, y ciclodextrinas modificadas fueron adicionadas a la Nanoestructura Polimérica mediante la simple incorporación reticular o vía formación de enlaces covalentes.

La síntesis de Nanopartículas metálicas se realizó mediante reacciones de reducción, como el clásico método de Turkevich,^{viii}. De similar manera se realizó la síntesis de Nanopartículas de plata. Variando las cantidades de reactantes se pudo obtener Nanopartículas de dimensiones entre 10-200 nm.

Además, para la obtención de Nanopartículas híbridas, estas Nanopartículas fueron recubiertas de un polímero, de sílica (-SiO₂-), y de una cobertura polimérica biodegradable mediante el método de Störber; y emulsificación espontánea por la difusión del solvente, respectivamente según la aplicación. De esta manera las Nanopartículas además de ser estabilizadas en medio acuoso permiten unir covalentemente, mediante reacciones orgánicas, grupos funcionales, fluoróforos, sistemas supramoleculares, proteínas, anticuerpos, etc.

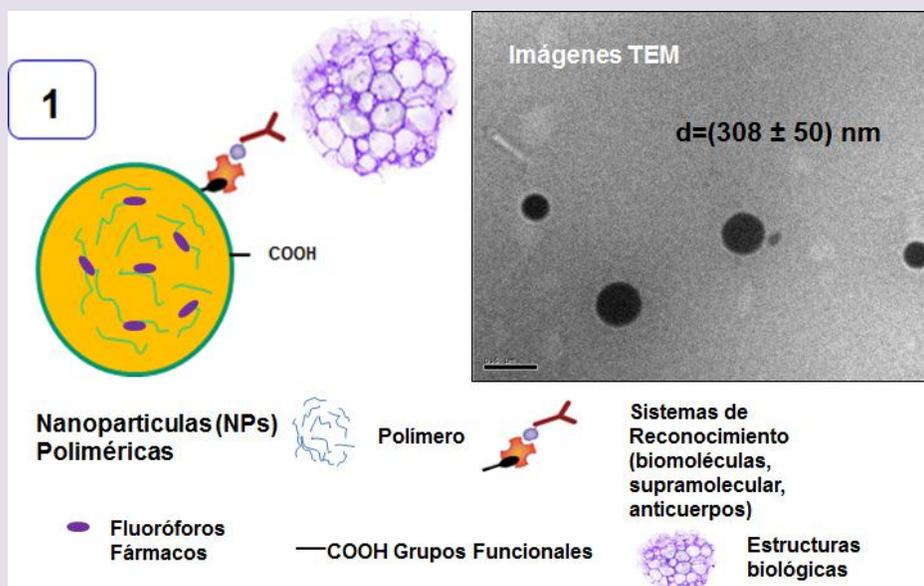
Resultados

Nanopartículas poliméricas biodegradables

Existen diversas Nanopartículas sintetizadas en base a distintos monómeros con diferentes propiedades, tal como ácido gálico, ácido láctico, ácido málico, etc.. Estas Nanoestructuras permiten la incorporación de drogas farmacéuticas, ya sea por la simple encapsulación o mediante la modificación química de grupos funcionales orgánicos. Los fármacos incorporados posteriormente pueden ser liberados de una manera controlada basada en los tiempos de hidrólisis de sus enlaces covalentes según las condiciones del medio o estímulos externos para activar dicho proceso. Dichos procesos son parte del desafío en el diseño de materiales inteligentes. En esta área, en nuestro laboratorio, se han sintetizado Nanopartículas

poliméricas, formadas por copolímeros de ácido láctico y málico, las cuales poseen propiedades no tóxicas por la incorporación de un monómero el cual es biodegradable fácilmente por el organismo. Las Nanopartículas obtenidas poseen una dimensiones entre (200-300) nm (Ver Figura 1), y se ha incorporado moléculas fluorescentes las cuales permitieron realizar estudios de liberación controlada. Esta síntesis de Nanopartículas poliméricas biodegradable posteriormente ha sido utilizada para realizar síntesis de Materiales híbridos orgánicos inorgánicos.

