



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica

TESIS DOCTORAL

DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONALIZADAS CON APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS EN BIOMEDICINA

María Victoria Cano Cortés

Directores de la tesis:

Dra. Rosario M^a Sánchez Martín

Dr. Juan José Díaz Mochón

Granada, 3 de Julio de 2018



**CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María Victoria Cano Cortés
ISBN: 978-84-9163-930-5
URI: <http://hdl.handle.net/10481/52440>

A mis hijos, Javi y David,
la razón de todo

Para eso sirven los sueños ¿No? Para enseñarnos hasta dónde podemos llegar.

Laura Gallego

AGRADECIMIENTOS

Existen momentos en la vida de toda persona en los que se toman decisiones que cambian el curso de su vida, comienzo estos agradecimientos en ese momento, agradeciendo la oportunidad de trabajar en investigación a la Dra. Rosario María Sánchez Martín y el Dr. Juan José Díaz Mochón, protagonistas principales y directores de esta tesis doctoral para los cuales solo tengo palabras de gratitud. Gracias por vuestra dedicación y entrega a este mundo, sois un gran ejemplo para todos nosotros y, en especial, para mí. Gracias por enseñarme y acompañarme en esta nueva etapa profesional que tanto estoy disfrutando. Y, sobre todo, gracias porque directa o indirectamente sois responsables de que haya alcanzado mi gran sueño. Juanjo por tu energía inagotable, por tu lucha diaria contra Goliath. Rosi, para ti mi más profunda admiración, conozco a pocas personas tan completas como tú, tanto profesional como personalmente. Es un honor que también seáis mis amigos.

Esta tesis no hubiera sido tesis sin mi grupo de investigación NanoChemBio, del que tengo la gran suerte de formar parte desde el principio. Angélica muchas gracias por ser como eres, siempre dispuesta a ayudar, este grupo se quedará cojo cuando inicies tu nueva etapa. M^a Paz gracias y mil gracias por todo el trabajo hecho, por coger el relevo en esos momentos en los que no estaba, por todas tus preguntas que me cuestionan y me hacen mejor investigadora, y ¿por qué no? por nuestros desacuerdos, las relaciones duraderas los son por ellos. Antonio, gracias por ser como eres, entiendo que seas amigo de todos porque nos haces sentir como en casa, gracias por los trabajos compartidos, aprendo muchísimo. Jose L. no hemos compartido mucho tiempo pero me encanta trabajar con gente como tú, siempre dispuesta a hacer todo lo que hace falta, con tanta ilusión, con tantas ganas de aprender, gracias por tu entusiasmo, la ciencia necesita mucha gente como tú. Ya son unos cuantos los que han pasado por el grupo y no están pero gracias a Juandi por esos primeros tiempos cuando me enseñaste tantos truquillos de todo y por ese artículo que tenemos a medias, a Patri, siempre rápida, siempre eficaz, gracias por todo. Gracias a Bea, Mari, Marta, M^a José, Francesco, Laura, Lourdes, Juan Antonio, Tere, Rafa, Anabel por todo lo compartido. Y, por último, al resto de compañeros Agu, Alvaro, Antonio, Jose, Aitor, Silvia con los que espero disfrutar muchos

momentos y mucha ciencia. Por cierto, creo que la paridad está desapareciendo en nuestro grupo...

He tenido la gran suerte de trabajar durante todo este tiempo en Genyo y con su gente. En este universo de Genyo quiero empezar dando las gracias a Tomas y Laura del grupo de Cholo por ser los primeros que me enseñaron los secretos de la biología molecular y los cultivos celulares. Y extendiendo las gracias a todo su grupo, A todo el equipo de administración por su cercanía. A Alberto por su trabajo a pesar de que su vida en estos momentos sea azul oscuro casi negro. A servicios generales por su profesionalidad, y, en especial, a Olivia que me ha enseñado mucho de citometría, a Fernando por responder siempre con tanta celeridad y amabilidad, a Raquel y Sara por tantas horas que hemos pasado buscando nanos en confocal, por sus numerosas explicaciones y por ser siempre tan atentas conmigo, aunque intuyo que son así con todo el mundo. A Jorge, Fernando y Miguel, de seguridad, y Carmen y Lucía porque Genyo no funcionaría sin vosotros, por vuestra profesionalidad y por vuestra calidad humana, gracias por hacernos la vida tan fácil. A Juan Carlos, gracias por tu sonrisa y por ser como eras, nos dejaste muy pronto pero siempre formarás parte de este universo. Y, como no, al grupo de Juan Carlos Manzanque, porque son como mi segundo grupo, gracias por todo, no tengo palabras, Mariades gracias por todo lo que me has enseñado en cultivos, por ser mi apoyo y escucharme siempre que lo necesito, gracias a Juan Carlos, Javi guapo, Carlos y Silvia por las PCR, las colaboraciones y todo lo demás... Gracias a Nieves, Rosi, Judit, M^a José, Manuel y todos los que no nombro por las charlas en el comedor, los pasillos, las salas... A mi gente de la sala de estudio, Jose, Inma, Orlando, Diego... por esos buenos ratos y por su apoyo.

A Rossella y Rita de NanoGetic, S.L, por su buen hacer, tesón y determinación. A todo el equipo de Destina por ser tan grandes.

Quiero terminar estos agradecimientos con mi familia, mi padre Antonio y mi madre Mari, no puedo estar más orgullosa de ellos. Gracias papá y mamá por todo, todo lo bueno que tengo es mérito vuestro, gracias por hacerme la vida fácil, por quererme siempre y por creer en mí. Mis hermanas Carmen y Cristina, no concibo la vida sin vosotras, gracias por ser como sois, fuertes, valientes, gracias por ser mi ejemplo, gracias por tanto, tanto, tanto... A mis sobrinos, Elena, Alejandro, Juan Pablo, Daniel y Álvaro, la

vida es tan bonita con vosotros en ella. A mis tíos y tías, en especial a mis tías Victoria y Mercedes y mi tío Jorge y su familia (Nati, Manuel, Jorge, Pablo y Fernando) por formar parte de toda mi vida, de todos sus momentos. A mis primas, sobre todo Vane por todo lo compartido y todo lo que nos queda, no quiero quedarme fuera, Merce y Bárbara por ser mis primas “chicas” a pesar de sus veintitantos. A Gloria que no es mi hermana pero como si lo fuera, me encanta como eres, no cambies, gracias por todo, por acompañarme en la parte difícil y por estar ahora y siempre. Os quiero tanto.

Javi sin ningún lugar a dudas esta tesis no hubiera sido posible sin ti. Desde la primera vez que entré en el laboratorio tú has formado parte de esta aventura. Gracias por enseñarme casi todo lo que se de química, por ser mi salvador cuando me quedaba estupefacta frente al rotavapor o la bomba de vacío o lo que fuese... Gracias por tu paciencia infinita cuando estoy delante de un ordenador, ya se que no eres el culpable de que se actualice en los momentos más inadecuados. Gracias por todas las aportaciones y correcciones hechas en esta tesis que también es un poco tuya. GRACIAS por regalarme esos dos hijos perfectos y maravillosos que tenemos, por cuidarlos todos los ratos que me ha robado esta tesis y por ser un gran padre. Te quiero.

A todas las personas que se convierten en tu familia, gracias a Juan y Pablo por querer a mis hermanas y sobrinos. A toda la familia de Javi por acogerme tan bien como si fuera una más de ellos, en especial, a sus padres Alfredo y Manoli y a Amalia, que me hizo sentir como su nieta.

Gracias a mis niñas de Málaga, Aurora, Coty y Mónica, siempre en mi corazón.

La doctoranda **María Victoria Cano Cortés** y los directores de la tesis: **Dra. Rosario M^a Sánchez Martín** y **Dr. Juan José Díaz Mochón**.

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Lugar y fecha:

Granada, 3 de Julio de 2018

Doctoranda

Firmado: María Victoria Cano Cortés

Directores de la Tesis

Firmado: Dra. Rosario M^a Sánchez Martín

Firmado Dr. Juan José Díaz Mochón

Índice

Índice

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	V
Capítulo I: Introducción	9
1.1. Nanomedicina	9
1.1.1. El papel de las nanopartículas en nanomedicina	10
1.1.2. Tipos principales de nanopartículas	13
1.1.2.1. Liposomas	13
1.1.2.2. Conjugados fármaco-polímeros	14
1.1.2.3. Nanopartículas poliméricas	14
1.2. Liberación selectiva de fármacos mediante nanopartículas en la terapia contra el cáncer	17
1.2.1. Orientación pasiva: efecto EPR	19
1.2.2. Orientación activa	22
1.2.2.1. Fundamento de la orientación activa	23
1.2.2.2. Influencia de la arquitectura de las nanopartículas orientadas activamente	24
1.2.3. Interacciones de las nanopartículas con las proteínas. Formación de la corona proteica	27
1.3. Traslación de las nanopartículas poliméricas a la clínica	29
1.4. Antecedentes de las nanopartículas de poliestireno en aplicaciones médicas ..	33
OBJETIVOS	47
Capítulo II: Síntesis y Caracterización de las nanopartículas para su uso en aplicaciones biológicas	53
2.1. Síntesis de nanopartículas poliméricas de poliestireno biocompatibles	53
2.2. Resultados	54
2.2.1. Síntesis de nanopartículas de poliestireno aminometiladas y reticuladas ...	54
2.2.1.1. Síntesis del monómero amino funcionalizado	55
2.2.1.2. Síntesis de nanopartículas por polimerización por dispersión	55
2.2.1.3. Síntesis de nanopartículas por polimerización por emulsión libre de emulsionante	58
2.2.2. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas	60
2.2.2.1. Tamaño	61
2.2.2.1.1. Tamaño de las nanopartículas mediante dispersión de luz dinámica (DLS)	61

2.2.2.1.2. Tamaño de las nanopartículas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	63
2.2.2.1.3. Tamaño de las nanopartículas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	63
2.2.2.1.4. Tamaño de las nanopartículas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)	64
2.2.2.2. Caracterización de la superficie.....	65
2.2.2.2.1. Potencial zeta.....	65
2.2.2.2.2. Cuantificación de los grupos aminos	66
2.2.2.3. Estabilidad	69
2.2.2.4. Consistencia entre lotes	71
2.2.3. Caracterización in vitro.	71
2.2.3.1. Citotoxicidad celular	71
2.2.3.2. Formación de la corona proteica.....	73
2.3. Nanopartículas multifuncionalizadas	74
2.3.1. Funcionalización de las nanopartículas.....	74
2.3.2. Doble funcionalización de las nanopartículas: Ortogonalidad Fmoc-Dde....	75
2.3.3. Multifuncionalización de las nanopartículas.....	76
2.4. Discusión	79
Capítulo III. Desarrollo de un método basado en espectrofotometría para la cuantificación de nanopartículas por célula. Un parámetro clave para evaluar los ensayos celulares basados en nanopartículas.	83
3.1. Cuantificación de nanopartículas	83
3.1.1. Requisitos necesarios para la cuantificación celular de nanopartículas.....	84
3.1.2. Técnicas de cuantificación de nanopartículas	85
3.2. Resultados.....	89
3.2.1. Desarrollo de un método espectrofotométrico para cuantificar nanopartículas.....	89
3.2.1.1. Síntesis y funcionalización de las nanopartículas.....	89
3.2.1.1.1. Caracterización de las nanopartículas	91
3.2.1.1.2. Elaboración de las curvas de calibración.....	92
3.2.1.1.3. Aplicación del método espectrofotométrico	95
3.2.2. Multiplicidad de la nanofección	97
3.3. Discusión	103

Capítulo IV: Nanopartículas como agentes de liberación selectiva de fármacos: Diseño y validación de estrategias químicas y evaluación biológica.	109
4.1. Liberación selectiva de fármacos	109
4.1.1. Nanopartículas sensibles a pH	112
4.2. Resultados	113
4.2.1. Preparación de las nanopartículas como agentes de liberación selectiva de fármacos	113
4.2.1.1. Preparación de las nanopartículas DOX-NP	115
4.2.1.2. Caracterización de los conjugados DOX-NP (4.5)	117
4.2.2. Evaluación de la capacidad de nanofección de los conjugados DOX-NP	120
4.2.3. Evaluación de la capacidad terapéutica de los conjugados DOX-NP	123
4.3. Discusión	126
Capítulo V: Utilización de las nanopartículas como sondas de marcaje tumoral: Diseño de una estrategia para la liberación dirigida y selectiva de nanopartículas mediante anticuerpos monoclonales.	131
5.1. Anticuerpos monoclonales como herramientas para la liberación selectiva de nanopartículas	131
5.1.1. Métodos de conjugación de los anticuerpos a las nanopartículas	134
5.1.1.1. Métodos de conjugación aleatoria	134
5.1.1.2. Métodos de conjugación específica de sitio	135
5.1.2. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como diana terapéutica para los conjugados Ac-NP	135
5.1.3. Conjugación del anticuerpo antiEGFR a las nanopartículas	136
5.2. Resultados	138
5.2.1. Síntesis y preparación de las nanopartículas para su utilización como sondas de marcaje tumoral	138
5.2.1.1. Funcionalización de las nanopartículas	139
5.2.1.1.1. Conjugación del anticuerpo antiEGFR a las nanopartículas mediante la estrategia maleimida-tiol	139
5.2.1.1.2. Conjugación del anticuerpo antiEGFR a las nanopartículas mediante química clic	143
5.2.1.1.3. Caracterización de los conjugados de anti-EGFR-NPs	146
5.2.1.1.3.1. Determinación de la concentración de anticuerpo mediante el ensayo BCA	148
5.2.1.1.3.2. Electroforesis en gel de agarosa	149
5.2.1.1.3.3. Inmunofluorescencia	150

5.2.2. Validación in vitro de los conjugados EGFR-NP como sondas de marcaje tumoral.....	152
5.2.2.1. Modelo celular.....	152
5.2.2.2. Nanofección de los conjugados EGFR-NP	153
5.2.2.3. Estudios de competitividad	158
5.2.2.4. Ensayos de citotoxicidad in vitro	159
5.2.3. Preparación de las nanopartículas para su utilización como sistemas de liberación dirigida y selectiva de fármacos	160
5.2.3.1. Conjugación de la doxorubicina a los conjugados EGFR-NP	161
5.2.3.1.1. Caracterización de los conjugados DOX-EGFR-NP.....	164
5.2.3.1.1.1. Eficacia de conjugación de la doxorubicina y perfil de liberación	165
5.2.3.2. Evaluación de la citotoxicidad de los conjugados DOX-EGFR-NP.....	166
5.3. Discusión	170
Capítulo VI: Nanopartículas como agentes de teranosis: Desarrollo de estrategias para la liberación dirigida y selectiva de nanopartículas basadas en homing peptides. ...	177
6.1. Diseño de nanopartículas teranósticas.....	177
6.1.1. Elección de los ligandos para la orientación activa de las nanopartículas. Homing peptide: RGD.....	179
6.1.1.1. Péptidos RGD.....	180
6.1.1.1.1. Péptido CRGDK	182
6.1.2. Nanopartículas teranósticas utilizadas en la terapia contra el cáncer basadas en homing peptide.	183
6.2. Resultados.....	185
6.2.1. Preparación de las nanopartículas para su utilización como agentes de teranosis	185
6.2.1.1. Preparación de las nanopartículas con marcaje fluorescente.	187
6.2.1.2. Preparación de nanopartículas dirigidas activamente mediante homing peptide.....	188
6.2.1.2.1. Síntesis del ligando de naturaleza peptídica	189
6.2.1.2.2. Síntesis del homing peptide CRGDK	190
6.2.1.2.3. Conjugación quimioselectiva del homing peptide a las nanopartículas.	193
6.2.2. Preparación de las nanopartículas conjugadas a la doxorubicina.....	193
6.2.2.1. Caracterización de las nanopartículas.....	194

6.2.2.1.1. Determinación de la concentración del homing peptide mediante el ensayo BCA	196
6.2.2.1.2. Eficacia de conjugación de la doxorubicina y perfil de liberación	197
6.2.3. Preparación de las nanopartículas como agentes teranósticos	198
6.2.3.1. Caracterización de las nanopartículas teranósticas	198
6.2.4. Evaluación in vitro de la capacidad de nanofección de las nanopartículas	202
6.2.4.1. Análisis de eficiencia de internalización de nanopartículas teranósticas en modelo celular	202
6.2.5. Ensayos de citotoxicidad in vitro de las nanopartículas teranósticas y sus controles.....	209
6.2.6. Evaluación in vivo de las nanopartículas teranósticas.....	213
6.3. Discusión	217
CONCLUSIONES	223
Capítulo VII. Parte experimental	227
7.1. Información general.....	227
7.1.1. Equipamiento químico	227
7.1.2. Equipamiento biológico	228
7.2. Protocolos generales	228
7.2.1. Lavado de monómeros.....	228
7.2.2. Lavado de las nanopartículas de poliestireno.....	229
7.2.3. Caracterización de las nanopartículas.....	229
7.2.3.1. Contenido sólido de la emulsión	229
7.2.3.2. Preparación de muestras de nanopartículas de poliestireno para microscopía electrónica de barrido.....	230
7.2.3.3. Preparación de muestras de nanopartículas de poliestireno para microscopía electrónica de transmisión.....	230
7.2.3.4. Preparación de muestras de nanopartículas de poliestireno para microscopía de fuerza atómica	230
7.2.3.5. Medida del tamaño de la población nanopartículas.....	230
7.2.3.6. Medida del potencial zeta	230
7.2.3.7. Cálculo del número de partículas por gramo.....	230
7.2.3.8. Test cualitativo de ninhidrina	231
7.2.3.9. Soluciones de ninhidrina	231
7.2.3.10. Test para medir Fmoc libre.....	231
7.2.4. Acoplamiento tipo amida en nanopartículas utilizando esteres activados.	232

7.2.5. Acoplamiento en nanopartículas utilizando éster N-hidroxisuccinimídico (NHS).....	232
7.2.6. Acoplamiento en nanopartículas utilizando anhídridos de ácido	232
7.2.7. Preactivación de las nanopartículas carboxifuncionalizadas.....	233
7.2.8. Desprotección del grupo Fmoc de las nanopartículas.....	233
7.2.9. Desprotección del grupo Dde de las nanopartículas en presencia de Fmoc	233
7.2.9.1. Preparación de la solución para la desprotección	233
7.2.9.2. Desprotección del grupo Dde.....	233
7.2.10. Protocolos biológicos	234
7.2.10.1. Cultivos celulares	234
7.2.10.2. Curvas de crecimiento celular y tiempo de división celular.....	234
7.2.10.3. Nanofección de las células adherentes	234
7.2.10.4. Estudio de la nanofección mediante citometría de flujo	235
7.2.10.5. Estudio de la nanofección mediante microscopía confocal.....	235
7.2.10.6. Viabilidad celular	236
7.2.10.7. Análisis estadístico.....	236
7.3. Parte experimental del capítulo 2	237
7.3.1. Síntesis de 4-vinil bencilftalimida (VII)	237
7.3.2. Síntesis de vinil bencilamina (VIII).....	239
7.3.3. Síntesis de hidrocloreuro de vinil bencilamina (IX).....	239
7.3.4. Síntesis de las nanopartículas de poliestireno de 500 nm.....	241
7.3.5. Síntesis de las nanopartículas de 100-200 nm.....	242
7.3.6. Síntesis de Ácido Fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiaminasuccinámico (espaciador polietilen glicol) (XV)	243
7.3.7. Síntesis de Dde-OH (XI)	245
7.3.8. Síntesis de Fmoc-Lys(Dde)-OH (XII).....	247
7.3.9. Comprobación de la formación de la corona proteica	248
7.4. Parte experimental del capítulo 3	249
7.4.1. PEGilación de las nanopartículas de poliestireno	249
7.4.2. Desprotección del grupo Fmoc de las nanopartículas protegidas con Fmoc (3.2)	249
7.4.3. Preparación de las Cy5-PEG-NP (3.3).....	249
7.4.4. Preparación de las CBF-PEG-NP (3.4).....	250

7.4.5. Nanofección de las Cy5-PEG-NP (3.3)	250
7.4.6. Microscopía confocal de las células nanofectadas con Cy5-PEG-NP (3.3) .	251
7.5. Parte experimental del capítulo 4.	251
7.5.1. Preparación de los conjugados DOX-NP (4.5)	251
7.5.2. Perfil de liberación de la doxorubicina in vitro.....	252
7.5.3. Nanofección de los conjugados DOX-NP (4.5)	253
7.5.4. Microscopía confocal de las células nanofectadas con DOX-NP (4.5)	253
7.5.5. Viabilidad celular	253
7.5. Parte experimental del capítulo 5.	253
7.5.1. Preparación de las nanopartículas PEGiladas y bifuncionalizadas (5.2)	253
7.5.2. Preparación de las nanopartículas SPDP-NP (5.4)	254
7.5.3. Preparación del conjugado EGFR-SPDP-NP (5.9)	254
7.5.4. Funcionalización del anticuerpo antiEGFR con sulfo-SMCC (XIII)	255
7.5.5. Preparación de las nanopartículas FAM-BCN-NP (5.11)	255
7.5.6. Preparación del conjugado EGFR-BCN-NP (5.14).....	256
7.5.7. Funcionalización del anticuerpo antiEGFR con N ₃ -PEG ₄ -NHS (XIV)	256
7.5.8. Preparación del conjugado DOX-EGFR-SPDP-NP (5.20).....	257
7.5.9. Preparación del conjugado DOX-EGFR-SPDP-NP (5.24).....	257
7.5.10. Cuantificación de proteínas mediante ensayo BCA.....	257
7.5.11. Gel de agarosa	258
7.5.12. Inmunofluorescencia.....	258
7.5.13. Nanofección de los conjugados EGFR-NP	258
7.5.14. Microscopía confocal de la nanofección de los conjugados EGFR-NP	259
7.5.15. Perfil de la liberación de la doxorubicina in vitro	259
7.5.16. Viabilidad celular	259
7.5.17. Extracción de ARN, síntesis de cDNA y PCR cuantitativa	259
7.6. Parte experimental del capítulo 6	260
7.6.1. Preparación de las nanopartículas doblemente PEGiladas y bifuncionalizadas (6.3)	260
7.6.2. Preparación de las nanopartículas fluorescentes (6.4).....	260
7.6.3. Síntesis del péptido CRGDK (XXII)	260
7.6.4. Preparación de las nanopartículas dirigidas activamente por el homing peptide CRGDK (6.7).....	262
7.6.5. Preparación de las nanopartículas conjugadas a la doxorubicina (6.9)	262

7.6.6. Preparación de las nanopartículas teranósticas (6.16).....	263
7.6.7. Nanofección de las nanopartículas	263
7.6.8. Microscopía confocal de la nanofección de las nanopartículas	263
7.6.9. Perfil de la liberación de la doxorubicina in vitro	263
7.6.10. Viabilidad celular	264
BIBLIOGRAFÍA.....	267
Anexo: Number of Nanoparticles per Cell through a Spectrophotometric Method - A key parameter to Assess Nanoparticle-based Cellular Assays.....	295

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADAs	<i>Antidrug antibodies</i> (anticuerpos antifármacos)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Atomic force microscopy (microscopía de fuerza atómica)
Ag	Antígeno
AH	Ácido hialurónico
AIBN	2,2'-azobisisobutironitrilo
ANOVA	Análisis de la varianza de un factor
BCA	Ácido bicinconínico
BCN	Biciclo [6.1.0] nonyne
Boc	Tert-butiloxicarbonilo
CDR	<i>Complementarity-determining regions</i> (regiones determinantes complementarias)
CPT	Camptotecina
Cy5	Cianina 5
DBCO	Dibenzociclooctino
Dde	Etil 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)
DIC	N,N'-Diisopropil carbodiimida
DIC	<i>Differential interference contrast</i> (contraste de interferencia diferencial)
DIPEA	N,N'-Diisopropil etilamina
DLS	<i>Dinamic light scattering</i> (dispersión de luz dinámica)
DMF	Dimetil formamida
DOX	Doxorrubicina
DTT	Ditiotreitol
DTX	Docetaxel
DVB	Divinilbenceno
ECM	Matriz extracelular
EDC	1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (receptor del factor de crecimiento epidérmico)
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agencia Europea del Medicamento)
eNPs	Nanopartículas " <i>ingenierizadas</i> "
EPR	Efecto de permeabilidad mejorada y de retención
ETPN	<i>The European Technology Platform for Nanomedicine</i> (Plataforma tecnológica europea de nanomedicina)
FBS	Suero fetal bovino
FDA	<i>Food Drug Administration</i> (Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

Fmoc	9H-fluoren-9-il-metoxicarbonilo
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (proteína fluorescente verde)
Her2	Receptor epidérmico humano 2
HP	<i>Homing peptide</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (cromatografía líquida de alto contenido)
HPMA	N- (2-hidroxipropil) etacrilamida
ICP	<i>Inductively coupled plasma</i> (plasma de acoplamiento inductivo)
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
ipARN	ARN interferente pequeño
LD	Laser diffraction (difracción de rayos láser)
mAc	Anticuerpo monoclonal
MDI	Multiplicidad de infección
MDR	Multidrug resistance (resistencia a múltiples fármacos)
miRNA	Micro RNA
MNF	Multiplicidad de la nanofección
mRNA	RNA mensaero
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
MTX	Metotrexato
NHS	N-Hidroxisuccinimida
NIR	Near Infrared Spectroscopy (luz del infrarrojo cercano)
NMP	N-metil-2-pirrolidona
NPs	Nanopartículas
OD	Optical density (densidad óptica)
OES	<i>Optical emission spectrometry</i> (espectrometría de emisión óptica)
OMS	Organización mundial de la salud
Oxima	Acetato de etil 2-ciano-2-(hidroxiimino)
Pd	Paladio
PDI	<i>Polydispersity index</i> (índice de polidispersidad)
PEG	Polietilenglicol
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PTX	Paclitaxel
PVP	Poli(N-vinilpirrolidona)
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)
SPIO	Óxido de hierro supermagnético

SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> (microscopía electrónica de barrido)
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
siRNA	RNA interferente pequeño
siRNA	RNA de silenciamiento
SLS	<i>Static light scattering</i> (dispersión de luz estática)
SMANCS	Poli(estireno-co-ácido maleico)-NeoCarzinoStatin
Sulfo-LC-SPDP	Sulfosuccinimidil 6-(3'-(2-piridilditio) propionamida) hexanoato
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato
TC	Contraste de tomografía computarizada
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> (microscopía electrónica de transmisión)
TNF	Factor de necrosis tumoral
V ₅₀	2,2'-azobis(2-amidinopropano)
VBAH	Hidrocloruro de vinil-bencilamina
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular A
VEGFR	factor de crecimiento del endotelio vascular
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i> (proteína fluorescente amarilla)
ΔMFI	Incremento de la intensidad de fluorescencia

RESUMEN

Las nanopartículas poliméricas ofrecen una gran flexibilidad en la adaptación de su composición química, tamaño, estabilidad, morfología y funcionalidad superficial. Como resultado, se emplean como transportadores de fármacos y agentes de diagnóstico para una amplia gama de aplicaciones en diagnóstico y terapia. Concretamente, se han llevado a cabo numerosos enfoques en nanotecnología para resolver problemas asociados con el uso de agentes terapéuticos convencionales frente al cáncer. El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), siendo la distribución inespecífica de los agentes terapéuticos en los tratamientos actuales una de las causas más importantes de esta alta tasa de mortalidad. Incluso en el caso de la curación completa del cáncer, los efectos secundarios de los fármacos antitumorales son devastadores para el paciente ocasionando una mayor convalecencia. Otras de las limitaciones de los agentes terapéuticos convencionales son la toxicidad sistémica, bajo índice terapéutico y baja solubilidad en agua (para la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos). Por lo tanto, el desarrollo de técnicas terapéuticas con efectos secundarios mínimos y de herramientas de diagnóstico mejoradas son necesarias para el tratamiento del cáncer. La implementación de nuevas estrategias nanotecnológicas ha atraído una gran atención y ofrece una respuesta prometedora en la terapia contra el cáncer.

El objetivo general de esta tesis doctoral es el desarrollo y la validación de nanosistemas multifuncionales para su aplicación terapéutica y diagnóstica frente al cáncer.

Durante el desarrollo del presente trabajo se ha realizado la síntesis y caracterización de nanopartículas de poliestireno aminofuncionalizadas, reticuladas y monodispersas con diferentes tamaños comprendidos entre 100 - 500 nm y se han caracterizado con diferentes técnicas como DLS, microscopía láser confocal, microscopía de barrido y de fuerza atómica (**Objetivo 1**). Se ha descrito una nueva metodología para estimar el número de nanopartículas por volumen de manera rápida y accesible mediante espectrofotometría introduciendo un nuevo parámetro –número de NPs por célula-

que abre un amplio abanico de aplicaciones en ensayos celulares porque asegura la reproducibilidad y el control exhaustivo de las condiciones del experimento permitiendo la comparación entre nanopartículas de diferentes lotes (**Objetivo 2**). Así mismo, hemos desarrollado con éxito un nanosistema terapéutico basado en las nanopartículas de poliestireno para la liberación dirigida y selectiva de fármacos. En primer lugar, se desarrolló y validó, química y biológicamente (*in vitro*), un nanosistema terapéutico basado en nanopartículas funcionalizadas con un fármaco quimioterapéutico (**Objetivo 3**). Basándonos en los resultados obtenidos, se diseñaron y evaluaron, química y biológicamente (*in vitro*), nanosistemas basados en anticuerpos monoclonales, en primer lugar, como sondas de marcaje tumoral y, posteriormente, tras la conjugación del fármaco como agentes terapéuticos selectivos (**Objetivo 4**). Por último, se desarrolló y validó, química y biológicamente (*in vitro* e *in vivo*) un nanosistema teranóstico mediante la trifuncionalización de las nanopartículas con un fármaco, un fluoróforo y un ligando orientador, permitiendo el tratamiento selectivo antitumoral junto con la visualización y el seguimiento de la eficiencia del tratamiento (**Objetivo 5**).

Capítulo I

Capítulo I: Introducción

1.1. Nanomedicina

La primera vez que se habló de **nanotecnología** fue en el año 1959 cuando el físico Richard Feynman, especialista en mecánica cuántica, pronunció su famoso discurso “*There is plenty of room at the bottom*” en el Instituto de Tecnología de California¹. Feynman planteó la posibilidad de manipular objetos en la escala nanométrica anticipando las oportunidades tecnológicas de los mismos. No fue hasta 1974 cuando el término nanotecnología fue acuñado por el profesor Norio Taniguchi de la Universidad de Ciencia de Tokio². El término nanotecnología significa literalmente cualquier tecnología desarrollada en la escala nanométrica que tiene aplicaciones en el mundo real. De manera general, se podría definir como la fabricación de materiales, estructuras, dispositivos y sistemas funcionales a través del control y ensamblado de la materia en la escala nanométrica, así como la aplicación de nuevos conceptos y propiedades (físicas, químicas, biológicas, mecánicas, eléctricas) que surgen como consecuencia de esa escala tan reducida. Entre algunas de las aplicaciones de la nanotecnología destacamos: salud y medicina, electrónica, transporte, energía y medio ambiente y exploración espacial, entre otras³.

En el área de la salud y la medicina hablamos de **nanomedicina**, definida por la plataforma tecnológica europea de nanomedicina (ETPN, del inglés “*The European Technology Platform for Nanomedicine*”) como “la aplicación de la nanotecnología para lograr avances en la atención médica que explota las propiedades físicas, químicas y biológicas, propiedades mejoradas y, muchas veces, nuevas de los materiales en la escala nanométrica”. La nanomedicina utiliza herramientas de tamaño nanométrico para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades y para obtener una mayor comprensión de la fisiopatología compleja y subyacente de la enfermedad. El objetivo final es mejorar la calidad de vida de los pacientes. Comprende tres áreas centradas en: a) el diagnóstico, b) la liberación controlada de fármacos, y c) la medicina regenerativa^{4,5}.

La nanomedicina centrada en la aplicación de las nanopartículas^{6,7} busca abordar varios desafíos médicos y deficiencias a los que se enfrenta la medicina convencional, que incluyen la baja biodisponibilidad del fármaco y de la diana específica, la toxicidad

sistémica y orgánica, entre otras^{8,9}. Las nanopartículas destinadas a un uso médico se han inspirado en las diversas nanopartículas "naturales" presentes en el cuerpo, que incluyen vesículas de tamaño nanométrico, como lípidos, proteínas y biomacromoléculas complejas que regulan el funcionamiento natural de los sistemas vivos, y pueden actuar como portadores de moléculas activas. La mayoría de estos ejemplos comprenden lípidos y nano-transportadores poliméricos con fármacos encapsulados para la liberación dirigida de fármacos de manera sostenida^{10,11,12}.

1.1.1. El papel de las nanopartículas en nanomedicina

Las nanopartículas juegan un papel clave en la nanomedicina, ya que pueden transportar y liberar de forma eficiente sondas de imagen, agentes terapéuticos, o materiales biológicos en sitios específicos, como pueden ser un órgano concreto, un tejido, o incluso, una célula subyacente.

Las **nanopartículas** se definen como aquel material particulado de tamaño nanométrico que presenta diferentes formas como esferas^{13,14}, estrellas¹⁵, planos^{16,17}, formas alargadas^{18,19} etc., y pueden ser diseñadas y preparadas con diversas estructuras poliméricas, pesos moleculares, composición y funciones para satisfacer los requerimientos de un fármaco en particular y su aplicación. Presentan una química definida, así como, características ópticas y mecánicas particulares, gran área superficial frente al volumen y reactividad alta, propiedades únicas que hacen de estos sistemas unas herramientas prometedoras e innovadoras para el desarrollo de plataformas de diagnóstico y de tratamiento, las cuales podrían superar las limitaciones de los tratamientos actuales (**Figura 1.1**). Hasta la fecha, un número considerable de agentes basados en nanopartículas se han desarrollado y aprobado para el tratamiento del cáncer, diabetes, dolor, asma, alergia e infección, entre otros^{20,21}. Más allá del uso ampliamente extendido de las nanopartículas como transportadores de quimioterápicos, como por ejemplo Doxil^{®22}, las nanopartículas han mostrado un gran potencial para el transporte y la liberación de varios agentes terapéuticos nuevos contra el cáncer, incluyendo agentes molecularmente dirigidos²³, oligonucleótidos antisentido^{24,25}, ARN interferente pequeño (sARNi)^{26,27,28,29}, mARN²⁰ y oligonucleótidos inhibidores de ADN²¹, que pueden estar encapsulados o unidos covalentemente a la superficie de las mismas.

Las nanopartículas presentan ventajas claves sobre los agentes moleculares convencionales utilizados en medicina^{4,30}. En primer lugar, los principios activos, por lo general, escasamente solubles en agua, forman dispersiones acuosas estables lo que permite su liberación en el medio biológico. En segundo lugar, se puede adaptar la composición, tamaño, forma y propiedades de la superficie para que, cuando se introduzcan en el medio biológico, puedan proteger a los agentes encapsulados o conjugados de la degradación los distintos mecanismos de defensa endógenos. Los mecanismos de defensa a los que se enfrentan incluyen la degradación enzimática, inmunodegradación, secuestro por el sistema retículo endotelial en el torrente sanguíneo, la hidrólisis ácida en el estómago, aclaramiento mucociliar en los pulmones, etc.⁶. Por lo que al controlar el tamaño, forma y propiedades de superficie pueden dirigirse no solo a órganos o tejidos específicos del cuerpo, sino también a sistemas celulares y subcelulares específicos³¹.

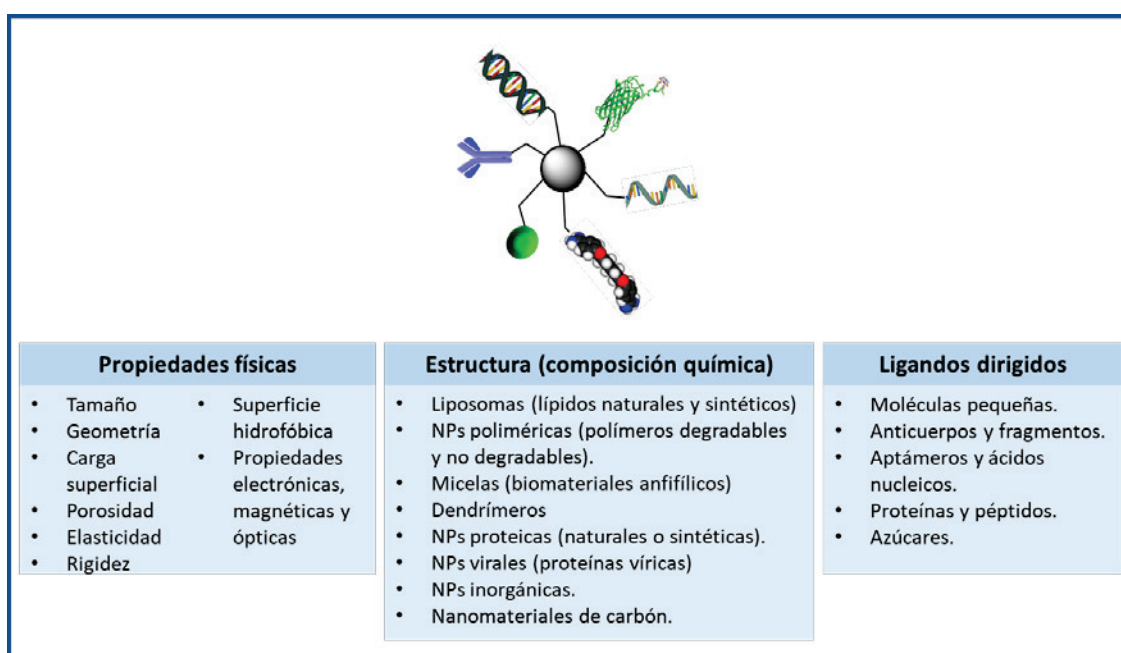


Figura 1.1. Propiedades de las nanopartículas. Las nanopartículas pueden sintetizarse con diferentes materiales y tener varias propiedades físicoquímicas (por ejemplo, tamaño, características superficiales y elasticidad, entre otras) y pueden ser modificadas con diferentes ligandos orientadores.

En tercer lugar, se puede diseñar una matriz de nanodispositivos para la liberación controlada de fármacos en lugares específicos para conseguir una acción farmacológica óptima y sostenida^{32,33,34}. Centrándonos en cáncer, mediante la coliberación de ingredientes farmacéuticos activos múltiples, las nanopartículas también han facilitado

el uso de terapias anticancerígenas sinérgicas, evitando algunos mecanismos de resistencia a fármacos, como por ejemplo el uso de nanopartículas poliméricas para la coliberación de anti-miR-10b y anti-miR 21 en la terapia *in vivo* del cáncer de mama triple negativo³⁵. En cuarto lugar, encontramos una de las ventajas únicas de la nanomedicina, la multimodalidad, es decir, realizar varias funciones diagnósticas y / o terapéuticas al mismo tiempo^{36,37,38,39}. Así, la nanomedicina teranóstica ofrece una estrategia prometedora para monitorear la farmacodinámica, así como la acumulación de terapéuticos y la progresión de la enfermedad, ofreciendo información importante sobre la heterogeneidad dentro de los tumores y entre pacientes potenciales para un tratamiento personalizado^{40,41}.

En quinto lugar, hay que destacar que la nanomedicina está ganando impulso en el área de la inmunoterapia del cáncer ya que las nanopartículas se han vuelto cada vez más atractivas como transportadores de antígenos (Ag) potentes o como coadyuvantes para el desarrollo de vacunas sintéticas, con una mejora de la penetración tisular y/o acceso a los vasos linfáticos, internalización preferente por las células presentadoras de Ag, liberación sostenida de Ag o adyuvantes y escape de fagosomas mediada por nanopartículas antigénicas^{42,43}, y el desarrollo de vacunas frente al cáncer^{44,45}. Dentro de este mismo campo, las nanopartículas pueden presentar un gran potencial para abordar las deficiencias asociadas con los productos biológicos, incluyendo los anticuerpos monoclonales (mAc) que se utilizan para la inmunoterapia del cáncer. Por ejemplo, la liberación de fármacos biológicos pueden inducir la formación de anticuerpos antifármacos (ADAs, del inglés "*antidrug antibodies*") que pueden afectar adversamente su seguridad y eficacia⁴⁶. De hecho, la ingeniería de nanopartículas con rapamicina mostró que servían para eliminar la formación de ADAs relacionados con los productos biológicos en ratones y primates no humanos⁴⁷, y en ensayos clínicos humanos en curso⁴⁸.

Por último, las nanopartículas no deben mostrar toxicidad una vez inoculadas en el cuerpo y tras realizar la función para la que fueron diseñadas deben excretarse de manera segura del cuerpo. Todas estas ventajas se enumeran en la **Figura 1.2**.



Figura 1.2. Ventajas de las nanopartículas en nanomedicina

1.1.2. Tipos principales de nanopartículas

Entre los nanosistemas que se encuentran actualmente en el mercado o en desarrollo preclínico encontramos predominantemente liposomas, conjugados de polímeros-fármaco y nanopartículas poliméricas.

1.1.2.1. Liposomas

Los liposomas son vesículas esféricas no tóxicas, biodegradables y no inmunogénicas, consistentes en una membrana con dos capas de moléculas lipídicas anfipáticas naturales o sintéticas⁴⁹, con un tamaño comprendido entre 90-150 nm⁵⁰. En la pasada década se prestó especial interés a los liposomas ya que eran capaces de encapsular fármacos lipofílicos entre su membrana y fármacos hidrofílicos en su núcleo acuoso, protegiendo el fármaco encapsulado de la degradación enzimática o ambiental⁵¹. Además, los liposomas pueden liberar dos o más agentes terapéuticos simultáneamente y su membrana puede estar recubierta con ligandos específicos para llegar a células diana, tejidos u órganos de interés^{52,53}. Un ejemplo de liposomas es el cisplatino liposomal (Lipoplatino), un liposoma PEGilado que se encuentra en fase III para el cáncer de pulmón no microcítico, desarrollado para reducir la toxicidad sistémica del cisplatino⁵⁴.

1.1.2.2. Conjugados fármaco-polímeros

Los conjugados de polímero y fármaco son las otras nanoplataformas ampliamente estudiadas en la práctica clínica⁵. La conjugación de fármacos de molécula pequeña a nanovehículos poliméricos no solo prolonga el tiempo de circulación *in vivo* de varios minutos a varias horas, sino que también reduce la captación celular por la ruta endocítica. Los conjugados polímero-fármaco que se han probado clínicamente suelen tener una estructura triple: el polímero, un enlazador y la carga biológica⁵⁵. La química moderna de polímeros está produciendo estructuras cada vez más intrincadas, con un capacidad adicional para la selección específica de células, la regulación del tráfico intracelular y la localización nuclear, y para permitir la incorporación de combinaciones de fármacos^{56,57}. Los copolímeros de HPMA que contienen el péptido cíclico RGD que se dirigen a las integrinas $\alpha v \beta_3$ expresadas en vasos sanguíneos tumorales angiogénicos y células tumorales junto con un derivado del agente anticancerígeno y antiangiogénico geldanamicina unidos a la cadena principal del polímero a través de un enlazador degradable⁵⁸ constituyen un ejemplo de este tipo de conjugados.

1.1.2.3. Nanopartículas poliméricas.

Las nanopartículas poliméricas ofrecen una gran flexibilidad en la adaptación de su composición química, tamaño, biodegradabilidad, morfología y funcionalidad superficial⁵⁹. Como resultado, sirven como excelentes transportadores de fármacos para una amplia gama de aplicaciones en diagnóstico y terapia. En general, las nanopartículas poliméricas se pueden clasificar en nanopartículas propiamente dichas, micelas, nanogeles, nanocápsulas y polimersomas (Figura 1.3).

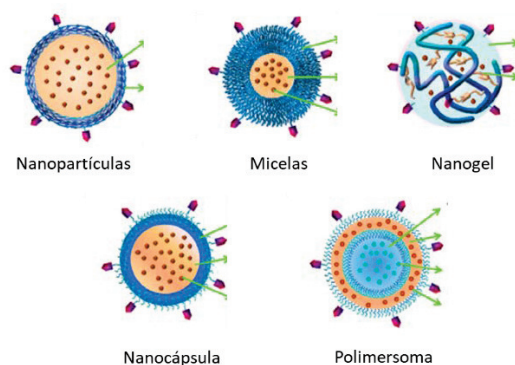


Figura 1.3. Tipos de nanopartículas poliméricas.