Figura 1



SupraNanopartículas

Nanopartículas basadas en interacciones supramoleculares han mostrado en los últimos años un gran desarrollo. Los sistemas supramoleculares más utilizados para la interacción y formación de Nanoagregados son los macrociclos. Estas estructuras son oligómeros cíclicos con una forma cónica o cilíndrica, que poseen una Nanocavidad que les permite la incorporación de drogas orgánicas.

Además estas estructuras poseen una versatilidad sintética que les permite ser modificados químicamente y ser incorporados en cadenas poliméricas flexibles, las cuales forman mediante interacciones no específicas Nanoagregados. De esta manera la incorporación de drogas orgánicas puede ser realizada por la formación de complejos de inclusión con los macrociclos o por la incorporación dentro de la red polimérica. Es importante destacar que la primera terapia basada en Nanoagregados de macrociclos aplicada en humanos para la liberación específica de RNA (SiRN A) fue desarrollada con ciclodextrinas autoensambladas.^{ix} Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio mediante la utilización de Nanopartículas biodegradables combinadas con ciclodextrinas modificadas mediante enlaces covalentes muestran la formación de Nanopartículas entre (300-600) nm (Ver Figura 2). Mencionadas Nanoestructuras, cuando son modificadas con núcleos fluorescentes, poseen aplicaciones mediante la generación de Nanoimágenes para detección y diagnóstico de estructuras biológicas y eventos biológicos; además de las propiedades de liberación controlada (Trabajo en progreso).

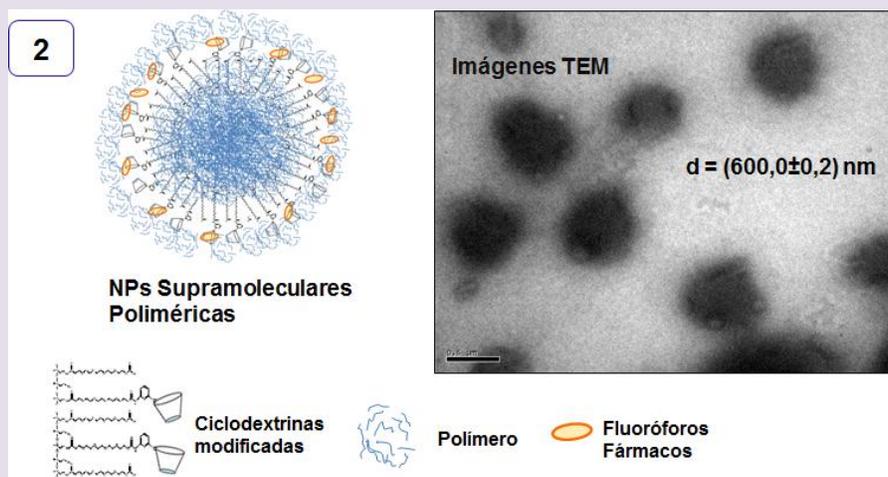


Figura 2

Nanopartículas Inorgánicas y Nanoestructuras híbridas

Diversos métodos de síntesis existen para la obtención de Nanopartículas metálicas, magnéticas, conductoras, etc. las cuales son plataformas con propiedades intrínsecas a cada material que pueden ser modificadas químicamente. Dichas modificaciones tal como la adición de espaciadores moleculares, moléculas estabilizadoras, sistemas supramoleculares, coberturas supramoleculares, coberturas poliméricas, etc., pueden contener fármacos para una posterior liberación. Los materiales híbridos dan como resultado nuevos Nanomateriales inteligentes los cuales poseen características especiales tal como reconocimiento molecular o celular, detección y seguimiento de la Nanopartícula^x, liberación activada mediante estímulos externos,^{xi} biocompatibilidad y biodegradación.

Referida a la síntesis de Nanopartículas Híbridas se ha sintetizado Nanopartículas con corazón metálico de Plata con cobertura de Sílica, la cual fue modificada con diversos fluoróforos mediante la utilización de organosilanos modificados, y bioconjugadas con hebras de ADN^{xii} según la aplicación^{xiii}. Además se han sintetizado Nanopartículas con corazón metálico de oro cubiertas con cobertura polimérica biodegradable, a las cuales mediante enlaces covalentes se ha adicionado fluoróforos, los cuales han sido liberados en tiempos variables en el orden de las horas y los días, según la composición polimérica (Resultado preliminares mostrados en el VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. Simposio de Tecnología Farmacéutica (COIFFA) 2015. Síntesis de Nanopartículas Fluorescentes con Corazón metálico recubiertas con un Polímero Biodegradable aplicadas a la liberación controlada de Fármacos. Gontero, D.; Bracamonte, A. G.; Boudreau, D.; Veglia, A. Libro de Resúmenes-SAFE 2015 ISSN 2250-4079. B- III-87 – 230)^{xiv}.

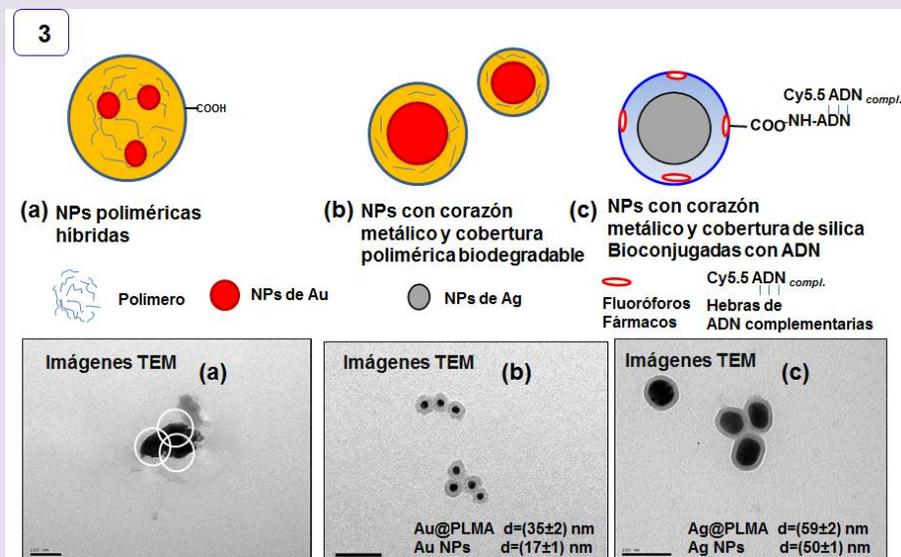


Figura 3

Además en esta temática en nuestro laboratorio, se desarrolló una prueba de concepto de un Nanosistema Multifuncional, el cual incorpora reconocimiento molecular basada en interacciones Supramoleculares, detección basada en el efecto Plasmónico, tal como la fluorescencia incrementada por el metal (**MEF**), control de la señal de detección luminiscente mediante un interruptor en base a una reacción química y liberación controlada de complejos huésped receptor (G. Bracamonte, D. Brouard, M. Lessard-Viger, D. Boudreau, A. Veglia, *Microchem. J.*, 2016,128, 297). Mediante la utilización de Microscopia de fluorescencia se ha logrado la obtención de Nanoimágenes provenientes de Nanoagregados en presencia de concentraciones de Rhodamina B en el orden de nM, lo cual corresponde a 40-50 moléculas detectadas por Nanopartícula, con potenciales aplicaciones en detección unimolecular. En este momento continuamos trabajando en el desarrollo de Nanoestructuras Supramoleculares Ultraluminiscentes aplicadas al diagnóstico por Nanoimágenes y sistemas de liberación controlada con aplicaciones en Nanomedicina (Resultado preliminares mostrados en el Simposio Virtual Molecular Diagnostics 2016. Virtual Event. Labroots, ACS, Fluorescent biodegradable core-shell Nanoparticles applied as platforms for molecular diagnosis by Nanoimaging and drug delivery applications. Gontero, D.; Bracamonte, G.; Boudreau, D.; Veglia, A.)^{xv}.