Las **nanopartículas poliméricas**, definidas previamente, pueden sintetizarse con polímeros naturales o sintéticos inocuos como poliésteres, poliaminoésteres, polianhídridos, poliamidas y quitosano^{60,61}. Por lo tanto, se caracterizan por su seguridad y por estar aprobados por las autoridades de diversas especialidades médicas y usos farmacéuticos. Generalmente, los polímeros biodegradables se caracterizan por tener un heteroátomo (-C-O-, -C-N-, C-S-, etc.), que facilita la hidrólisis y la escisión del enlace⁶². Estas nanopartículas pueden degradarse mediante hidrólisis *in vitro* e *in vivo* en condiciones específicas, proporcionando así el control en la liberación del fármaco y facilitando la excreción del cuerpo. El ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) es un poliéster aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés "*Food Drug Administration*") cuyas nanopartículas y micropartículas se han utilizado con éxito en la nanoformulación de varios medicamentos. Sin embargo, debido a su lipofilia, las nanopartículas de PLGA deben recubrirse con un polímero hidrofílico biocompatible, como el polietilenglicol (PEG), para un uso óptimo *in vivo*⁶³. El quitosano, un polisacárido natural, extraído principalmente de la cáscara de cangrejo, es otro material biodegradable; es hidrófilo y catiónico, y puede unirse electrostáticamente a material genético aniónico, como ADN y siARN, para aplicaciones en terapia génica^{64,65}.

Las **micelas poliméricas** son normalmente autoensamblados de bloques anfifílicos. Tienen una estructura característica formada por núcleo-capa y un diámetro medio que va desde 10 a 100 nm. Las micelas pueden mejorar significativamente la solubilidad de fármacos lipofílicos en agua y su biodisponibilidad⁶⁶ y han aparecido recientemente como uno de los sistemas más ideales para el suministro de medicamentos escasamente solubles en agua como paclitaxel (PTX), docetaxel (DTX) y doxorubicina (DOX)⁶⁷. Sin embargo, un problema práctico que presentan las micelas poliméricas es que tienden a disociarse y liberar sus cargas útiles tras su dilución e interactúan con las proteínas y las células presentes en sangre, que a menudo conducen a una liberación prematura del fármaco tras la inyección intravenosa⁶⁸.

Los **nanogeles** son redes de polímeros hidrofílicos de tamaño nanométrico (20- 250 nm) que están entrecruzados física o químicamente⁶⁹. Poseen varias propiedades interesantes como buena biocompatibilidad, excelente estabilidad (en particular,

nanogeles entrecruzados químicamente) y respuestas rápidas a factores ambientales como pueden ser la fuerza iónica, el pH y la temperatura⁷⁰. Para lograr una buena carga de fármacos e inhibir la liberación prematura de los mismos, se han introducido grupos funcionales que generan interacciones físicas particulares con los fármacos, o bien, se han conjugado químicamente los fármacos a los nanogeles. Además, pueden modificarse químicamente con diversos ligandos para la liberación específica de fármacos⁷¹. Los nanogeles son particularmente atractivos para la liberación de fármacos constituidos por nucleótidos, como el ADN plasmídico, que se utiliza para la terapia génica, ya que puede mejorar la internalización celular y prolongar el tiempo de circulación. Los nanogeles de ADN pueden integrar múltiples elementos modulares, incluidos los oligonucleótidos para inhibir la proliferación celular, las ADNzimas para inhibir la migración celular y los aptámeros para dirigirse a células cancerígenas específicas. También son particularmente útiles para dirigir fármacos a tumores gracias al efecto EPR y se descubrió que los nanogeles catiónicos (PEO y poli (etilenimina)) aumentan el transporte de oligonucleótidos a través del epitelio gastrointestinal, e incluso, de la barrera hematoencefálica.⁷²

Las **nanocápsulas** son sistemas nanovesiculares que contienen una membrana polimérica no tóxica que encapsula un líquido interno (acuoso u oleoso) en su núcleo⁷³. Se pueden preparar por diferentes técnicas como el ensamblaje capa por capa (LBL), emulsión y difusión, nanoprecipitación, revestimiento del polímero y evaporación del disolvente. El núcleo líquido se puede llenar con una gran cantidad de fármacos, mientras que la membrana puede ser diseñada para lograr una liberación dirigida y controlada de fármacos. El tamaño promedio con el que se obtienen es de 100 nm-500 nm⁷⁴. Como, por ejemplo, la nanocápsula formada por un núcleo de PTX rodeado por una membrana de PDDA (poli (dimetildialilamida cloruro de amonio) y PSS (sulfonato sódico de poliestireno)⁷⁵.

Los **polimersomas** son vesículas poliméricas que contienen un núcleo de agua y se preparan por autoensamblaje de bloques anfifílicos y copolímeros en condiciones acuosas. El tamaño de los polimersomas puede abarcar desde decenas de nanómetros hasta decenas de micrómetros⁷⁶. Es interesante observar que los polimersomas no solo pueden ser utilizados para liberar fármacos hidrofóbicos sino también fármacos

hidrofílicos como péptidos, proteínas y siRNA. La membrana de los polimersomas, debido a sus mayor peso molecular es, en general, más gruesa, fuerte y dura que la de los liposomas⁷⁷. Como ejemplo, los polímeros de poli (2-metacrililoiloxietil-fosforilcolina) -polio(2-(diisopropilamino) metacrilato de etilo) marcados fluorescentemente se han usado para estudios *in vivo*, porque se acumulan preferentemente en el tejido tumoral, lo que puede mejorar la terapia contra el cáncer basada en polimersomas⁷⁸.

1.2. Liberación selectiva de fármacos mediante nanopartículas en la terapia contra el cáncer

El cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbimortalidad del mundo, con aproximadamente 14 millones de casos nuevos en el año 2012, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos probablemente aumente en un 70 % en las próximas décadas. Teniendo en cuenta las previsiones demográficas proporcionadas por las Naciones Unidas, se calcula que en 2020 se diagnosticarán 246.713 casos nuevos de cáncer en España, 97.715 en mujeres y 148.998 en varones⁷⁹. Aunque la mortalidad global del cáncer muestra una tendencia a la baja por primera vez en cinco décadas, todavía se mantiene una tasa alta del 20.2%. Teniendo en cuenta las estimaciones poblacionales de las Naciones Unidas, se calcula que 117.859 personas fallecerán por cáncer en España en 2020 (73.424 varones y 44.435 mujeres)⁷⁹. Una de las principales razones de esta alta tasa de mortalidad se encuentra en nuestra incapacidad para administrar agentes terapéuticos solo en el tumor sin inducir efectos adversos graves sobre los tejidos y órganos sanos⁸⁰. En las últimas décadas, se han logrado avances notables en nuestra comprensión de cómo se origina y desarrolla el cáncer, lo que, a su vez, ha conducido al desarrollo de mejores métodos para el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad⁸¹. Junto con la intervención quirúrgica, los tratamientos actuales del cáncer dependen en gran medida de la radiación y la quimioterapia, procesos en los que también se matan células "normales" causando toxicidad en el paciente. Por lo tanto, existe una clara necesidad de desarrollar terapias eficientes, las llamadas " *magic bullets*", que puedan superar las barreras biológicas, distinguir entre células malignas y benignas, dirigirse selectivamente a los tejidos cancerosos, y respondan inteligentemente al

microambiente tumoral heterogéneo y complejo para la liberación bajo demanda de agentes terapéuticos en un rango de dosificación óptimo⁸².

Los aspectos más prometedores de utilizar nanopartículas en diagnóstico, terapia y teragnosis son su potencial para localizar (o ser dirigidas) de manera específica el sitio de la enfermedad y eliminar los efectos secundarios adversos. El tamaño nanométrico de estos materiales impide su eliminación a partir de los riñones, extendiéndose así a través de la circulación sanguínea dependiendo de las características funcionales de su superficie. Además, cuando consideramos nuevos tratamientos para el cáncer, hay que tener en cuenta que en numerosos tipos de tumores los vasos sanguíneos presentan irregularidades en su superficie, dilataciones, orificios y fenestraciones en las células endoteliales. La anatomía alterada de los vasos tumorales y el pobre drenaje linfático permite que las nanopartículas pueden extravasarse fácilmente desde la circulación sanguínea hacia los tejidos tumorales quedando retenidas en el tumor. Este fenómeno de acumulación selectiva de nanopartículas cerca de los tejidos tumorales se denomina **efecto de permeabilidad mejorada y de retención (EPR, conocido también como orientación pasiva hacia el tumor)**⁸³.

No obstante, la decoración de la superficie de las nanopartículas por un ligando específico del tumor como pueden ser anticuerpos, péptidos, polisacáridos, ácido fólico, por poner unos ejemplos, puede aumentar la retención y acumulación de las nanopartículas en la vasculatura tumoral originando una internalización eficiente y selectiva en las células tumorales en cuestión, proceso conocido como **“orientación activa hacia el tumor”**. Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que las nanopartículas dirigidas de forma activa mediante un ligando, con distintas formulaciones de fármacos, presentan un aumento de las actuaciones terapéuticas, aunque en diferentes grados, en comparación con la forma pasiva. Cabe destacar que, además de la orientación hacia las células tumorales, la neovasculatura tumoral representa otra diana interesante para la quimioterapia del cáncer ya que la angiogénesis tumoral es conocida por su gran importancia en el crecimiento y metástasis de los tumores sólidos. La obliteración de la neovasculatura tumoral dará lugar a la contracción del tumor sólido establecido mediante el bloqueo del suministro de sangre (inanición selectiva de cáncer). En los últimos años, diferentes tipos de ligandos dirigidos como RGD cíclico (cRGD), ácido

fólico, ácido hialurónico (HA) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) se han empleado para la liberación de fármacos dirigidos de forma activa hacia el tumor. Además del tipo de ligando, el tamaño, forma y estabilidad de la nanopartícula, así como la densidad y afinidad por el ligando, juegan también un papel importante en la quimioterapia dirigida contra el cáncer⁸⁴.

En el desarrollo de nanopartículas dirigidas transportadoras de fármacos también es importante comprender las interacciones que se producen entre las nanopartículas y los sistemas biológicos que da lugar a la formación de la **corona proteica**. La estructura y composición de la corona proteica depende de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas (tamaño, forma, composición, grupos funcionales de la superficie y las cargas de superficie), la naturaleza del entorno fisiológico (cómo, por ejemplo, sangre, líquido intersticial y citoplasma celular) y la duración de la exposición. La corona proteica altera el tamaño y la composición interfacial de la nanopartícula, proporcionándole una nueva identidad biológica. La identidad biológica determina la respuesta fisiológica incluyendo aglomeración, internalización celular, vida media en la circulación, señalización, cinética, transporte, acumulación y toxicidad. La corona proteica es compleja y no existe una “corona proteica universal” para todas las nanopartículas, es decir, la composición de la corona es única para cada nanomaterial y depende de muchos factores⁸⁵.

1.2.1. Orientación pasiva: efecto EPR

La observación de que ciertas macromoléculas se acumulan preferentemente en los tumores se realizó hace más de 30 años. Se habló por primera vez de la acumulación de las macromoléculas terapéuticas en el tumor cuando se utilizó un conjugado polimérico de 16 kDa llamado poli(estireno-co-ácido maleico)-NeoCarzinoStatin (SMANCS), que se unía de forma no covalente a la albúmina en circulación alcanzando un peso molecular de 80 kDa^{86,87}. La distribución de SMANCS alrededor del tumor se observó en el desarrollo preclínico temprano y llevó a Matsumura y Maeda a investigar más el fenómeno. Usando el conjugado polimérico junto con albúmina marcada y otras proteínas, mostraron que las proteínas mayores de 30 kDa (SMANCS, albúminas murina y bovina (67 y 69 kDa, respectivamente) y la IgG (160 kDa)) se distribuían preferentemente en el intersticio tumoral y permanecían allí durante prolongados

períodos de tiempo⁸⁸. Desde entonces, el efecto EPR se ha convertido en la guía de muchos científicos para la liberación de fármacos anticancerígenos en los tumores, ya sea utilizando conjugados poliméricos, liposomas o nanopartículas.

Cuando un tumor sólido alcanza un tamaño determinado, la vasculatura normal presente en su alrededor no es suficiente para proporcionar todo el suministro de oxígeno necesario para su proliferación. A medida que las células comienzan a morir, segregan factores de crecimiento que desencadenan la aparición de nuevos vasos capilares circundantes⁸⁹. Este proceso, conocido como angiogénesis, promueve el desarrollo rápido de nuevos vasos sanguíneos irregulares que presentan un epitelio discontinuo y carecen de la membrana basal normal de las estructuras vasculares^{90,91}. Las fenestraciones resultantes en los capilares pueden alcanzar tamaños que varían de 200 nm a 2000 nm, dependiendo sobre todo del tipo de tumor, su medio ambiente y su localización⁹². Cuando los componentes sanguíneos alcanzan el lecho vascular anormal y discontinuo, las fenestraciones ofrecen poca resistencia a la extravasación hacia el intersticio tumoral, representando la parte de **permeabilización mejorada** del efecto EPR (**Figura 1.4**). Se ha observado este efecto con una amplia gama de agentes macromoleculares como proteínas, incluyendo la inmunoglobulina G (IgG), conjugados fármaco-polímero, micelas, liposomas, nanopartículas poliméricas y muchos otros tipos de nanopartículas⁹³. A menudo se sugiere que el tamaño de las fenestraciones es el factor más determinante para la extravasación de las partículas, si extrapolando estos valores de las macromoléculas a las nanopartículas, se ha determinado que el tamaño del límite superior para las nanopartículas que participan en el efecto EPR es de aproximadamente 500 nm⁹⁴ aunque estudios en modelos animales han demostrado tamaños comprendidos entre 500 nm - 1 μm para que las moléculas o nanopartículas se extravasasen al tumor⁹⁵.

En los tejidos normales, el líquido extracelular se drena constantemente a los vasos linfáticos a una velocidad media de flujo alrededor de 0,1-2 $\mu\text{m/s}$ ⁹⁶. Este flujo permite el drenaje continuo y la renovación del líquido intersticial y el reciclaje de solutos y moléculas extravasados de nuevo a la circulación. En los tumores, la función linfática es defectuosa, dando como resultado una absorción mínima del líquido intersticial⁹⁷. Como resultado, las moléculas no pueden confiar en las fuerzas de convección para volver a la

circulación. Mientras que las moléculas más pequeñas (< 10 nm) pueden difundir de nuevo a la circulación sanguínea y ser reabsorbidas^{98,99,100}, la difusión de macromoléculas o de nanopartículas se ve obstaculizada ya que sus radios hidrodinámicos son mayores. Por lo tanto, las nanopartículas que han alcanzado el espacio perivascular no se eliminan eficientemente y se acumulan en el intersticio tumoral. Este aspecto representa el componente de **retención mejorada** del efecto EPR, siendo más efectivo para materiales coloidales mayores de 40 kDa y ocurre incluso sin la presencia de ligandos orientadores. El tamaño de las fenestraciones varía entre las células endoteliales dependiendo del tipo de tumor, aunque se ha observado la permeabilidad y extravasación de nanopartículas de hasta 500 nm a través de los espacios endoteliales (en modelos de xenoinjerto de ratón de cánceres humanos). Es importante destacar que ahora se sabe que el drenaje linfático no es homogéneo a través de la masa cancerosa. Los vasos en la masa del tumor experimentan un mayor estrés mecánico y la pérdida funcional en las regiones intratumorales es más importante que en los límites de dichas regiones¹⁰¹. De hecho, se cree que la actividad linfática residual y la linfangiogénesis son, en parte, responsables del progreso y la difusión de las metástasis¹⁰².

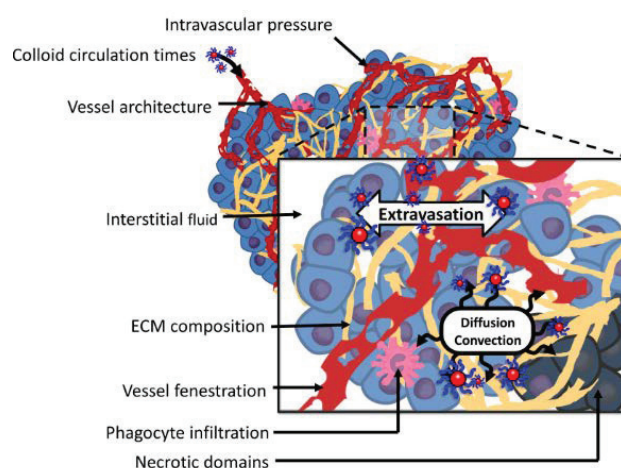


Figura 1.4. El efecto EPR resultante de dos fenómenos distintos: la extravasación de los coloides desde los vasos sanguíneos y su movimiento subsecuente en la matriz extracelular del tumor (ECM) mediante difusión y convección (Bertrand y col., *Advanced Drug Delivery Reviews* 66, 2014)

Además de la arquitectura anormal, los vasos sanguíneos del tumor también presentan receptores alterados para la angiotensina II que controla la constricción del vaso. Los tumores sólidos a menudo producen grandes concentraciones de factores de

permeabilidad vascular como resultado del crecimiento rápido de las células tumorales que requieren un mayor suministro de nutrientes y oxígeno. Hay una serie de mediadores vasculares que facilitan el EPR como son bradiquinina, óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO⁻), prostaglandinas, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, factor de permeabilidad endotelial vascular (VEGF) y muchas otras citoquinas. Todos estos factores son en verdad mediadores de procesos inflamatorios y, como tales no es sorprendente que el EPR también puede manifestarse en otros escenarios inflamatorios como la artritis, la infección y las placas ateroscleróticas avanzadas⁹³.

1.2.2. Orientación activa

La orientación activa, también llamada orientación mediada por ligandos, implica utilizar ligandos de afinidad en la superficie de las nanopartículas para la retención específica y la internalización por las células diana de la enfermedad. Para ello, se seleccionan ligandos para unirse a moléculas superficiales o receptores sobreexpresados en órganos enfermos, tejidos, células o dominios subcelulares^{4,93,103,41}. El material orientado activamente debe estar en la proximidad de su objetivo para beneficiarse de esta creciente afinidad. Por lo tanto, el enfoque está dirigido a aumentar las interacciones entre las nanopartículas y las células y mejorar la internalización de los fármacos sin alterar la biodistribución general^{104,4,105}.

El diseño de nanopartículas dirigidas activamente transportando fármacos es complejo porque la arquitectura de las nanopartículas, la conjugación química de los ligandos y los tipos de ligando disponibles contribuyen a la eficacia del sistema. Otros factores como la vía de administración o la unión no específica de proteínas durante el viaje de la nanopartícula a través del torrente sanguíneo han demostrado que afectan a la capacidad de orientación de las nanopartículas^{106,107}. Propiedades fisicoquímicas como la densidad del ligando¹⁰⁸, el tamaño de las nanopartículas¹⁰⁹ o la elección del ligando de orientación¹¹⁰ también podría afectar la eficacia de la estrategia de orientación activa *in vitro* y, lo más importante, *in vivo*.

1.2.2.1. Fundamento de la orientación activa

El principal mecanismo detrás de la orientación activa es el reconocimiento del ligando por su sustrato diana. Los ligandos representativos incluyen anticuerpos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, azúcares y moléculas pequeñas como las vitaminas¹¹¹. Las moléculas diana pueden ser proteínas, azúcares o lípidos presentes en los tejidos enfermos o en la superficie de las células^{112,113}. Se potencian las interacciones entre las nanopartículas funcionalizadas con ligandos y su antígeno diana mediante la naturaleza multivalente de la nanopartícula: múltiples copias del ligando aumentan la apetencia de la nanopartícula por su objetivo¹¹⁴. La especificidad de la orientación y la capacidad de liberación son dos aspectos importantes para evaluar la eficiencia de un sistema de orientación activa. La **especificidad de orientación** está determinada por la biodistribución de las nanopartículas funcionalizadas con ligandos y por como el ligando se conjuga a la nanopartícula y este sistema interactúa con moléculas y células que no son su objetivo; por lo tanto, se define por el ligando y las propiedades de las nanopartículas. La **capacidad de liberación** está directamente relacionada con el material de la nanopartícula y su estructura^{93,115}. Actualmente, las nanopartículas orientadas activamente se contemplan como una estrategia complementaria prometedora al efecto EPR para aumentar aún más la eficiencia de las “*nanomedicinas*” del cáncer.

Las nanopartículas activamente dirigidas requieren estar en la proximidad de su antígeno diana para reconocer e interactuar con él (<0.5 nm)¹¹⁶. Esa característica intrínseca se considera un desafío importante para el desarrollo de las nanopartículas orientadas activamente¹¹⁷. Aquí de nuevo, la eliminación sistémica de las nanopartículas está directamente relacionado con las cantidades disponibles en el torrente sanguíneo que llega al tumor. Porque el flujo sanguíneo del tumor es bajo en comparación con los observados en los órganos del sistema fagocítico mononuclear (SFM)¹¹⁸, el aumento de la afinidad de las nanopartículas por los antígenos tumorales diana no siempre pueden compensar los procesos de eliminación sistémica. Por lo tanto, las nanopartículas activamente dirigidas necesitan ser diseñadas para tiempos de circulación sanguínea largos. Del mismo modo, debido a que los objetivos moleculares suelen estar situados en el espacio extravascular del tumor, las nanopartículas se basan en el efecto EPR para

alcanzar sus objetivos^{119,120}. Por lo tanto, la neovasculatura tumoral representa el otro objetivo interesante para la orientación activa ya que la angiogénesis tumoral juega un papel de gran importancia en el crecimiento y metástasis de tumores sólidos. (**Figura 1.5**). En conjunto, estos factores explican por qué las estrategias de orientación activa no pueden cambiar radicalmente los perfiles de biodistribución de los nanomateriales^{121,122,123} y por qué los tiempos de circulación sanguínea de las nanopartículas decoradas con ligandos necesitan estar optimizados para conseguir una orientación óptima^{124,125,126}.

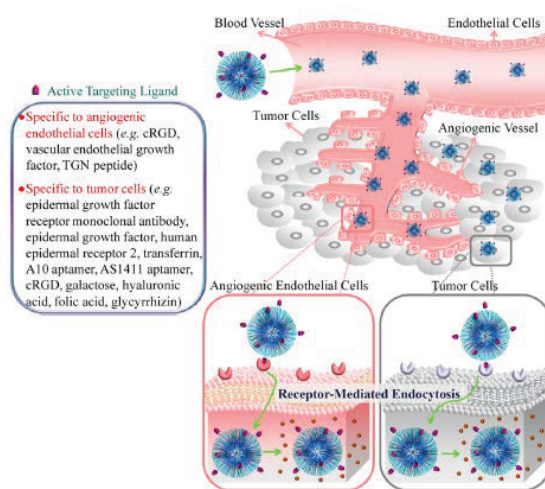


Figura 1.5. Estrategias de orientación activa hacia: a) las células tumorales, b) las células endoteliales angiogénicas (Zhong y col., Biomacromolecules, 2014).

1.2.2.2. Influencia de la arquitectura de las nanopartículas orientadas activamente

La conjugación de ligandos en la superficie de las nanopartículas cambia las propiedades de las moléculas dirigidas y del nanomaterial^{125,103}. Al mismo tiempo que los ligandos se unen a la nanopartícula pierden la libertad rotacional y traslacional que presentaban para liberar moléculas, pero el conjugado que se forma presenta una mayor capacidad de orientación debido a una mayor presencia de ligandos^{127,128,129}. De forma similar, el tamaño, la geometría, las propiedades de superficie (carga e hidrofobicidad) y la composición de las nanopartículas también se pueden alterar. En algunos casos, las nanopartículas han demostrado beneficios que van más allá de la simple liberación de fármacos. Por ejemplo, una mayor resistencia a la degradación por nucleasas por parte de las cadenas de ácidos nucleicos inmovilizadas en la superficie de los nanomateriales^{130,131}. Para comprender completamente las propiedades de las

nanopartículas dirigidas activamente, es fundamental determinar cómo las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas afectan las interacciones con sus dianas (**Figura 1.6**).

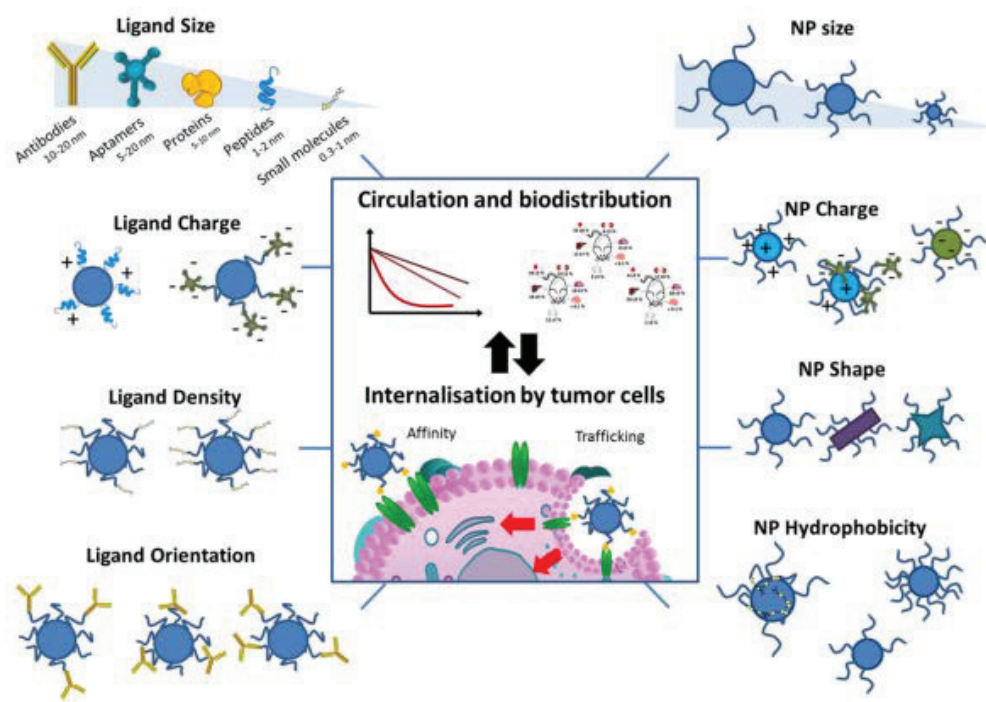


Figura 1.6. Las propiedades físicoquímicas del ligando y de las nanopartículas afectan los perfiles de circulación sanguínea, su biodistribución y su habilidad para ser internalizadas por las células cancerígenas. (N. Bertrand y col., *Advanced Drug Delivery Reviews* 66, 2014)

A. Densidad de los ligandos. Debido a que el aumento del número de anticuerpos por nanopartícula permite efectos cooperativos, la densidad de las moléculas en la superficie de las nanopartículas afectan su afinidad por el sustrato. Termodinámicamente, la unión de un ligando a su sustrato facilita la unión posterior de sus ligandos vecinos^{129,132}. Biológicamente, las múltiples interacciones de la nanopartícula con la membrana celular fuerza el agrupamiento y la concentración local de receptores. Esto desencadena la envoltura de la membrana y conduce a la internalización¹³³. En conjunto, estas incidencias impiden el desprendimiento de la nanopartícula de la superficie celular y da como resultado una mayor afinidad. Esto permite el uso de múltiples ligandos de afinidad relativamente baja para unirse a su diana eficientemente y con gran apetencia¹³⁴. *In vitro*, esta densidad creciente del ligando generalmente da como resultado una internalización celular mejorada^{108,135}. Sin embargo, este aumento en la afinidad no siempre es lineal. En algunos casos, el efecto

cooperativo del ligando puede saturar y aumentar aún más la densidad del ligando causando efectos nocivos sobre la unión celular^{135,136}. Este efecto puede explicarse por una orientación incorrecta del ligando, impedimentos estéricos ocasionados por las moléculas vecinas o comportamientos competitivos con otras moléculas para la unión con el receptor.

- B. *Tamaño y forma de la nanopartícula.*** El tamaño y la forma del nanomaterial deben tenerse en cuenta al principio del diseño de las nanopartículas dirigidas ya que afecta a la forma en que las células del cuerpo las "ven" y, por lo tanto, determinan su distribución, toxicidad y capacidad de selección¹³⁷. Para partículas esféricas, los tamaños más pequeños representan curvaturas más altas que pueden ser problemáticas para la funcionalización del ligando tras la síntesis junto con el aumento de la toxicidad^{138,139}. Además del efecto sobre las propiedades de circulación y la acumulación en los tumores antes mencionado^{140,141}, la forma de la nanopartícula parece influir en la cinética de la internalización celular y las vías de internalización mediante la modulación de las interacciones entre el nanomaterial y la superficie celular^{138,142}.
- C. *Superficie y carga del ligando.*** Desde una perspectiva sintética, la carga de la nanopartícula no funcionalizada y la del ligando puede afectar al rendimiento de la conjugación y la visualización espacial del ligando en la superficie¹⁴³. Fuerzas repulsivas o atractivas entre la superficie de las nanopartículas y el ligando puede interferir en la conjugación^{144,145} o afectar a la estructura y la conformación del ligando final. Un espaciador químico con una longitud razonable, como los basados en unidades PEG, puede ayudar a reducir este efecto, pero puede complicar simultáneamente la síntesis y aumentar el tamaño de partícula final¹³⁵. Además, la carga superficial final afectará la eficacia de las nanopartículas dirigidas. Como la mayoría de los ligandos son moléculas cargadas, la carga superficial de la nanopartícula está determinada por las combinaciones de densidades de ligandos, materiales y estrategias de formulación de las nanopartículas. Aunque algunos trabajos recientes se han realizado para abordar cómo la densidad de carga afecta las interacciones de las nanopartículas dirigidas activamente con células¹⁴⁶ y cómo la optimización de la densidad del ligando y la

carga de la nanopartícula puede afectar a la captación celular¹⁴⁷, no está claro qué parámetros ofrecen la mejor orientación hacia el tumor *in vivo*.

D. Superficie hidrofóbica. Además de la carga superficial, la hidrofobicidad también puede afectar la arquitectura de la presentación del ligando¹⁰⁸. Esto puede tener serios efectos ya que la mayoría de las nanopartículas poliméricas tienen núcleos hidrófobos (por ejemplo, poliésteres, poliamidas)¹⁴⁸. Valencia y col., mostraron que durante el autoensamblaje de las partículas hidrófobas poliméricas, el ácido fólico, un modelo de ligando hidrofóbico, podría quedar atrapado en el núcleo de la partícula sin estar correctamente presentado en la superficie¹⁴⁹. Esto dio como resultado un aumento no lineal de la afinidad de la nanopartícula con mayor proporción de ligandos en la formulación. Este efecto no se observó con ligandos más hidrófilos, como el péptido RGD, este estudio puso de relieve la necesidad de una caracterización fisicoquímica completa de nanopartículas después de la síntesis. Además, la hidrofobicidad superficial final de las nanopartículas también puede afectar las interacciones inespecíficas con las células.

1.2.3. Interacciones de las nanopartículas con las proteínas. Formación de la corona proteica.

Cuando una nanopartícula entra en un ambiente biológico (por ejemplo, sangre, líquido intersticial o matriz extracelular (ECM)), su superficie se cubre rápidamente por varias biomoléculas, normalmente proteínas, lo que da lugar a la formación de la “**corona proteica**”^{150,151,85,107}. La adsorción de las proteínas altera el tamaño de la nanopartícula, la estabilidad y propiedades de superficie y, lo más importante, proporciona a las nanopartículas una identidad biológica que determina las respuestas fisiológicas, que van desde la captación celular y el tráfico intracelular hasta la farmacodinámica, biodistribución y toxicidad. Por ejemplo, la unión de las opsoninas puede desencadenar el reconocimiento y eliminación por el SFM⁸⁵. Por el contrario, también se ha sugerido que una corona rica en proteínas disopsoninas (por ejemplo, apolipoproteínas y albúmina), que inhiben la internalización fagocítica, podría contribuir al efecto mimético de las nanopartículas^{152,153,154}. Aunque las nanopartículas funcionalizadas con ligandos podrían perder su capacidad de orientación al formarse la corona proteica en su

superficie¹⁵⁵, como mostraron Salvati y col., usando nanopartículas de sílice funcionalizadas con transferrina que perdían su selectividad por las células que expresaban el receptor de transferrina cuando se incubaban con plasma; la decoración de las mismas con algunas proteínas plasmáticas particulares podrían mejorar su orientación hacia órganos específicos. Un ejemplo reciente es el hallazgo de que la apolipoproteína E es esencial para que algunos lipoplexos de siRNA se dirijan *in vivo* a los hepatocitos¹⁵⁶.

Utilizando varias técnicas analíticas (la movilidad electroforética en función del pH, la estabilidad coloidal, adsorción de proteínas mediante calorimetría isoterma de titulación y espectrofotometría de masas), diversos estudios han caracterizado ampliamente la corona proteica (composición, densidad, conformación, grosor, afinidad y dinámica) sobre ciertos nanomateriales como nanopartículas de oro, sílice, poliestireno y liposomas¹⁵⁷. Ahora está claro que las interacciones proteína/NP son altamente dependientes de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, tiempo de exposición, así como la fuente y concentración de las proteínas. Sin embargo, todavía no tenemos una idea clara de cómo las propiedades de las nanopartículas y patrones de adsorción de proteínas se correlacionan con respuestas fisiológicas específicas. Se ha desarrollado un modelo cuantitativo multivariado para predecir la interacción de nanopartículas con las células utilizando la caracterización de alto rendimiento de la corona proteica formada sobre nanopartículas de oro diferentes¹⁵⁸. También se ha prestado especial atención a la composición de la corona proteica formada a partir de sueros de diferentes enfermedades y sus efectos sobre la internalización celular y la toxicidad de las nanopartículas¹⁵⁹. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han centrado en las interacciones proteína/NP *in vitro*, y se ha hecho poco esfuerzo para estudiar la formación de la corona proteica *in vivo* y su correlación con la farmacodinámica, biodistribución y eficacia terapéutica¹⁶⁰. Sin embargo, se ha comprobado que recubriendo nanopartículas con membranas de eritrocitos (RBC), las nanopartículas resultantes (RBC-UCNP) no adsorbían prácticamente proteínas cuando se las exponía al plasma humano. Además, los parámetros sanguíneos y el análisis histológico sugirieron que no se indujo toxicidad sistémica significativa mediante la inyección de estas nanopartículas biomiméticas¹⁶¹.

1.3. Traslación de las nanopartículas poliméricas a la clínica

La nanotecnología ha realizado importantes contribuciones a la nanomedicina. De hecho, como hemos comentado anteriormente, varios estudios *in vivo* han demostrado que las nanopartículas poliméricas son capaces de circular durante un tiempo prolongado en el torrente sanguíneo y tienden a acumularse preferentemente en el sitio del tumor a través del efecto EPR. Aprovechando este efecto, la industria farmacéutica ha desarrollado una serie de “*nanomedicinas*” hechas con polímeros como Genexol-PM^{93,162}, NK 105^{163,164}, NK 911¹⁶⁵ y NC 6004¹⁶⁶ que se encuentran en clínica o en diferentes fases de ensayos clínicos (**Tabla 1**). La modalidad de los tratamientos pasivos dirigidos al tumor ha mostrado claras ventajas al mejorar la actitud del paciente, aumentar la tolerancia a los fármacos y disminuir los efectos secundarios en los tratamientos clínicos actuales.⁸⁴


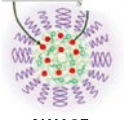
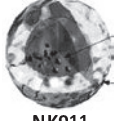

Nombre	Plataforma Nanotecnológica	Principio activo	Modelo tumoral y estatus
 Genexol-PM	Micelas poliméricas constituidas por un copolímero de bajo peso molecular de ácido poli láctico unido al PEG	Paclitaxel	Aprobada en Corea del Sur para el tratamiento de cáncer de mama y cáncer de pulmón no microcítico y se encuentra en fase II para el tratamiento de varios cánceres
 NK105	Micelas poliméricas formadas con PEG como segmento hidrofílico y poliaspartato modificado como el segmento hidrófobo.	Paclitaxel	Fase III en pacientes con cáncer de mama
 NK911	Micela polimérica formada por un polímero de PEG y ácido poliaspártico	Doxorrubicina	Fase I en ensayos clínicos en pacientes con tumores sólidos
 NC-6004	Micelas poliméricas constituidas por un copolímero de polietilenglicol con poli (ácido glutámico)	Cisplatino	Asia fase III para cáncer pancreático, Taiwan fase I para cáncer cuello y cabeza, EEUU y UE fase II para cáncer del tracto biliar y cáncer de pulmón no microcítico y fase I para cabeza y cuello

Tabla 1. Micelas poliméricas que se encuentran en clínica o en ensayos clínicos.

Los liposomas como, por ejemplo, doxorrubicina liposomal (LD), (Doxil® y Myocet™) fueron la primera clase de nanopartículas terapéuticas en recibir aprobación clínica para el tratamiento del cáncer¹⁶⁷, y junto con otras nanopartículas basadas en lípidos, representan una gran proporción de nanoterapéuticos que se encuentran en alguna etapa clínica (**Figura 1.7**). Aunque los fármacos encapsulados en liposomas han mostrado ampliamente una mejora de la farmacodinámica y biodistribución de los

mismos, son pocos los agentes terapéuticos liposomales que se comercializan todavía a pesar de que presentan beneficios de supervivencia global cuando se comparan con el fármaco convencional¹⁶⁸.

Doxil®, el primer nanofármaco aprobado por la FDA (1995), se basa en tres principios no relacionados: (i) tiempo prolongado de circulación del fármaco ya que evita el sistema retículo endotelial debido al uso de nano-liposomas PEGilados; (ii) carga de doxorubicina alta y estable impulsada por un gradiente de sulfato de amonio transmembrana, que también permite la liberación del fármaco en el tumor; y (iii) bicapa lipídica compuesta de fosfatidilcolina y colesterol. Debido al efecto EPR, Doxil® se "dirige de forma pasiva" a los tumores y su doxorubicina se libera y queda disponible para las células tumorales por medios aún desconocidos¹⁶⁷.

En contraposición, **Myocet™** es una doxorubicina liposomal no PEGilada con un tiempo de circulación más corto que Doxil®. El ensayo clínico en fase III realizado reveló que este perfil farmacocinético se asocia con una reducción de la toxicidad gastrointestinal y de la cardiotoxicidad en comparación con las formulaciones estándar, con la mielosupresión como único efecto secundario adverso¹⁶⁹. Se encuentra autorizado por la agencia europea del medicamento (EMA, del inglés "*European Medicines Agency*") desde el año 2000 para neoplasias de mama.

Vyxeos™, también conocido como CPX-351, es la última formulación liposomal aprobada por la FDA en agosto de 2017 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA)¹⁷⁰. Está constituido por la combinación de los fármacos daunorrubicina-citarabina con acción sinérgica sobre la LMA, aumentando la supervivencia global de los pacientes 9,5 meses frente al tratamiento estándar con citarabina y daunorrubicina que proporciona una supervivencia de 5,9 meses¹⁷¹.

También se comercializan nanopartículas de albúmina unidas a paclixatel (nab-paclixatel; **Abraxane®**), aprobadas por la FDA y la EMA para el tratamiento de cáncer de mama metastásico y carcinoma de pulmón no microcítico. Abraxane® está constituido por el fármaco PTX unido a albúmina formando nanopartículas de 130 nm, el PTX es po (PTX) co soluble en agua por lo que esta formulación mejora su solubilidad y disminuye en gran medida la necesidad de utilizar excipientes tóxicos¹⁷². El resultado se traduce en

un fármaco mejor tolerado que puede ser utilizado en dosis más altas y administrado en dosis más continuas, permitiendo así una mayor concentración de fármaco gracias al efecto EPR. Una vez inyectado se disocia rápidamente en sus constituyentes albúmina y paclitaxel^{7,8}.

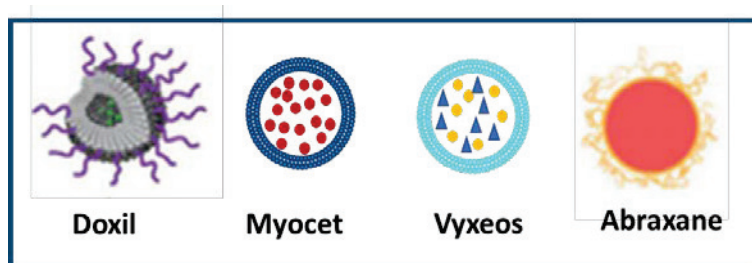


Figura 1.7. Representación esquemática de las nanopartículas poliméricas aprobadas clínicamente.

En cuanto a las nanopartículas poliméricas encontramos las formulaciones CRLX101, BIND014 y AZD2811 Accurin como una nueva clase de agentes nanoterapéuticos frente al cáncer que se encuentran en la fase 2 de sus ensayos clínicos.

- **Nanopartículas CRLX101:** se han estado utilizando para tratar pacientes con tumores sólidos con camptotecina (CPT) encapsulada en las mismas, basándose en la acumulación preferente de las nanopartículas en tumores sólidos en modelos animales. En este estudio, los tumores y biopsias de tejido no neoplásicas adyacentes se obtuvieron a través de la captura endoscópica en pacientes con problemas gástricos, gastroesofágicos, o cáncer de esófago a quienes se les administró las nanopartículas CRLX101. Las muestras de tejido adyacentes a los tumores recogidas antes y después de la dosificación no mostraron evidencia de la presencia de nanopartículas o de su contenido en CPT. Sin embargo, en nueve de los nueve pacientes que fueron evaluados, se detectó CPT en el tejido tumoral recogido 24-48 h después de la administración de CRLX101. En cinco de estos pacientes, se encontraron nanopartículas intactas en el tejido tumoral. Así como, indicaciones de la farmacodinamia del fármaco CPT a partir de los biomarcadores tumorales como la anhidrasa carbónica IX y la topoisomerasa I por inmunohistoquímica mostraron una evidencia clara de la actividad biológica del CPT liberado en los tumores tras el tratamiento¹⁷³.

- **Nanopartículas BIND014:** son unas nanopartículas poliméricas específicas (TNP) que contienen el quimioterápico docetaxel (DTX) para el tratamiento de pacientes con tumores sólidos. DTX-TNP está dirigido a un antígeno específico de membrana de próstata, un antígeno tumoral clínicamente validado expresado en células de cáncer de próstata y en la neovasculatura de la mayoría de los tumores sólidos no prostáticos. DTX-TNP se desarrolló a partir de una combinación de más de 100 formulaciones de TNP que varían con respecto al tamaño de partícula, la densidad del ligando dirigido, las propiedades superficiales de hidrofiliicidad, carga de fármacos y liberación de fármacos. Estudios farmacocinéticos y de distribución tisular en ratas mostraron que las nanopartículas tenían una vida media de circulación sanguínea de aproximadamente 20 horas y una acumulación mínima en el hígado. En ratones portadores de tumores, las DTX-TNP presentaron una buena acumulación a las 12 horas en los tumores y la supresión prolongada del crecimiento tumoral en comparación con la formulación de DTXL únicamente con disolvente (sb-DTX). En ratones, ratas, y primates no humanos con tumores desarrollados, las DTX-TNP presentaron características farmacocinéticas consistentes con una circulación prolongada de las nanopartículas en la zona vascular y la liberación controlada de DTX, con concentraciones plasmáticas totales de DTX remanentes por lo menos 100 veces más altas que las sb-DTX durante más de 24 horas. Finalmente, los datos clínicos iniciales en pacientes con tumores sólidos indicaron que las DTXL-TNP mostraron un perfil farmacológico diferenciado de las sb-DTXL, incluyendo características farmacocinéticas consistentes con datos preclínicos y casos de contracción tumoral en dosis por debajo de la dosis de las sb-DTXL que se usan normalmente clínica^{124,174}.
- **Nanopartículas AZD2811 Accurin:** son nanopartículas que encapsulan el fármaco AZD2811, un inhibidor de la Aurora B quinasa, utilizando un enfoque de emparejamiento de iones. Las accurinas aumentan la biodistribución en el tumor y proporcionan una liberación prolongada de cargas útiles de fármacos encapsulados. Estas nanopartículas contienen ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables como agentes de apareamiento de iones mostrando una liberación continuada de fármaco durante más de 1 semana en

su administración *in vitro* y una reducción farmacodinámica de los niveles de histona H3 fosforilada tumoral *in vivo* hasta 96 horas después de una única administración. Una formulación específica de nanopartículas AZD2811 mostró acumulación y retención en tumores con un impacto mínimo en la patología de la médula ósea, y dio como resultado una menor toxicidad y una mayor eficacia en múltiples modelos tumorales con la mitad de la dosis de AZD1152, un profármaco soluble en agua de AZD2811. Estos estudios demuestran que AZD2811 se puede utilizar con nanopartículas utilizando agentes de emparejamiento iónico para proporcionar una mayor eficacia y tolerancia en modelos preclínicos con una dosificación menor¹⁷⁵.

Aunque recientemente se han presentado resultados clínicos decepcionantes para BIND014 y CRLX101 no son definitivos y subrayan la necesidad de replantearse el desarrollo de estrategias, incluyendo la estratificación de pacientes para identificar los que tienen más probabilidades de responder a los nanoterapéuticos.

1.4. Antecedentes de las nanopartículas de poliestireno en aplicaciones médicas

El equipo NanoChemBio ha diseñado y desarrollado una metodología química para la preparación de un amplio abanico de nanopartículas de poliestireno funcionalizadas, monodispersas y reticuladas (*cross-linked*), disponibles en varios tamaños dependiendo de la aplicación biológica (100 nm- 2 μ m)¹⁷⁶ (Figura 1.8). La síntesis y caracterización de las nanopartículas de poliestireno se detallarán ampliamente en el capítulo 2. Estas partículas son compatibles química y biológicamente y, por lo tanto, se pueden utilizar en diferentes aplicaciones en el campo biomédico.