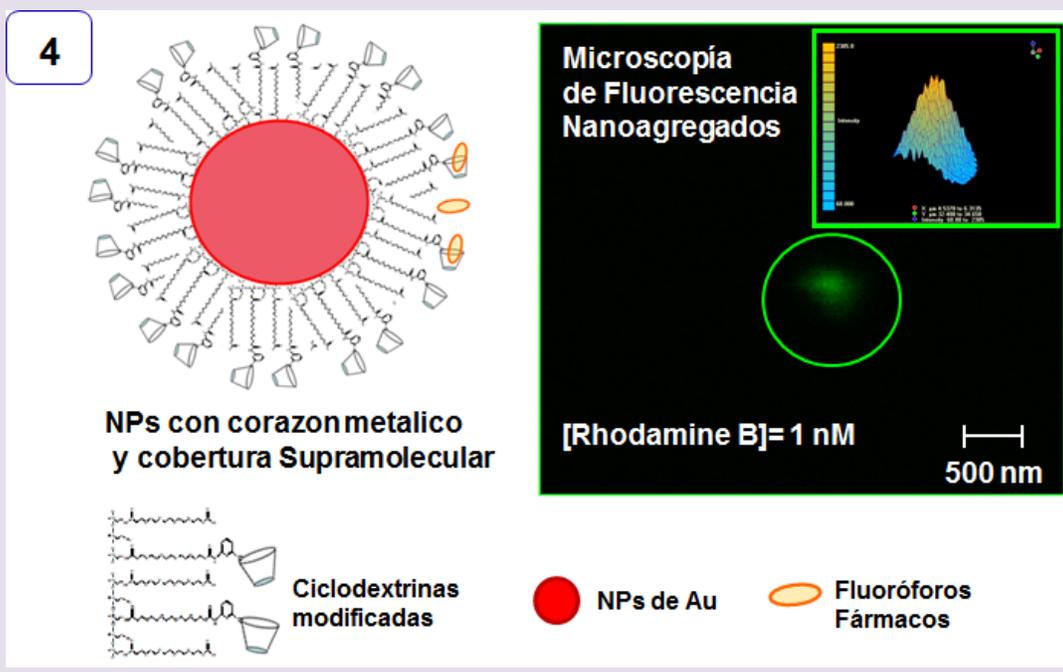


Figura 4

Discusión y conclusiones

La especificidad y la precisión en los nuevos tratamientos médicos exigen el diseño y síntesis de nuevas Nanoestructuras inteligentes multifuncionales que puedan ser activadas en el espacio físico y temporal requerido. Esto es posible debido a la Investigación y desarrollo en áreas tal como la biología molecular y genómica, las cuales indican cuales son los factores más importantes a ser detectados que provocan una determinada enfermedad; y a partir de un posterior análisis la proposición de nuevas terapias médicas. En todos los casos las señales celulares, mediante transmisiones electrónicas y moleculares que deben ser detectadas para la aplicación de un determinado tratamiento se encuentran en la dimensión física del orden de los nm. Es por ello que la síntesis orgánica aplicada a la obtención de nuevas estructuras supramoleculares como elemento constitutivo de la Nanoestructura, copolímeros modificados, al igual que para el desarrollo de nuevos métodos de bioconjugación y nuevos fármacos, es de vital importancia. Además, nuevas áreas de la ciencia como la Nanofotónica, Biofotónica y Nanotecnología permitirán el estudio y aplicación de las nuevas Nanoestructuras a la Nanomedicina, para lo cual debemos responder a los interrogantes de cuáles son los conceptos y desafíos en la dimensión Nano^{xvi}.