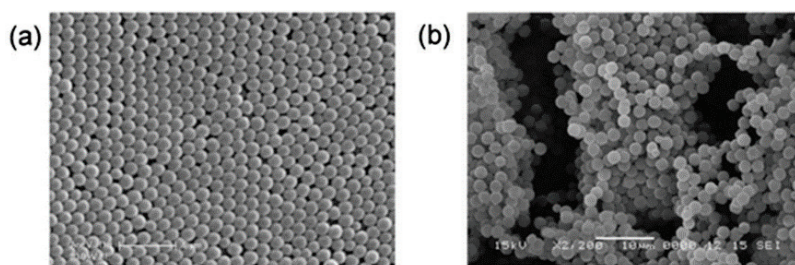


Figura 1.8. Imagen de microscopía electrónica de barrido de nanopartículas. a) 500 nm b) 200 nm

Un aspecto importante de estas nanopartículas es la facilidad y rapidez con las que son capaces de entrar eficientemente en todas las líneas celulares estudiadas hasta la fecha, incluyendo células adherentes, células en suspensión, células madre y células primarias¹⁷⁷. Posiblemente, porque presentan un mecanismo de entrada celular pasivo basado en la penetración directa (**Figura 1.9**), que ha sido previamente verificado mediante técnicas químicas y microscópicas para nanopartículas de poliestireno de varios tamaños (200nm y 500 nm). Los resultados obtenidos mostraron que la internalización de las nanopartículas no era dependiente de ATP o colesterol, además, no se inhibió la internalización de las nanopartículas mediante el bloqueo químico específico sobre endocitosis mediada por clatrina/caveolina. La tinción con marcadores endosómicos y lisosómicos (LysoTracker y FM4-64) no mostró co-localización con las nanopartículas. También se evaluaron las posibles perforaciones en la membrana como consecuencia de la entrada celular directa y se pusieron de manifiesto por la presencia de tintes intercalados impermeables a la membrana (yoduro de propidio y azul de tripano)¹⁷⁷. Estos datos se corroboraron con un análisis de internalización *in situ* empleando microscopía, observando como las nanopartículas eran internalizadas de forma eficiente a través de una perforación que se formó en la membrana regenerándose con rapidez. Todo ello sugiere la posibilidad de que se produzca un mecanismo de penetración directa.

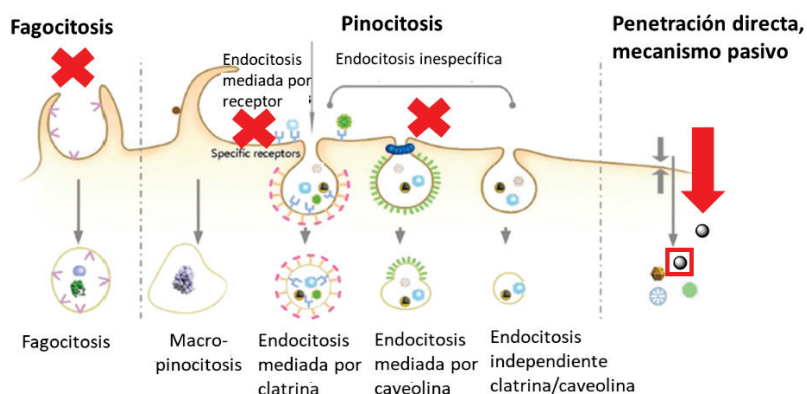


Figure 1.9. Mecanismo de internalización de las nanopartículas de poliestireno mediante penetración directa. (Adaptado, Spicer y col¹⁷⁸, Chem. Soc. Rev., DOI: 10.1039/c7cs00877e)

La **Figura 1.10 a** muestra los resultados positivos de la internalización celular de las nanopartículas de poliestireno en células madre embrionarias¹⁷⁹. Es importante

destacar que estas partículas no presentan citotoxicidad celular en ninguna de las líneas celulares estudiadas¹⁸⁰. En este sentido, quizás el estudio más riguroso que se ha realizado ha sido la generación de ratones vivos y viables a partir de células madre de embrión de ratón previamente incubadas con nanopartículas fluorescentes poniendo de manifiesto la ausencia de citotoxicidad de las nanopartículas¹⁸¹ (**Figura 1.10, b y c**).

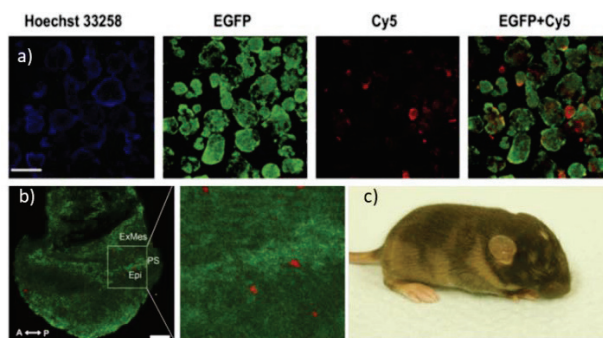


Figura 1.10. a) Análisis por microscopía confocal de cuerpos embrionarios de 7 días, derivados a partir de células madre EGFP tratadas con nanopartículas en los días 4 y 7 de la diferenciación, usando nanopartículas marcadas con el fluoróforo cianina 5 (Cy5). El núcleo celular está marcado con Hoechst 33258. Barra de escala: 200 μ m. b) Imagen confocal de un embrión quimérico (E7.5) generado a partir de una inyección de blastocitos provenientes de células embrionarias EGFP tratadas con nanopartículas marcadas fluorescentemente (Cy5), dentro de huéspedes embrionarios no fluorescentes. c) Ejemplo representativo de un ratón quimérico derivado de células madre EGFP incubadas con nanopartículas marcadas con Cy5 (población GFP+/Cy5+ en el citómetro de flujo).

Además, para corroborar la ausencia de citotoxicidad celular se han llevado a cabo estudios profundos sobre los niveles de expresión génica¹⁸⁰ y proteica¹⁸² tras la internalización celular de nanopartículas de poliestireno de varios tamaños (200 nm y 500 nm) en células de riñón embrionario humano (HEK-293T) y fibroblastos murinos (L929). La evaluación de los cambios en los niveles de expresión génica tras la internalización de nanopartículas de 200 nm se examinó en ambas líneas celulares y no se encontraron cambios significativos y conservados en la expresión génica. Por lo tanto, el examen del perfil de expresión génica inducido por la internalización de las nanopartículas no reveló cambios transcripcionales significativos en comparación con las células de control no tratadas¹⁸⁰. Para identificar las proteínas expresadas diferencialmente, se realizó un análisis proteómico exhaustivo tras la internalización de las nanopartículas de 200 nm y 500 nm. De acuerdo con los datos genómicos previamente obtenidos, la internalización de las nanopartículas no indujo una variación

significativa en los niveles de expresión de proteínas, sólo se detectaron dos cambios significativos en el proteoma total de los fibroblastos murinos, y ninguno en las células humanas. Las proteínas afectadas estaban involucradas principalmente en la transcripción, el metabolismo celular y las actividades del citoesqueleto, por lo tanto, no se vieron afectados procesos importantes como la supervivencia, proliferación y muerte celular, que se expresaron diferencialmente después del tratamiento, confirmando la elevada biocompatibilidad de estos nanotransportadores¹⁸².

Las nanopartículas han sido conjugadas eficientemente a una amplia variedad de materiales con actividad biológica y/o terapéutica sin afectar la capacidad de nanofección de las mismas y se han utilizado con diferentes fines como sensores de pH o calcio, para la liberación controlada de macromoléculas como proteínas y oligonucleótidos, entre otros. A continuación, se describe brevemente algunas de las aplicaciones biológicas de las nanopartículas desarrolladas por mi grupo de investigación liderado por la Dra. Sánchez Martín.

- **Uso de las nanopartículas como sensores del calcio intracelular.**

Mediante el uso de nanopartículas de poliestireno amino funcionalizadas con un sensor moleclar de calcio se ha llevado a cabo la detección de los cambios en la concentración del calcio intracelular en células individuales vivas a tiempo real. El hecho de que las nanopartículas se mantengan en el interior celular durante varios días permite seguir los cambios intracelulares de los iones de calcio en las células individuales durante periodos largos de tiempo en contraposición a los sensores establecidos. Estos resultados abren la puerta a un gran número de posibles aplicaciones, como las nanopartículas actuando como transportadores de sensores para ensayos de actividad enzimática¹⁸³ (Figura 1.11).

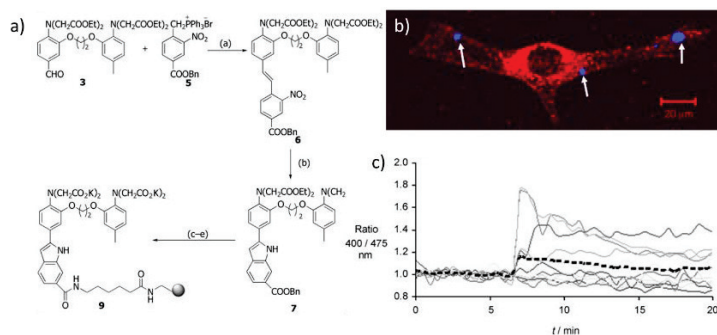


Figura 1.11. a) Síntesis y conjugación covalente a las nanopartículas del compuesto Indo-1 modificado para obtener el sensor Indo1-nanopartículas. b) Imagen de microscopía confocal de una única neurona (línea celular inmortalizada ND7 derivada de neuronas sensoriales) con Indo1-nanopartículas después de 24 horas de incubación a 37 °C en atmósfera del 5% de CO₂. Las flechas blancas muestran la localización intracelular de las nanopartículas en el citoplasma. c) Análisis fluorescente radiométrico (400/475 nm) a tiempo real de la liberación de iones de Ca²⁺ en las células ND7 con Indo1-nanopartículas.

- **Nanopartículas fluorescentes como sensores de pH en células vivas.**

Se ha probado exitosamente el empleo de nanopartículas cargadas con fluoresceína como sensores de pH intracelular en células vivas mediante el uso de un número diferente de técnicas como la espectrofluorimetría, microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (**Figura 1.12**). El enlace covalente de la fluoresceína a la nanopartícula aumenta significativamente la estabilidad del indicador en el tiempo y evita pérdidas, al mismo tiempo que conserva las propiedades de la fluoresceína como sensor de pH. Estas nanopartículas cargadas de fluoresceína proporcionan una vía confiable para completar estudios de seguimiento celular a largo plazo¹⁸⁴.

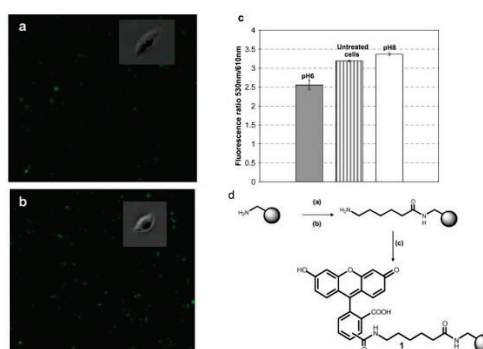


Figura 1.12. Imagen de microscopía de fluorescencia de la línea celular L929 que muestran la internalización de las nanopartículas con fluoresceína después de incubarlas durante 12h a 37 C. (a y b). Las imágenes de fluorescencia verde fueron tomadas a pH 6 y 8, respectivamente. c) Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia frente al pH mediante microscopía. d) Preparación de las nanopartículas de poliestireno amino-funcionalizadas marcadas con fluoresceína.

- **Internalización celular de nanopartículas fluorescentes con biotina-estreptavidina.**

Se ha demostrado mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo la utilización de nanopartículas conjugadas con estreptavidina como sistema de

transporte capaces de entrar en células vivas usando un fluoróforo biotinilado (**Figura 1.13**). Además, se llevó a cabo eficientemente la internalización celular de un oligonucleótido biotinilado. El hecho de que existan varias estrategias de biotinilación para unir diferentes moléculas como por ejemplo péptidos, proteínas, anticuerpos y ácidos nucleicos a las nanopartículas cargadas con estreptavidina abre la puerta a numerosas aplicaciones como la detección intracelular de una variedad de dianas macromoleculares¹⁸⁵.

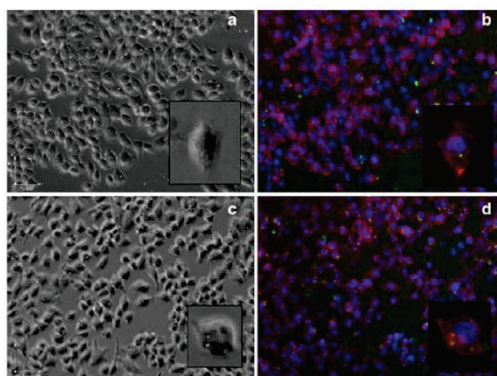


Figura 1.13. Análisis mediante microscopía confocal de la internalización celular de nanopartículas de 0,5 y 2 μm (a y b) y nanopartículas conjugadas a estreptavidina marcadas con biotina fluorescente (c y d) en la línea celular HeLa. Las imágenes a y c están tomadas en contraste de interferencia diferencial. El citoesqueleto fue teñido con un marcador fluorescente rojo (AlexaFluor® 568-phalloidin) y el núcleo con Hoechst 33342 (b y d).

- **Transporte y liberación intracelular de siARN mediante nanopartículas.**

Se ha desarrollado una estrategia de transporte intracelular de siRNA usando las nanopartículas con doble funcionalización (fluorescencia-co-siRNA) que permiten la evaluación específica y recolección de las células que han sido transfectadas con siRNA exclusivamente, y así, se puede llevar a cabo la identificación de poblaciones positivas¹⁸⁶. Dichos resultados se reprodujeron con éxito utilizando células madre embrionarias de ratón (mES) como modelo¹⁸⁷ (**Figura 14 a**). Además, se han optimizado varias estrategias para la liberación de siRNA tiolado¹⁸⁸ (**Figura 1.14**).

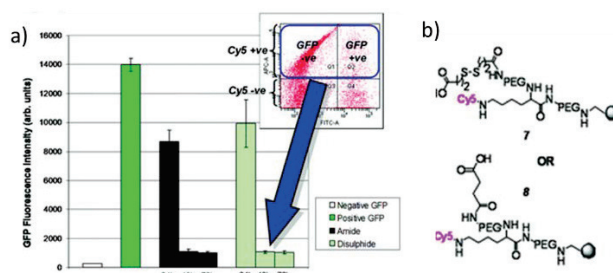


Figura 1.14. Resultados del silenciamiento génico con siRNA llevado a cabo mediante nanopartículas. a) Intensidad de fluorescencia de GFP en células HeLa-GFP después de incubación con nanopartículas de Cy5-co-siRNA durante 24, 48 y 72 h. b) Estructura de los conjugados sintetizados para doble función: análisis de localización y liberación de siRNA.

- **Transporte y liberación de proteínas mediante nanopartículas.**

Se han usado nanopartículas para facilitar la liberación de varias proteínas funcionales dentro de diferentes líneas celulares (incluyendo células madre embrionarias de ratón, mES) (**Figura 1.15**) demostrando que varias proteínas funcionales como la β -galactosidasa y la proteína fluorescente verde (GFP, del inglés "*Green fluorescent protein*") pueden ser liberadas en las células y que dicha liberación puede ser cuantificada. Además, el marcado de las nanopartículas con fluorescencia permite la identificación y aislamiento posterior de las células seleccionadas^{189,187}.

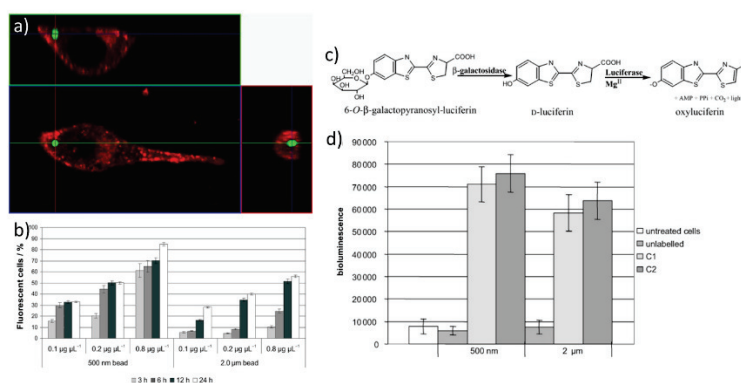


Figura 1.15. a) Imagen obtenida por microscopía confocal de una célula de melanoma de ratón (B16F10) con una nanopartícula conjugada con proteína EGFP después de 24 horas de incubación. b) Análisis por citometría de flujo de la eficiencia de entrada celular de nanopartículas en células B16F10. c) Principio de detección por bioluminiscencia de la actividad de la β -galactosidasa d) Resultados de actividad β -galactosidasa en células HeLa incubadas con nanopartículas unidas a la β -galactosidasa.

- **Transporte y liberación de ADN mediante nanopartículas.**

Se ha desarrollado y evaluado con éxito un nuevo método para la liberación de ADN plasmídico. Se han utilizado técnicas básicas de biología molecular para linealizar y funcionalizar el ADN plasmídico por amino modificación, permitiendo la conjugación eficaz de las nanopartículas carboxifuncionalizadas. La eficacia de esta metodología se demostró mediante la transfección de las células T de la línea del hibridoma con un plásmido que codifica para una proteína específica de linfocitos que está implicada en el proceso de señalización celular (fosfatasa enriquecida con un dominio prolina-glutamina-serina-treonina, PEP) y fusionada con una proteína fluorescente amarilla (YFP, del inglés “*yellow fluorescent protein*”) (Figura 1.16). Dichos resultados nos llevan a la conclusión de que esta estrategia puede ser un excelente método de liberación de ADN plasmídico¹⁹⁰.

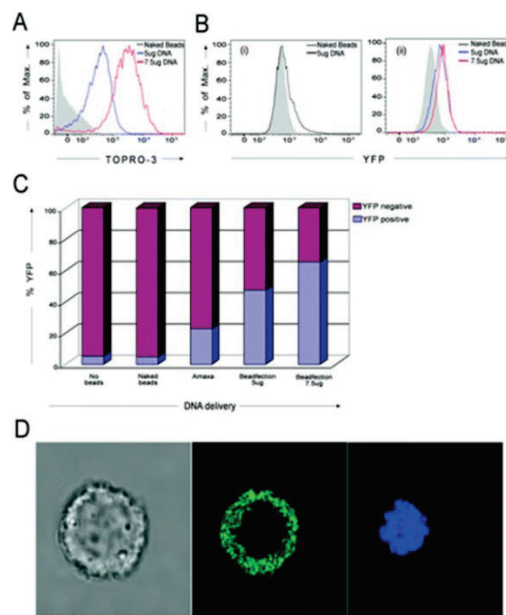


Figura 1.16. Transfección de las células T de hibridoma mediante conjugados de pADN con nanopartículas. (A) Análisis por citometría de flujo de la conjugación eficiente de pDNA con nanopartículas de 200nm utilizando el marcador TOPRO-3. (B) Expresión de la proteína YFP tras 24 horas de incubación: (i) Electroporación por Amaxa, (ii) Internalización de las nanopartículas. (C) Análisis por citometría de flujo de la expresión de la proteína YFP en células con electroporación (Amaxa), internalización y controles negativos: células no tratadas (sin nanopartículas) y con nanopartículas sin pDNA conjugado (nanopartículas desnudas). (D) Imagen de microscopía confocal de células T del hibridoma (F5.BW) con conjugados de pDNA-NPs expresando PEP-YFP (verde).

- **Células como “reactores catalíticos”. Catálisis con nanopartículas de paladio en células vivas.**

También se ha desarrollado con éxito, la síntesis de microcatalizadores heterogéneos mediante la inmovilización de moléculas de paladio (Pd) en las nanopartículas. La evaluación biológica de dichos sistemas ha revelado que las nanopartículas de paladio son capaces de atravesar la membrana celular sin presentar toxicidad celular. Para evaluar esta metodología, se emplearon nanopartículas con Pd encapsulado para catalizar la rotura de un alilcarbamato, que actúa como grupo protector de un fluoróforo protegido dentro de células de la línea celular HeLa. Estos resultados, que fueron confirmados mediante citometría de flujo (FACS) y microscopía confocal, proporcionaron un punto de partida estimulante hacia la meta del diseño de catalizadores de paladio como herramientas en química biológica (**Figura 1.17**). Estos sistemas podrían ser empleados para reacciones químicas en sistemas vivos con el objetivo de formar y romper enlaces C-C específicos¹⁹¹.

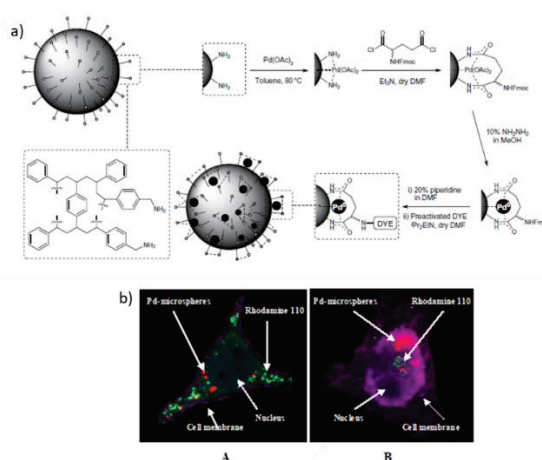


Figura 1.17. a) Síntesis de nanopartículas Pd⁰ marcadas fluorescentemente. b) Imágenes obtenidas por microscopía confocal (A y B) de células HeLa después de llevar a cabo la desprotección del alilcarbamato en el interior celular.

- **Nanopartículas como sensores intracelulares de la caspasa-3/7 en células vivas apoptóticas.**

Se ha diseñado una nueva sonda multifuncional para monitorizar la actividad enzimática intracelular en células vivas. Se utilizan como sensores intracelulares

precisos mediante la conjugación de un control interno (que proporciona una característica adicional tanto para evaluar la eficiencia de internalización celular como para rastrear sondas a lo largo del tiempo). En particular, se describe una aplicación específica de estas nanopartículas multifuncionales como sensores de caspasa-3/7 para monitorizar la apoptosis mediante citometría de flujo (**Figura 1.18**). De forma que se prepararon estos dispositivos junto con un estudio cinético de la caspasa-3 a caspasa-7 y se evaluó como sonda de citometría de flujo en células vivas apoptóticas¹⁹².

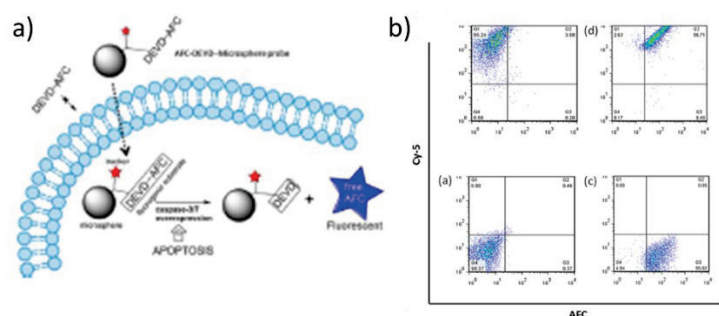


Figura 1.18. Monitorización de la actividad enzimática dentro de las células vivas. b) Diagrama de puntos representativos de la citometría de flujo resultado de la actividad caspasa-3/7 en la línea celular HeLa.

Las nanopartículas de poliestireno reticuladas y funcionalizadas presentan una serie de ventajas frente a otros sistemas de liberación celular:

- Su estructura reticulada permite obtener nanopartículas en el rango nanométrico compatibles con medios acuosos y orgánicos (como, por ejemplo, dimetilformamida o metanol) por lo que pueden seguir protocolos tradicionales de síntesis orgánica en fase sólida, permitiendo llevar a cabo múltiples reacciones químicas, diferenciándose del resto sólo compatibles con medios acuosos.
- Se pueden unir una gran variedad de estructuras con relevancia biológica, como pequeñas moléculas (fármacos, biosensores y fluoróforos), péptidos, proteínas, ARN y ADN, mediante el uso de protocolos de conjugación eficientes y suaves que no dañan el material biológico transportado.
- Son lo suficientemente grandes para ser visualizadas mediante el uso de técnicas estándar de microscopía. Esta característica permite que las nanopartículas

puedan ser observadas en células vivas, a tiempo real e individualmente, siendo de vital importancia para aplicaciones de las mismas como sensores *in situ* de procesos biológicos.

- Cuando se desee, como en el caso de sensores intracelulares, la molécula se puede mantener unida a las nanopartículas, con lo cual, no se diluyen dentro de la célula, evitando una difusión pasiva no deseada de la misma en el citoplasma.
- Se pueden marcar poblaciones celulares específicamente con las nanopartículas y separarlas del resto de las células de la población mediante el uso de citometría de flujo. Esto permitirá el aislamiento de células y, como consecuencia, la manipulación y el análisis de las mismas.
- Las células se pueden aislar con las nanopartículas en su interior, esto permitiría definir el contenido de la carga transportada. Pueden separarse células con nanopartículas de dos colores diferentes, permitiendo la liberación monitorizada de dos biomoléculas independientes dentro de la misma célula.
- Se puede monitorizar la proliferación celular en diferentes líneas celulares incluyendo aquellas que son difíciles de transfectar como los linfocitos utilizando nanopartículas fluorescentes.
- Las nanopartículas de poliestireno son biocompatibles e inocuas en los sistemas testados hasta el momento, por lo que se consideran no tóxicas, como demuestran los estudios genómicos, proteómicos y de viabilidad celular desarrollados hasta el momento.

Objetivos

OBJETIVOS

Hemos visto como la nanomedicina aplicada a la terapia frente al cáncer representa un enfoque terapéutico innovador y prometedor para superar las diversas limitaciones de los fármacos convencionales como son la baja biodisponibilidad, la desaparición de la diana específica y la toxicidad sistémica. De esta forma, los nanodispositivos ofrecen un diseño multifuncional de sistemas de liberación selectiva de fármacos que permiten la solubilización de fármacos hidrofóbicos, el suministro de diversas combinaciones de fármacos y la liberación programable del fármaco desde el nanovehículo hasta el sitio diana del tumor y sus metástasis. Estas ventajas también se pueden aprovechar para superar la resistencia a los medicamentos en el cáncer.

Nuestro grupo de investigación tiene una amplia experiencia en el diseño y síntesis de nanopartículas, de hecho, ha diseñado y desarrollado una nueva metodología química para la preparación de un amplio abanico de nanopartículas de poliestireno funcionalizadas, monodispersas y reticuladas, sintetizadas en varios tamaños dependiendo de la aplicación biológica. Estas partículas son compatibles química y biológicamente y, por lo tanto, se pueden utilizar en diferentes aplicaciones en el campo biomédico.

En la presente Tesis Doctoral se pretende abordar el desarrollo y la validación de nanosistemas multifuncionales para su aplicación terapéutica y diagnóstica frente al cáncer. Por ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas para su uso en aplicaciones biotecnológicas.

- 1.1. Síntesis de las nanopartículas de poliestireno aminofuncionalizadas, reticuladas y monodispersas.
- 1.2. Caracterización físicoquímica y biológica de las nanopartículas para su utilización en aplicaciones biomédicas.
- 1.3. Desarrollo de estrategias químicas para la multifuncionalización de nanopartículas mediante la conjugación de diferentes moléculas.

Objetivo 2. Desarrollo de un método para la cuantificación de nanopartículas para su uso en ensayos celulares mediante espectrofotometría.

- 2.1. Diseño y desarrollo de protocolos para la cuantificación de nanopartículas mediante un método espectrofotométrico válido para la realización de ensayos celulares.
- 2.2. Validación e implementación del método espectrofotométrico de cuantificación de nanopartículas para el desarrollo de protocolos para la nanofección celular.

Objetivo 3. Nanopartículas como agentes de liberación selectiva de fármacos: Diseño y validación de estrategias químicas y evaluación biológica.

- 3.1. Desarrollo y validación química de un sistema de liberación selectiva de fármacos constituido por las nanopartículas basado en la ruptura de enlaces sensibles a pH.
- 3.2. Evaluación biológica del sistema basado en nanopartículas como agentes de liberación selectiva de fármacos.

Objetivo 4. Nanopartículas como sondas de marcaje tumoral: Diseños de estrategias para la liberación dirigida y selectiva de nanopartículas basadas en anticuerpos monoclonales.

- 4.1. Diseño y desarrollo de una sonda de marcaje tumoral basada en anticuerpos monoclonales mediante la utilización de nanopartículas.
 - 4.1.1. Validación química de la conjugación del anticuerpo basada en la estrategia maleimido-tiol.
 - 4.1.2. Validación química de la conjugación del anticuerpo basada en la estrategia de química clic.
- 4.2. Evaluación biológica de los conjugados formados por las nanopartículas conjugadas a los anticuerpos monoclonales como sondas de marcaje tumoral.
- 4.3. Diseño y desarrollo de un nanosistema terapéutico basado en la liberación dirigida y selectiva de fármacos mediante nanopartículas conjugadas a anticuerpos monoclonales.

- 4.3.1. Validación química de la conjugación del fármaco en los nanosistemas terapéuticos unidos a anticuerpos monoclonales mediante la estrategia maleimido-tiol.
- 4.3.2. Validación química de la conjugación del fármaco en los nanosistemas terapéuticos unidos a anticuerpos monoclonales mediante la estrategia de química clic.
- 4.4. Evaluación biológica de los nanosistemas terapéuticos formados por las nanopartículas conjugadas con anticuerpos monoclonales para la liberación dirigida y selectiva de fármacos

Objetivo 5. Nanopartículas como agentes de teranosis: Desarrollo de estrategias para la liberación dirigida y selectiva de nanopartículas basadas en homing peptides.

- 5.1. Diseño y desarrollo de estrategias químicas para la trifuncionalización de las nanopartículas para su utilización como agentes teranósticos.
- 5.2. Validación de las estrategias químicas para la trifuncionalización de las nanopartículas.
- 5.3. Evaluación biológica del sistema teranóstico constituido por las nanopartículas trifuncionalizadas.

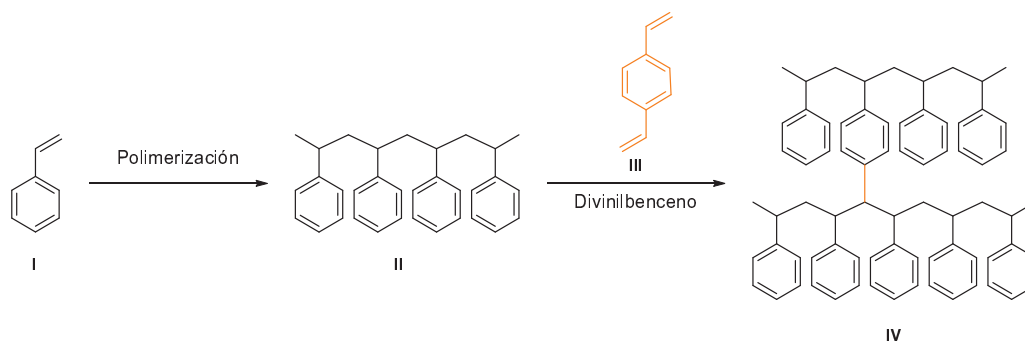
Capítulo II

Capítulo II: Síntesis y Caracterización de las nanopartículas para su uso en aplicaciones biológicas

2.1. Síntesis de nanopartículas poliméricas de poliestireno biocompatibles

El hecho de que las nanopartículas poliméricas biodegradables sufran cambios significativos en su estructura química bajo condiciones ambientales específicas (como por ejemplo el uso de disolventes orgánicos) las hace muy sensibles y limitan la química que se puede realizar sobre ellas y, por lo tanto, limitan la capacidad de funcionalización con varias moléculas bioactivas. Además, estos cambios provocan una pérdida de las propiedades físicas y mecánicas del polímero que afectan de forma importante a su capacidad para transportar fármacos y otras moléculas biológicas. Como consecuencia, la investigación se ha centrado en la modificación de los polímeros biodegradables tradicionales para hacerlos más estables en condiciones químicas. Concretamente, las nanopartículas poliméricas reticuladas ("*cross-linked*"), que son susceptibles de realizar múltiples reacciones químicas, son ideales para aplicaciones biomédicas ya que permiten llevar a cabo la multifuncionalización con distintos componentes bioactivos para la liberación intracelular selectiva y eficiente de la carga terapéutica.

La síntesis de nanopartículas poliméricas de poliestireno fue introducida en 1984 por Tseng y col.¹⁹⁴. Ellos sugirieron un mecanismo conocido como la polimerización por dispersión para la formación y el crecimiento de partículas de poliestireno uniformes con un tamaño comprendido entre 1-10 μm . Pero no fue hasta 1994 cuando Delair y col., obtuvieron partículas de poliestireno amino-funcionalizadas con un tamaño comprendido entre 200 nm-1000 nm mediante copolimerización por emulsión¹⁹⁵. Además, para conseguir poblaciones de nanopartículas estables, monodispersas y con morfología esférica añadieron un monómero, divinilbenceno (DVB), con la propiedad de unir las cadenas de poliestireno en crecimiento (*cross-linked*) obteniendo nanopartículas reticuladas. (**Esquema 2.1**).



Esquema 2.1. Copolimerización del estireno con divinilbenceno dando lugar a partículas reticuladas del mismo tamaño.

Existen diferentes técnicas para la preparación de nanopartículas reticuladas como son: polimerización por suspensión, dispersión y emulsión, todos ellos parten de un proceso llamado polimerización heterogénea¹⁹⁶, que implica la generación de partículas monodispersas.

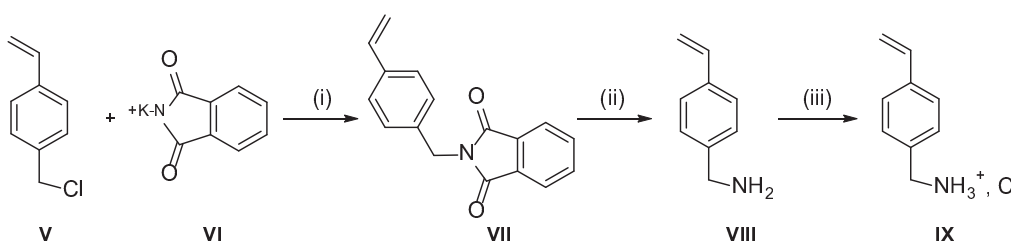
2.2. Resultados

2.2.1. Síntesis de nanopartículas de poliestireno aminometiladas y reticuladas.

Las nanopartículas empleadas en este trabajo de investigación son amino funcionalizadas. Dicha funcionalización permite llevar a cabo uniones covalentes de un amplio número de compuestos como fluoróforos, espaciadores o biomoléculas. Por otro lado, la naturaleza reticulada de estas nanopartículas presenta grandes ventajas sobre las no reticuladas porque tienen mayor estabilidad mecánica en diferentes disolventes orgánicos, además de poder realizar con ellas un amplio espectro de reacciones. En concreto, para la preparación de las nanopartículas de poliestireno empleadas en esta investigación se ha llevado a cabo la copolimerización radicalaria libre de un monómero amino funcionalizado, hidrocloreto de vinil bencilamina (VBAH), con estireno y *p*-divinilbenceno (DVB) (que actúa como agente de entrecruzamiento originando partículas reticuladas) generando poblaciones monodispersas de nanopartículas amino funcionalizadas. El proceso fue llevado a cabo mediante polimerización por dispersión o polimerización por emulsión libre de emulsionante dependiendo del tamaño de nanopartícula deseado siguiendo protocolos previamente descritos¹⁹⁷.

2.2.1.1. Síntesis del monómero amino funcionalizado

La síntesis del monómero funcionalizado, hidrocloreto de vinil bencil amina (VBAH) fue realizada como está descrito previamente¹⁹⁸ donde 4-vinil bencilftalimida (VII), resultado de la reacción del cloruro 3-vinilbencilo (V) con ftalimida potásica (VI) en DMF, fue calentada en presencia de hidracina para dar el derivado amino, vinil bencilamina (VIII), el cual fue convertido en su sal VBAH (IX) con un rendimiento del 92% (Esquema 2.2).

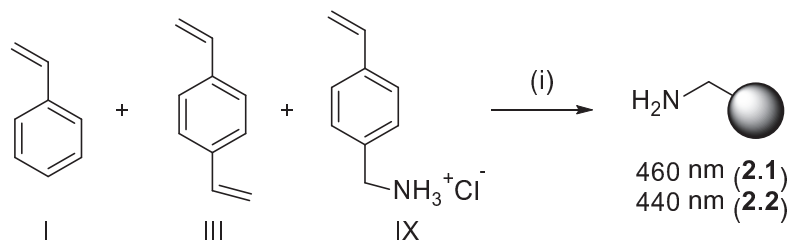


Esquema 2.2.: Síntesis de hidrocloreto de vinil bencilamina. *Reactivos y condiciones:* (i) DMF, 50 °C, 17 h, 92%; (ii) N₂H₄, Argon atm., EtOH, 70 °C, 3 h, 90%; (iii) HCl 6N, 0 °C, 95%, 92% en general.

2.2.1.2. Síntesis de nanopartículas por polimerización por dispersión

Para este proyecto se ha empleado el protocolo de polimerización por dispersión para la síntesis de nanopartículas de poli(estireno-co-divinilbenceno) monodispersas con un tamaño aproximado de 500 nm¹⁹⁷. Las nanopartículas fueron sintetizadas por polimerización por dispersión en una atmósfera inerte (argón) empleando una mezcla de etanol/agua (86:14) como medio de dispersión con poli(N-vinilpirrolidona) (PVP) con peso molecular de 29.000 g/mol como estabilizador, VBAH como monómero amino funcionalizado y 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador radicalario. Una vez terminada la reacción, la suspensión de nanopartículas se dejó enfriar durante 30 minutos y se purificaron seguidamente con lavados con metanol y agua, mediante ciclos de centrifugación y dispersión, y se recolectaron las nanopartículas sintetizadas (Esquema 2.3). Esta síntesis se realizó, en primer lugar, 12 reacciones de polimerización simultáneamente en un carrusel Radley (volumen de reacción de 10 mL), a una temperatura controlada de 65 °C, a una velocidad de agitación de 350 rpm en atmósfera inerte (argón) (Figura 2.1.a). En una segunda etapa, con objeto de obtener un volumen mayor de nanopartículas por reacción se llevó a cabo el escalado de la reacción, utilizándose para ello un reactor con capacidad para 90 mL. En ambos casos, las

nanopartículas fueron obtenidas con alto rendimiento (96% para Carrusel y 92 % en el escalado) (**Figura 2.1.b**).



Esquema 2.3: Síntesis de nanopartículas amino funcionalizadas mediante polimerización por dispersión.

Reactivos y condiciones. (i) PVP, AIBN, etanol/agua, 65°C, 350 rpm, Argon atm., 16h.

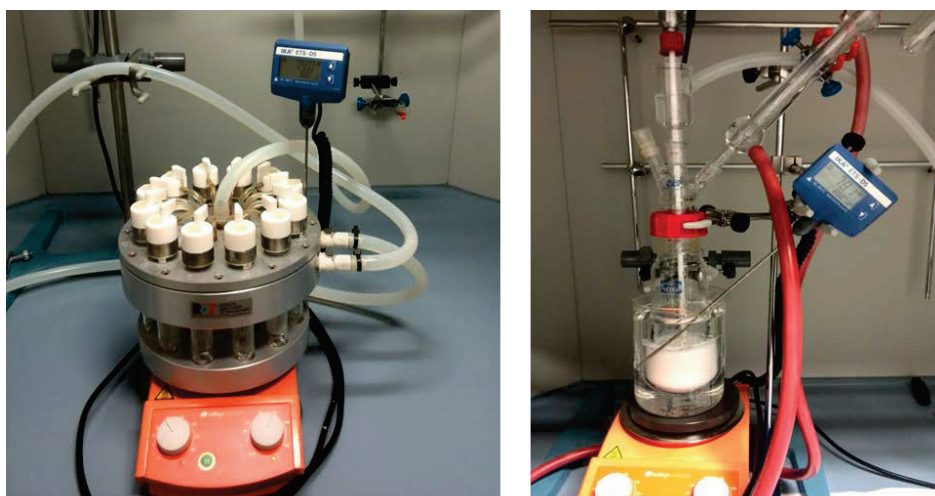


Figura 2.1. a) Carrusel Radley para la preparación de nanopartículas a pequeña escala. **b)** Reactor para llevar a cabo el escalado de la reacción.

Empleando este método de polimerización por dispersión se producen partículas monodispersas del tamaño aproximado de 500 nm en un simple proceso por etapas. En este método los monómeros (estireno, DVB y VBAH) y el iniciador (AIBN) se mezclan en una fase orgánica en la cual la polimerización de los monómeros ocurre en presencia de PVP como estabilizador polimérico adecuado, soluble en el medio de la reacción (etanol/agua). Esta mezcla etanol/agua se seleccionó como medio de reacción ya que proporciona la polaridad adecuada para que tanto los monómeros como con el estabilizador polimérico estérico (PVP) se solubilizen adecuadamente y el polímero formado precipite en dicha mezcla de disolventes transcurrido el periodo de reacción. Esta polimerización produce partículas poliméricas ofreciendo una excelente monodispersidad¹⁹⁹. La polimerización por dispersión implica por lo tanto varias etapas

(Figura 2.2.). En primer lugar, se prepara una solución homogénea, donde se encuentran los monómeros, el iniciador y el estabilizador. A continuación, se induce la polimerización por calor y en la solución comienzan a aparecer los radicales iniciadores. Estos radicales reaccionan con los monómeros conduciendo a la formación de macromoléculas que, a su vez, conduce a la nucleación y a la formación de partículas primarias. De esta forma, en esta etapa, se produce una fase de nucleación rápida donde el núcleo monodisperso se hincha con los monómeros, los oligómeros cortos y los radicales iniciadores²⁰⁰. Ocurre la coalescencia de las nanopartículas inestables y las partículas estables sufren un crecimiento hasta precipitar en el medio de reacción. Por lo tanto, la polimerización tiene lugar principalmente dentro de las partículas individuales, conduciendo a la formación de partículas esféricas estables (Figura 2.2).

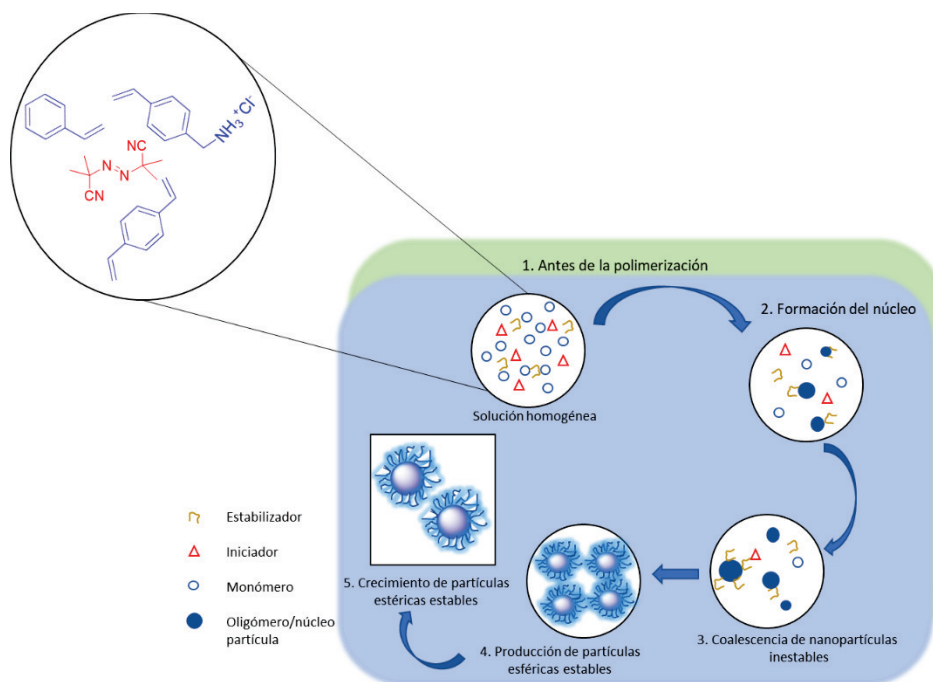


Figura 2.2. Polimerización por dispersión. Modelo de nucleación y crecimiento de la partícula en la fase orgánica: 1. antes de iniciar la polimerización se lleva a cabo la solución homogénea de los reactivos; 2. se aumenta temperatura de reacción y el radical iniciador soluble en fase acuosa reacciona con los monómeros (núcleo de la partícula); 3. Coalescencia de las nanopartículas inestables ; 4. se producen partículas esféricas estables y 5. Se produce crecimiento de las mismas en la fase orgánica hasta precipitación en medio de reacción.

Es importante destacar el hecho de que en la polimerización por dispersión, la estabilización de las partículas es un aspecto importante. El estabilizador, en este caso el PVP, es esencial y juega un papel crucial en este proceso mediante la adsorción o

incorporación de los polímeros precipitados recién formados sobre su superficie (capa peluda)²⁰¹ (**Figura 2.3**). El estabilizador actúa como una influencia estérica y facilita la precipitación de las partículas primarias monodispersas, las cuales continúan su crecimiento por hinchamiento con más monómero u oligómeros cortos que producen las nanopartículas²⁰².