Agradecimientos

Se agradece a CONICET y FONCyT por los fondos y becas otorgadas. Un agradecimiento a los Fondos de enseñanza e investigación (Fond d'enseignement et Recherche, FER) por la Beca para realizar los estudios de Maestría en Ciencias a Daniela Gontero en la Facultad de Farmacia, Universidad Laval, Quebec (QC), Canadá. Además, otro agradecimiento al Profesor Denis Boudreau, de la Universidad Laval, Quebec, Canadá, por la oportunidad de Trabajo en Colaboración al coautor A. Guillermo Bracamonte et al.

Referencias bibliográficas

1. Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomat Sci.* (2007) 18:241-68.
2. Panyan J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev.* (2003) 55:329-347.
3. Moddaresi M, Brown MB, Zhao Y, Tamburic S, Jones SA. The role of vehicle nanoparticle interactions in topical drug delivery. *Intern J Pharmac.* (2010) 400 (1-2):176-182.
4. Bracamonte A. Guillermo, Veglia Alicia V. Cyclodextrins nanocavities effects on basic and acid fluorescence quenching of hydroxy-indoles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2013) 261:20– 25.
5. Alexis F., Pridgen E.M., Langer R., Farokhzad O.C., Nanoparticle technologies for cancer therapy, *Handb. Exp. Pharmacol.* (2010) 1:55–86.
6. Nie S., Xing Y., Kim G.J., Simons J.W., Nanotechnology applications in cancer, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* (2007) 9:257–288.
7. Murakami H. et al. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int. J. of Pharm.* (1999) 187:143-152.
8. Kimling J., Maier M., Okenve B., Kotaidis V., Ballot H., Pletch A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J. Phys. Chem. B* (2006) 110: 15700-15707.
9. Davis M. E., Zuckerman J. E. Choi C. H. J. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* (2010) 464 :1067-1071.
10. Y-Ammar A., Sierra D., Mérola F., Hildebrandt N., Le Guével X., Self-Assembled Gold Nanoclusters for Bright Fluorescence Imaging and Enhanced Drug Delivery. *ACS Nano* (2016) 10, 2: 2591–2599.
11. Bracamonte A. Guillermo, Brouard D., Lessard-Viger M., Boudreau D., Veglia Alicia V. Nano-supramolecular complex synthesis: switch on/off enhanced fluorescence control an molecular release using a simple chemistry reaction. *Microchemical Journal* (2016) 128:297–304.
12. Brouard D., Ratelle O., Bracamonte A. Guillermo, St-Louis M., Boudreau D. Direct molecular detection of SRY gene from unamplified genomic DNA by metal enhanced fluorescence and FRET. *Analytical Methods* (2013) 5:6896 - 6899.
13. Brouard D.; Lessard Viger M.; Bracamonte A. G.; Boudreau D. Nanoplasmonic sensing of nucleic acids using fluorescent core-shell nanoparticles and a cationic fluorescent polymer. *ACS Nano* (2011) 5:1888-1896.

14. Gontero, D.; Bracamonte, A. G.; Boudreau, D.; Veglia, A. Síntesis de Nanopartículas Fluorescentes con Corazón metálico recubiertas con un Polímero Biodegradable aplicadas a la liberación controlada de Fármacos. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. Simposio de Tecnología Farmacéutica (COIFFA), 4 al 6 de noviembre de 2015, Córdoba, Córdoba, Argentina. Libro de Resúmenes-SAFE 2015 ISSN 2250-4079 (B- III-87 – 230).
 15. Gontero, D.; Bracamonte, G.; Boudreau, D.; Veglia, A. Fluorescent biodegradable core-shell Nanoparticles applied as platforms for molecular diagnosis by Nanoimaging and drug delivery applications. Molecular Diagnostics 2016. Virtual Event. Labroots, ACS 6-8 de abril de 2016.
- Ariga K., Minami K., Ebara M., Nakanishi J. What are the emerging concepts and challenges in NANO? Nanoarchitectonics, hand-operating nanotechnology and mechanobiology. Polymer Journal (2016) 48:371-389.
-