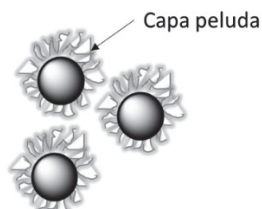


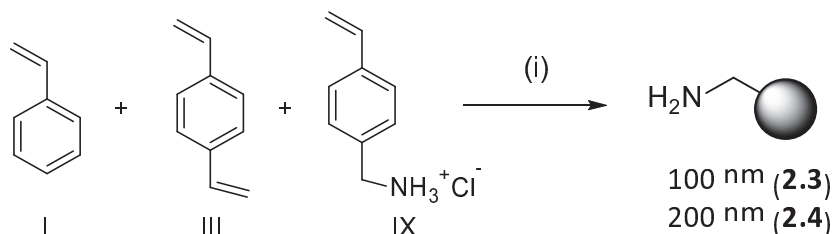
Figura 2.3. Esquema representativo de nanopartículas estabilizadas por PVP.

El tamaño de las nanopartículas en la polimerización por dispersión puede estar influenciada en mayor o menor medida por muchos factores incluyendo la temperatura de polimerización, las concentraciones del monómero y del iniciador y el tipo y la concentración del estabilizador. Además, la solubilidad del medio de polimerización tiene una influencia notable en el tamaño final²⁰³. En el protocolo de síntesis empleado, las condiciones empleadas son óptimas para la síntesis de nanopartículas de tamaño aproximado de 500 nm.

2.2.1.3. Síntesis de nanopartículas por polimerización por emulsión libre de emulsionante

En este proyecto se llevó a cabo un segundo método de polimerización basado en una variante de la polimerización por emulsión libre de emulsionante en agua, mediante una adaptación del protocolo descrito por Delair y colaboradores. Este método se ha llevado a cabo con el fin de obtener partículas de menor tamaño (100-200 nm). En este protocolo, el VBAH copolimeriza con estireno en agua (previamente desoxigenada) con sulfato magnésico como estabilizador. Después de agitarse a velocidad adecuada 1000 rpm r.p.m. durante 30 minutos a 80°C, se añadió el iniciador, soluble en agua, dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (V_{50}). La emulsión resultante se agitó y se mantuvo la temperatura a 80 °C dando lugar a las nanopartículas amino metiladas reticuladas de 200 nm con un rendimiento del 98% cuando se dejó reaccionar durante 2 horas a 1000 rpm y de 100 nm cuando se dejó reaccionar 2 horas a 1100 rpm con un

rendimiento del 87% (**Esquema 2.4**). A continuación, se llevó a cabo la purificación de las nanopartículas obtenidas como en el apartado anterior mediante ciclos consecutivos de centrifugación y resuspensión en metanol y agua. Esta reacción se llevó a cabo en el Carrusel Radley empleado en la síntesis anterior y, posteriormente, se realizó el escalado a 90 mL (**Figura 2.1.**).



Esquema 2.4: Síntesis de nanopartículas amino-funcionalizadas mediante polimerización por emulsión libre de emulsionante. *Reactivos y condiciones.* (i) MgSO_4 , H_2O , V50, 80°C , 350 rpm, Argon atm., 15h.

Este método basado en la polimerización por emulsión del poliestireno se realizó sin la adición de ningún estabilizador o surfactante en el medio de polimerización. Esta decisión se basa en la investigación de *Kotera y col.*,^{204,205} quienes mostraron que la formación de las partículas en crecimiento se explica por el mecanismo de nucleación homogénea^{206,207} donde la estabilización de estas partículas proviene de la orientación de sus propias cadenas de polímero, en particular los extremos de la cadena procedente de las moléculas iniciadoras. En este caso, se emplea el sistema libre de emulsionante corresponde al formado por estireno/V₅₀/agua donde la polimerización se inicia por el iniciador V50 (soluble en agua) en la fase acuosa y no en las micelas emulsionantes (como ocurría en la polimerización por emulsión) y causa la formación de los radicales. A medida que crecen las partículas, la carga superficial (generada por los grupos finales del iniciador) aumenta hasta alcanzar un punto donde las partículas se estabilizan por su propia carga electrostática que también conlleva repulsiones estáticas entre las partículas, previniendo la floculación²⁰⁸ (**Figura 2.4**).

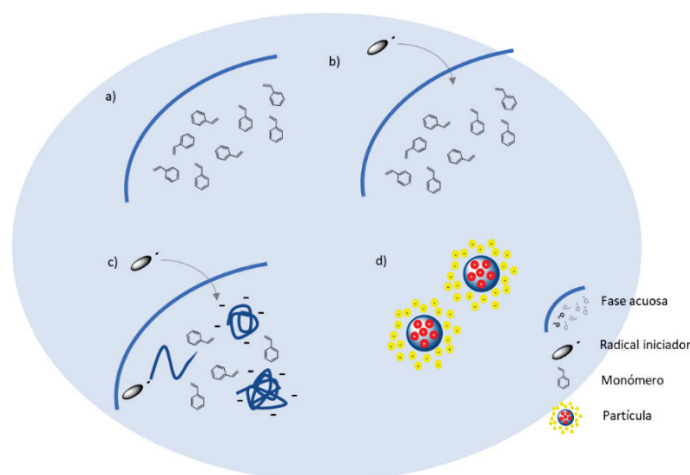


Figura 2.4. Polimerización por emulsión libre de emulsionante. Modelo de nucleación y crecimiento de la partícula en la fase acuosa: a) Formación de las gotas de monómero en la fase acuosa; b) el radical iniciador soluble en agua reacciona con los monómeros (núcleo de la partícula); c) crecimiento de las partículas aumentando su carga superficial; d) formación de las partículas estabilizadas con su propia carga electrostática.

2.2.2. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

Las nanopartículas poliméricas se utilizan en numerosas aplicaciones biomédicas por lo que una caracterización fisicoquímica rigurosa cobra una gran importancia desde el momento en que estas nanopartículas pueden convertirse en nanofármacos para su posterior traslación a clínica.

En este apartado se presentan los parámetros más relevantes de la caracterización fisicoquímica en referencia al campo de la biomedicina. En la **Figura 2.5** se resume brevemente los parámetros analizados como el tamaño, superficie, carga y liberación del fármaco, estabilidad y consistencia entre lotes así como las técnicas e instrumentos analíticos más comunes utilizados para la evaluación de cada uno de estos parámetros. No todas las técnicas se emplean siempre, para cada caso específico se selecciona la técnica adecuada dependiendo de la naturaleza de la nanopartícula y de las moléculas que se conjugan a ella.

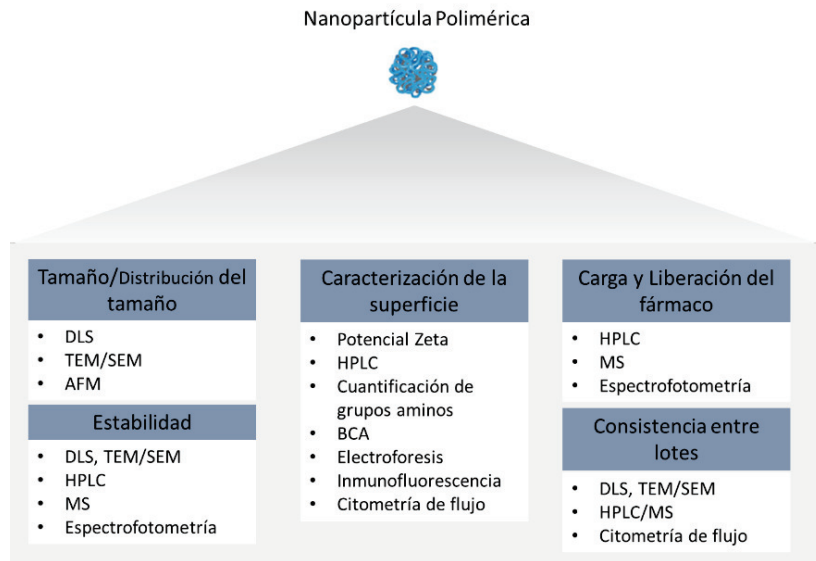


Figura 2.5. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas poliméricas. La caracterización de las Nanopartículas poliméricas debe incluir parámetros como el tamaño, superficie, carga y liberación del fármaco, estabilidad y consistencia entre lotes. Aparecen las técnicas más usuales para evaluar dichos parámetros.

2.2.2.1. Tamaño

El tamaño de las nanopartículas es un factor crucial que regula la circulación y navegación de las mismas en el torrente sanguíneo, la penetración del fármaco a través de las barreras fisiológicas, la localización del lugar específico en la célula e incluso la inducción de respuestas celulares^{209,210,211}. El tamaño se puede determinar de muchas maneras, y la técnica usada dependerá de la información deseada.

Para las medidas del tamaño de las nanopartículas sintetizadas se ha empleado una técnica de dispersión de luz, en concreto dispersión de luz dinámica (DLS, del inglés “*dynamic light scattering*”) y tres técnicas de imagen incluyen microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés “*scanning electron microscopy*”), microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés “*transmission electron microscopy*”) y microscopía de fuerza atómica (AFM, del inglés “*atomic force microscopy*”).

2.2.2.1.1. Tamaño de las nanopartículas mediante dispersión de luz dinámica (DLS)

La distribución del tamaño de las nanopartículas obtenidas mediante polimerización por dispersión (2.1 y 2.2) y por emulsión libre de emulsionante (2.3 y 2.4) fue determinada mediante la dispersión de luz dinámica en el Zetazizer Nano ZS Malvern. Este instrumento permite la caracterización de las partículas mediante mediciones precisas,

fiables y repetibles del tamaño de la partícula, en concreto se determina el diámetro hidrodinámico de las mismas, siendo este el método más conveniente y rápido para medir el tamaño de las nanopartículas²¹². Por ello, DLS será la medida utilizada de forma rutinaria para caracterizar el tamaño de las nanopartículas sintetizadas en este trabajo de investigación.

La dispersión de luz dinámica mide el coeficiente de difusión y calcula indirectamente el tamaño hidrodinámico²¹³. De forma resumida, la suspensión de las nanopartículas se irradia con un láser monocromático y las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersa se miden como una función del tiempo. Estas fluctuaciones son el resultado del movimiento browniano de las nanopartículas que son convertidas en un coeficiente de correlación y representadas como una función del tiempo. Esta curva se ajusta a un modelo apropiado que proporciona el coeficiente de difusión, y se aplica la ecuación de Stokes-Einstein para calcular el tamaño hidrodinámico.

Para dicha medida se realizaron diluciones (1/1000) de las suspensiones madre que se encontraban a las concentraciones recogidas en la **Tabla 2.1**. Los valores que se obtuvieron de la media del tamaño de las partículas y el índice de polidispersidad (PDI, del inglés “*polydispersity index*”) se han resumido en la **Tabla 2.1**. El PDI puede tener un valor entre 0 (cada partícula en la suspensión tiene exactamente el mismo tamaño) y 1 (el tamaño de cada partícula es diferente). Un valor por debajo de 0.2 clasifica normalmente las dispersiones como monodispersas²¹⁴. Por lo tanto, estos resultados indican que las nanopartículas son monodispersas con una distribución del tamaño de población muy homogénea.

Tabla 2.1. Valores del tamaño (media) y el índice de polidispersidad (PDI) de las NPs sintetizadas.

NPs	Concentración (NP/g)	Media Diámetro (nm)	PDI
2.1	$1,96 \times 10^{13}$	$460 \pm 5,6$	0,042
2.2	$1,53 \times 10^{13}$	$439,2 \pm 3,5$	0,055
2.3	$1,91 \times 10^{15}$	$100 \pm 3,6$	0,079
2.4	$2,38 \times 10^{14}$	$222,1 \pm 1,25$	0,012

2.2.2.1.2. Tamaño de las nanopartículas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Como técnica complementaria para la medida del tamaño y la forma de las nanopartículas poliméricas obtenidas se llevó a cabo el análisis de las nanopartículas por SEM utilizando un microscopio Hitachi modelo S-510 SEM. Para este propósito, se realizaron diluciones de las distintas muestras a analizar (1/1000) (ver concentraciones en **Tabla 2.1**). Las micrografías obtenidas utilizando esta técnica mostraron que estas nanopartículas aparecen como poblaciones de partículas monodispersas confirmando los resultados obtenidos por DLS. Además, SEM revela información sobre la morfología externa, mostrando una morfología esférica con una superficie suave en el caso concreto de las muestras de nanopartículas **2.1**. y **2.4**. (**Figura 2.6**).

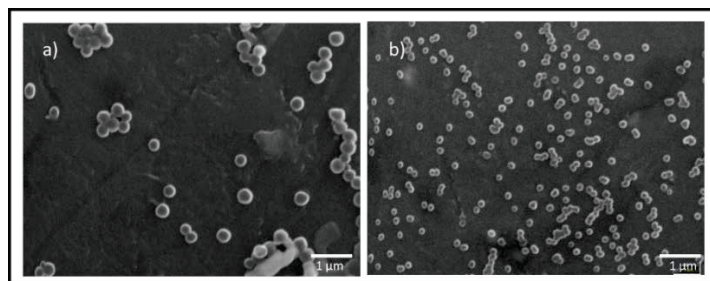


Figura 2.6. Microscopía electrónica de barrido. Imágenes de las nanopartículas sintetizadas: a) NPs **2.1**.; b) NPs **2.4**. Barra de escala 1 µm.

2.2.2.1.3. Tamaño de las nanopartículas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La técnica TEM proporciona imágenes directas e información química de las nanopartículas a una resolución espacial por debajo del nivel de la dimensión atómica ($<1 \text{ nm}$)^{215,216}. El tamaño y la forma de las nanopartículas poliméricas obtenidas en este capítulo fueron analizados por TEM utilizando un microscopio de alta resolución FEI Titan G2 con cañón de emisión de campo tipo XFEG que opera a 300 kV. Previamente al análisis de las muestras, las nanopartículas fueron suspendidas en etanol absoluto, tratadas con cobre y depositadas sobre una rejilla forrada con carbón. La **Figura 2.7** muestra las nanopartículas **2.1** de 460 nm. Además, la técnica TEM puede proporcionar información acerca de no solo el tamaño sino también los grados de agregación o dispersión de las nanopartículas. En la **Figura 2.7**. se observa la presencia de nanopartículas individualizadas, sin agregación, confirmándose nuevamente los

resultados obtenidos por DLS siendo el diámetro menor cuando se compara con el diámetro hidrodinámico resultante de DLS.

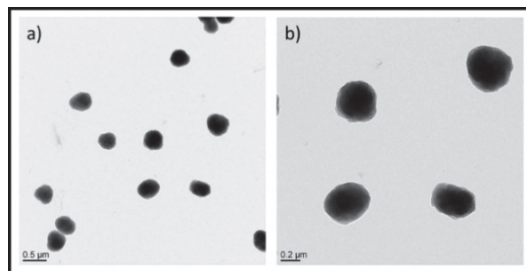


Figura 2.7. Microscopía electrónica de transmisión. Imágenes adquiridas mediante TEM de las NPs 2.1.

2.2.2.1.4. Tamaño de las nanopartículas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)

Esta técnica de microscopía es capaz de detectar fuerzas del orden de nanonewtons y obtener imágenes topográficas de alta resolución en tiempo real²¹⁷. Las imágenes topográficas de las nanopartículas 2.2 fueron obtenidas con el AFM Nx20 (Park Systems) a una temperatura aproximada de 20 °C operando en aire y a modo no contacto usando una punta cantiléver comercial de silicón con una rigidez de 40 Nm⁻¹ y una frecuencia de resonancia alrededor de 170kHz. Las nanopartículas dispersadas en agua destilada mediante sonicación se colocaron sobre un disco de mica (1 cm²) y se dejaron secar unos minutos. La imagen del AFM se procesó utilizando el software de adquisición de datos Xei. Al igual que las técnicas SEM y TEM, el AFM puede ser utilizado para determinar el tamaño, forma, estructura y grado de dispersión y agregación de las nanopartículas. La imagen obtenida en 3D mostró la topografía de la población de nanopartículas, mostrando una morfología esférica con una superficie irregular (Figura 2.8). En este caso se observa una fuerte aglomeración de las nanopartículas.

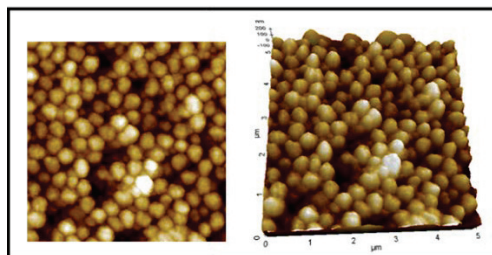


Figura 2.8. Microscopía fuerza atómica. Imágenes adquiridas mediante AFM de las NPs 2.2.

2.2.2.2. Caracterización de la superficie

Es necesario una caracterización profunda de la superficie de las nanopartículas para garantizar la seguridad y la eficacia previstas en las aplicaciones biomédicas, ya que las características superficiales de las nanopartículas determinarán su rendimiento biológico, es decir, la biodistribución y la toxicidad de las mismas²¹⁸. Las características más comunes de la superficie de las nanopartículas son la carga (potencial zeta), el carácter hidrofílico (superficie modificada con polímeros hidrofílicos como el PEG) y la presencia de ligandos dirigidos (para asegurar una liberación selectiva).

En el caso particular de las nanopartículas empleadas en esta tesis, se llevó a cabo la PEGilación de las mismas con diferentes unidades de PEG. La cuantificación del PEG y demás compuestos conjugados a la NP se realizó mediante los cambios en los valores del potencial zeta y la cuantificación de los grupos aminos presentes en las nanopartículas amino funcionalizadas mediante el test de ninhidrina (Test de Kaiser) y el test Fmoc (apartado 2.2.2.2.2). La unión de los ligandos dirigidos y otras proteínas se ha validado utilizando diversas técnicas como ensayos de BCA, electroforesis en gel de agarosa o inmunofluorescencia, que se verán en el capítulo 5.

2.2.2.2.1. Potencial zeta

La superficie de las nanopartículas se caracterizó por el potencial zeta que se correlaciona con la carga de las partículas y puede describirse de forma simplista por el modelo de Gouy-Chapman-Stern²¹⁹. Una partícula cargada positivamente a pH fisiológico como las nanopartículas amino funcionalizadas afectará a los iones cercanos disueltos en el medio de suspensión. Por lo tanto, si la superficie de las partículas está cargada positivamente a un pH determinado (cuantificada por el potencial de superficie) ésta atrae contraiones cargados negativamente. Estos iones forman una monocapa fuertemente adsorbida en la superficie de la partícula. Esto conduce a una disminución lineal del potencial dando como resultado el llamado potencial de Stern. Se continúa con una capa difusa que contiene iones que aún son atraídos por la partícula y su capa Stern circundante pero que están más débilmente unidos. Existe un límite entre los iones de la capa difusa que se moverá con la partícula y los que no lo harán. El potencial medido en este límite se denomina **potencial zeta**, que es también el único potencial fácilmente cuantificable que utiliza las técnicas actuales.

Las nanopartículas aminofuncionalizadas descritas en este capítulo presentaron un potencial zeta comprendido entre +30 y +80 mV, medido en tampón PBS a pH 7,4 para proporcionar un entorno estable y mediciones comparativas de las diferentes muestras. (Figura 2.9). El valor positivo del potencial zeta se corresponde con la presencia de los grupos aminos presentes en la superficie de las nanopartículas. La importancia del potencial zeta se basa en su simple determinación a través de la medición de la movilidad electroforética y su valor para la predicción de la estabilidad de la suspensión. Como regla general, los potenciales zeta superiores a ± 18 mV dan suspensiones reticulares poliméricas estables²²⁰. Por lo que, de acuerdo con esta regla, el potencial zeta determinado fue mayor por lo que las partículas formaron una dispersión estable.

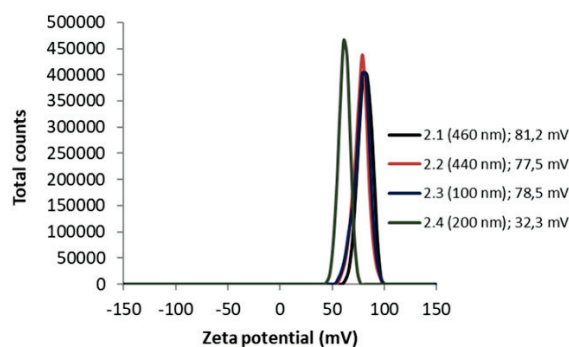


Figura 2.9. Potencial zeta de las nanopartículas sintetizadas. El eje Y indica la cantidad de eventos que presenta un potencial zeta determinado.

Adicionalmente, la medida de potencial zeta se emplea en este trabajo de investigación para monitorizar la eficiencia de los distintos pasos de multifuncionalización de estas nanopartículas llevados a cabo mediante la medida de las variaciones de potencial zeta²²¹. La determinación de zeta potencial de cada nanopartícula multifuncionalizada será descrita en cada sección correspondiente.

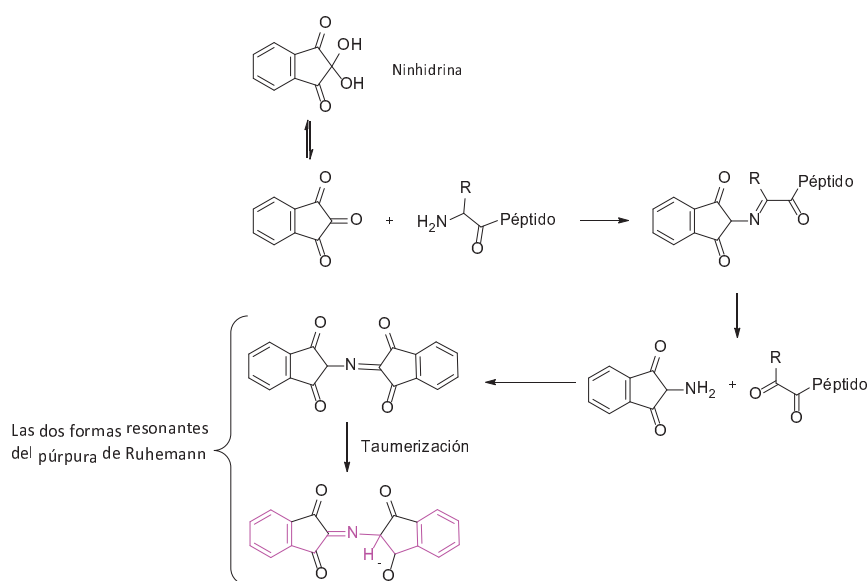
2.2.2.2.2. Cuantificación de los grupos aminos

En este trabajo de investigación, se usaron métodos clásicos utilizados para la determinación de grupos aminos primarios libres sobre resinas de poliestireno en la síntesis en fase sólida, como son los test de ninhidrina²²² y de Fmoc²²³.

Test de ninhidrina

El test de ninhidrina es un test rápido y cuantitativo para la determinación de grupos aminos primarios libres sobre la resina. La cantidad de grupos aminos primarios libres pueden ser fácilmente detectados y cuantificados por la reacción con ninhidrina. Se realizó el test de ninhidrina cuantitativo al equivalente de 3 mg de nanopartículas secas (2.1, 2.2, 2.3, 2.4). Una vez centrifugadas, las nanopartículas fueron lavadas con una solución acuosa de etanol al 70% y la absorción fue medida a 570 nm. La cantidad de grupos aminos primarios sobre las nanopartículas que se calcularon con este método apareció en un rango comprendido entre 15 $\mu\text{mol/g}$ y 200 $\mu\text{mol/g}$ dependiendo de la cantidad de monómero amino funcionalizado utilizado y la técnica de polimerización aplicada. Los valores obtenidos se recogen en la **Tabla 2.2**.

El test de ninhidrina también conocido como el test de Kaiser, fue desarrollado por primera vez por Moore y Stein²²⁴, siendo adaptado por Kaiser²²⁵ para la síntesis química en fase sólida y finalmente optimizado por Sarin²²², que diseñó las condiciones para el test. Como muestra el **Esquema 2.5**, la ninhidrina reacciona con el amino primario de cualquier sustancia dando lugar a un compuesto en solución de color púrpura (púrpura de Ruhemann). Este compuesto puede ser cuantificado espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de la solución 570 nm usando la luz Vis/UV.



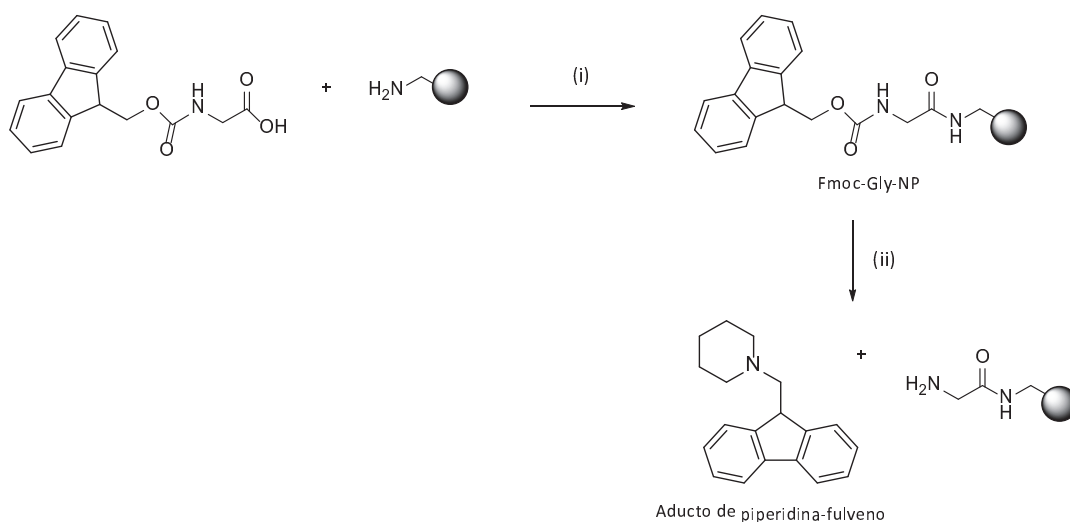
Esquema 2.5. Test de ninhidrina. Formación del color púrpura de Ruhemann.

Test Fmoc

El test Fmoc es un test colorimétrico para cuantificar los grupos aminos que se encuentran protegidos por el grupo protector Fmoc (9H-fluoren-9-il-metoxicarbonilo). Por ello, para saber el número de aminos primarios que tienen las nanopartículas se hace primeramente la protección de estos grupos amino con residuos con Fmoc y posteriormente se mide la cantidad del aducto de piperidina-dibenzofulveno que es liberado durante la desprotección. La cantidad de aducto liberado se cuantifica espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de la solución a 302 nm usando luz Vis/UV²²³ y un coeficiente de extinción de 7800 .

La determinación de la carga superficial de las nanopartículas sintetizadas previamente (2.1, 2.2, 2.3, 2.4) se llevó a cabo mediante el test Fmoc. Para ello se realizó primero la conjugación con Fmoc-Glicina-OH usando un exceso de este amino ácido (15 equivalentes) para asegurar la conjugación completa, posteriormente, se llevó a cabo la desprotección del grupo protector Fmoc mediante un tratamiento triple con el 20% de piperidina en dimetilformamida (DMF) (**Esquema 2.6**). El sobrenadante resultante se unió y se midió el aducto de piperidina dibenzofulveno por espectofotometría a 302 nm usando un coeficiente de extinción de 7800. Los resultados obtenidos se recogen en la

Tabla 2.2.



Reactivos y condiciones. (i) Fmoc-Gly-OH (15 eq), Oxima (15 eq) DIC (15 eq), DMF, 2 h, 60 °C; (ii) 20% piperidina, DMF. 3 x 20 min.

Esquema 2.6. Test Fmoc realizado con Fmoc-Gly-NPs sintetizadas utilizando una unidad de Fmoc-Gly-OH.

Tabla 2.2. Carga superficial de las NPs sintetizadas obtenidas mediante el test de ninhidrina y test Fmoc.

NPs	Carga superficial $\mu\text{mol/g}$ (Test ninhidrina)	Carga superficial $\mu\text{mol/g}$ (Test Fmoc)
2.1	57	54
2.2	69	60
2.3	93	110,3
2.4	74	80

Los resultados obtenidos con ambos métodos muestran que son equivalentes para la determinación de la carga de grupos aminos para las nanopartículas de poliestireno. Por lo que a lo largo de esta tesis doctoral utilizaremos el test Fmoc para la cuantificación de los grupos aminos ya que su determinación experimental es más rápida e igualmente eficaz que el test de ninhidrina. Por lo tanto, el test de ninhidrina se use cualitativamente para monitorizar la eficacia de las conjugaciones.

2.2.2.3. Estabilidad

La estabilidad hace referencia a la conservación de las propiedades durante un período de tiempo tras la síntesis de las nanopartículas poliméricas conjugadas. La estabilidad de las nanopartículas puede verse afectada por uno o más factores, como la temperatura, humedad, pH, tamaño de partícula, exposición a diferentes tipos de ionización y radiación no ionizante, degradación enzimática e incluso la presencia de impurezas²¹⁵.

La estabilidad, a corto y largo plazo, dicta la vida útil de la formulación del polímero. Se debe de examinar las condiciones de almacenamiento como disolventes, temperatura, pH y forma (por ejemplo, en solución, polvo liofilizado, congelado). Por ejemplo, la congelación y / o liofilización de la muestra puede comprometer la integridad de la nanopartícula. Ciertos disolventes o tampones pueden causar la precipitación de nanopartículas o liberación prematura de la droga.

Es importante tener en cuenta que el destino final del conjugado es la traslación clínica por lo que es necesario establecer que parámetros se deben de evaluar tras un periodo de almacenamiento o reconstitución del propio conjugado. Por ejemplo, la medición del tamaño se puede utilizar para estudiar los efectos de la liofilización, pero sería insensible a la carga y liberación del fármaco. Un análisis más completo debería incluir tanto el

tamaño como la carga del fármaco antes y después del proceso de liofilización. Aunque el tamaño, la carga del fármaco y la liberación del fármaco son parámetros importantes y recomendados para evaluar la estabilidad a corto y largo plazo, idealmente, también debería de incluirse parámetros que tengan un efecto directo en un resultado biológico. Por ejemplo, el potencial zeta de las nanopartículas se puede controlar para evitar *in vivo* la posible activación del complemento²²⁶.

La estabilidad de las nanopartículas sintetizadas se midió evaluando el tamaño mediante DLS y potencial zeta de las nanopartículas sintetizadas en un intervalo de 6 meses conservadas a dos temperaturas diferentes, 4°C y temperatura ambiente. Los resultados obtenidos muestran que las nanopartículas sintetizadas son estables a lo largo del tiempo. Como ejemplo representativo, se presentan resultados obtenidos para las nanopartículas **2.2** de 440 nm de tamaño, La **Tabla 2.3** muestra los datos obtenidos al mes, tres y seis meses observándose la estabilidad de la suspensión en las dos temperaturas de almacenaje.

Tabla 2.3. Valores del tamaño, índice de polidispersidad y potencial zeta de las nanopartículas **2.2** (440 nm) medidos a diferentes tiempos a 4 y 25°C.

2.2 (4°C)	Media Diámetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
1 mes	440,6 ± 1,82	0,038	75,4 ± 0,3
3 meses	436,1 ± 1,17	0,017	71,9 ± 0,23
6 meses	445 ± 1,65	0,013	73,6 ± 0,6
Temperatura ambiente			
1 mes	438,2 ± 0,92	0,015	75,6 ± 0,7
3 meses	447,1 ± 1,4	0,018	77,9 ± 0,3
6 meses	448,2 ± 1,8	0,011	77,6 ± 0,6

La estabilidad del resto de formulaciones realizadas correspondientes a las diferentes moléculas conjugadas como fluoróforos, proteínas o fármacos se mostrará en los capítulos correspondientes. Asimismo, es importante tener en cuenta que la propia naturaleza de la biomolécula conjugada a la nanopartícula determinará el grado de conservación de las mismas, siendo el almacenamiento a 4 °C el utilizado en la mayoría de los casos.

2.2.2.4. Consistencia entre lotes

Para llevar a cabo una traslación del nanosistema preparado, un punto clave requerido por la industria farmacéutica es la consistencia entre lotes. Por ello, se llevó a cabo la evaluación de dicha consistencia en la síntesis de estas nanopartículas. La síntesis de las nanopartículas 2.1 de 460 nm de tamaño se realizó en el carrusel Radley obteniéndose al final del proceso diferentes lotes con las mismas características. La **Tabla 2.4** muestra algunos ejemplos de los valores del tamaño y el potencial zeta de varios lotes de nanopartículas **2.1**, reflejando la consistencia conseguida en el proceso. Estos resultados aseguran la consistencia entre lotes de estas partículas poliméricas.

Tabla 2.4. Valores del tamaño (media), el índice de polidispersidad y potencial zeta de los diferentes lotes de NPs 2.1 sintetizadas.

NPs	Media Diámetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
2.1_1	460 ± 0,4	0,042	81,2 ± 0,1
2.1_2	458,2 ± 0,2	0,051	79,5 ± 1,4
2.1_3	462,3 ± 1	0,1	78,1 ± 0,6
2.1_4	453,6 ± 1,36	0,085	79,7 ± 1,4

2.2.3. Caracterización in vitro.

Los resultados previos de nuestro grupo de investigación mostraron que las nanopartículas sintetizadas y funcionalizadas pueden ser internalizadas por la mayoría de las líneas celulares estudiadas y que no presentan ningún efecto perjudicial sobre la viabilidad celular (capítulo 1, apartado 1.4). Para llevar a cabo la caracterización in vitro de las nanopartículas sintetizadas se ha evaluado la citotoxicidad de las nanopartículas mediante espectrofotometría por luz UV/Vis y la formación de la corona proteica. La evaluación de la internalización celular mediante microscopía láser confocal y citometría de flujo conlleva el marcaje fluorescente de las nanopartículas para su análisis y se realizará en los capítulos siguientes, siendo las técnicas más empleadas en este proyecto de investigación por su importancia para la caracterización in vitro.

2.2.3.1. Citotoxicidad celular

Los estudios de viabilidad celular se llevaron a cabo para evaluar los efectos de las nanopartículas sintetizadas y funcionalizadas en las líneas celulares ensayadas. La citotoxicidad de las nanopartículas se ha estudiado utilizando la resazurina, método

colorimétrico y cuantitativo que determina la viabilidad celular. Se evaluó la citotoxicidad de las nanopartículas amino funcionalizadas sintetizadas (2.2, 2.3, 2.4 y 2.5) en tres líneas celulares cancerígenas utilizadas en este proyecto de investigación, dos de ellas se corresponden con cáncer de pulmón (A549 y H520) y la tercera con cáncer de mama (MDA MB 231). Las células se incubaron durante 72 horas con diferentes concentraciones de nanopartículas, que se corresponden con concentraciones utilizadas comúnmente en aplicaciones biomédicas, siendo la concentración más alta de 40000 NPs/célula. Los resultados se mostraron en forma de viabilidad celular. La **Figura 2.10** muestra valores superiores al 99% de viabilidad celular en todos los casos ensayados.

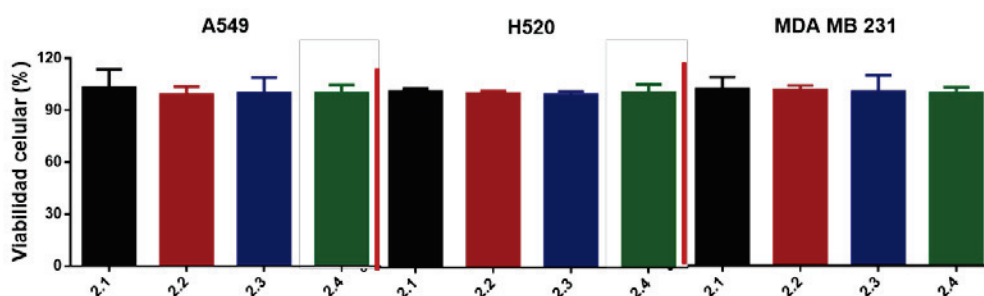
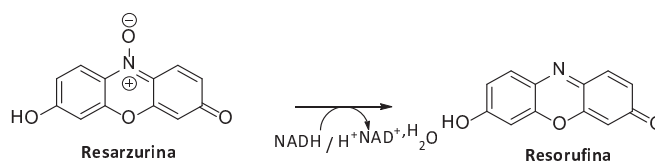


Figura 2.10. Ensayos de citotoxicidad. Las barras muestran la viabilidad celular de las nanopartículas amino funcionalizadas sintetizadas en tres líneas celulares de cáncer, A549 y H520 de cáncer de pulmón, y MDA MB 231 de cáncer de mama. Los resultados se han expresado con los valores de la media \pm SEM.

El ensayo de la resazurina se basa en la capacidad de las células viables de llevar a cabo la reducción de la resazurina (sal sódica de 10-óxido de 7-hidroxi-3-hidro-fenoxacin-3-ona1) a resorufina y dihidroresorufina (**Esquema 2.7**), que son ambas fluorescentes. La conversión es intracelular y está catalizada por las oxidoreductasas mitocondriales, microsomales y citosólicas²²⁷. La cantidad de resorufina producida es proporcional al número de células viable y puede ser cuantificada utilizando un fluorómetro con capacidad para leer microplacas equipado con filtros de excitación y emisión de 560 nm y 590 nm, respectivamente.



Esquema 2.7. Reducción de la resazurina a resorufina.

En la sección correspondiente de cada capítulo se muestra la viabilidad celular de los nanosistemas desarrollados en esta tesis doctoral.

2.2.3.2. Formación de la corona proteica

Como se describe en el apartado 1.2.3. del capítulo 1, la formación de la corona proteica puede alterar el tamaño de la nanopartícula, la estabilidad y propiedades de superficie de las nanopartículas así como disminuir la capacidad de orientación cuando se encuentran decoradas con ligandos orientadores¹⁵⁵. Para verificar la formación de la corona proteica sobre las nanopartículas de poliestireno amino funcionalizadas (**2.1**) y sobre nanopartículas funcionalizadas con diferentes biomoléculas como péptidos y anticuerpos se realizaron una serie de ensayos preliminares.

El análisis de la formación de corona en las nanopartículas amino funcionalizadas (**2.1**) se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, del inglés “*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*”). En primer lugar, se analizó la influencia del medio de cultivo (DMEM y RPMI con y sin suero). Tras la incubación de las nanopartículas en el medio de cultivo durante 24 y 3 horas a 37 ° C y los lavados correspondientes con PBS para eliminar las proteínas no adsorbidas sobre las mismas, se agregó un detergente (SDS) a los conjugados de proteína-NP para solubilizar las proteínas que formaban la corona proteica. Esta mezcla con las proteínas de la corona proteica se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida para electroforesis. Y, posteriormente, se tiñó con una solución de azul de Coomassie que puso de manifiesto las proteínas presentes. Los resultados mostraron que la incubación con medios de cultivo sin suero evita la formación de corona proteica y que este efecto aumenta con el tiempo de exposición (**Figura 2.11 a**). En segundo lugar, se llevo a cabo un estudio comparativo de la influencia de nanopartículas decoradas con diferentes ligandos de naturaleza proteica (anticuerpo y péptido) en la formación de la corona. En la **Figura 2.11 b** se puede observar que la formación de corona disminuyó en las nanopartículas decoradas con un anticuerpo (**5.9**) (ver capítulo 5, apartado 5.2.1.1.1) y un péptido (**6.7**) (ver capítulo 6, apartado 5.2.1.1.1), en comparación con las nanopartículas amino funcionalizadas cuando se incubaron con DMEM suplementado con suero.

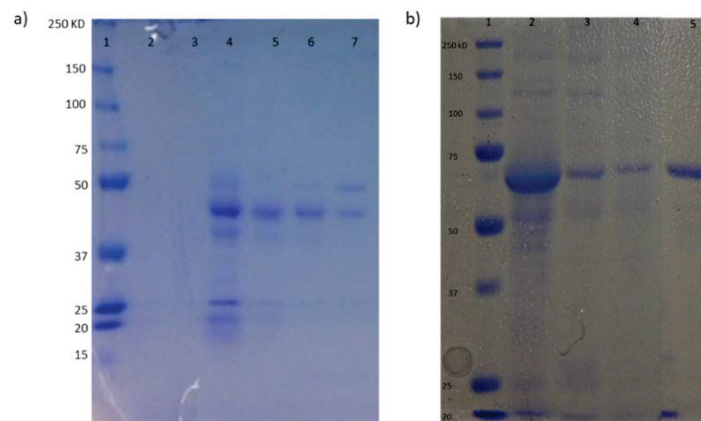


Figura 2.11. Electroforesis SDS-PAGE para la comprobación de la corona proteica. a) 1. Marcador de proteínas; 2. RPMI sin suero, 24h; 3. DMEM sin suero, 24h; 4. RPMI suplementado con FBS, glutamina y antibiótico 24h; 5. DMEM suplementado 24h; 6. RPMI suplementado, 3h; 7. DMEM suplementado, 3h; b) 1. Marcador de proteínas; 2. **2.1**; 3. Ac-NP (**5.9**); 4. Péptido-NP (**6.7**); 5. BSA

Es importante destacar que estos resultados sobre la formación de la corona proteica mediante SDS-PAGE son preliminares. Se deberá realizar una caracterización más detallada empleando otras técnicas como la movilidad electroforética en función del pH, la estabilidad coloidal, adsorción de proteínas mediante calorimetría isoterma de titulación y espectrofotometría de masas, entre otras, para estudiar en profundidad la corona proteica formada sobre estas nanopartículas²²⁸.

2.3. Nanopartículas multifuncionalizadas

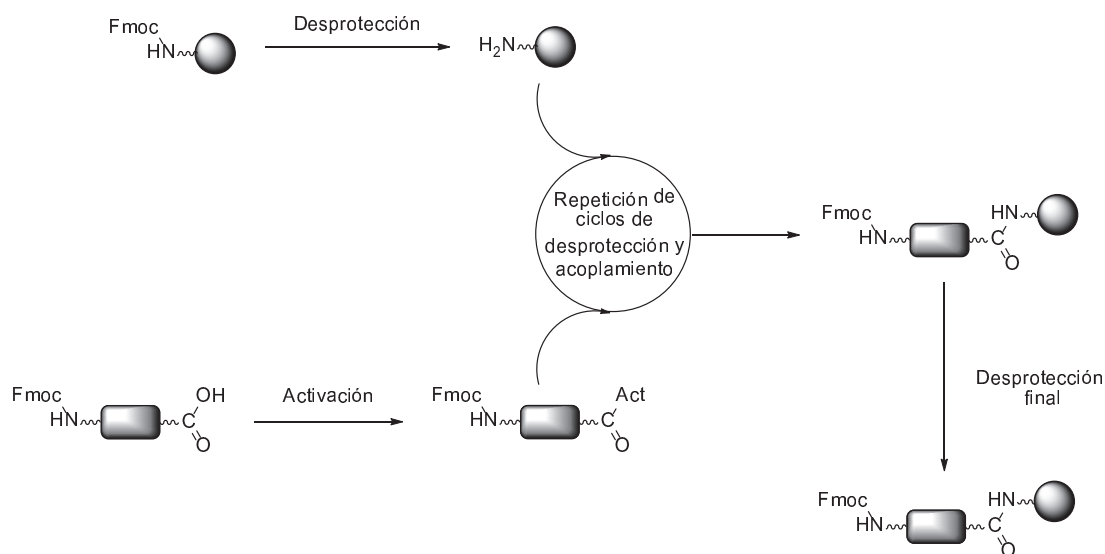
Las nanopartículas poliméricas han ganado una posición prominente en el área de la biomedicina debido a su amplia variedad de aplicaciones, como, por ejemplo, transportadores de sensores intracelulares o herramientas para la liberación celular. Es crucial en la preparación de estos nanodispositivos tanto la unión controlada como la visualización de las moléculas bioactivas.

Dependiendo del uso particular de las nanopartículas, se han aplicado diferentes estrategias químicas para unir los cargos a las partículas poliméricas. En esta sección se describen algunos protocolos de funcionalización basados en la síntesis en fase sólida.

2.3.1. Funcionalización de las nanopartículas

La estrategia elegida consiste en la utilización de protocolos de conjugación empleados de forma estándar en la síntesis de fase sólida, basados en etapas simples de unión y desprotección, donde la forma más común de conjugar biomoléculas es a través de

grupos amino o carboxilo y la formación de enlaces amida (**Esquema 2.8**). El grupo funcional ácido se debe activar para formar un éster activo de tal forma que el grupo carbonilo pueda sufrir un ataque nucleofílico por el grupo amino para producir el enlace amida. Los agentes de activación clásicos son carbodimidas como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)²²⁹ que puede usarse en condiciones acuosas, y diisopropil-carbodiimida (DIC) que se pueden usar en combinación con acetato de etil 2-ciano-2-(hidroxiimino) (oxima)²³⁰ si el disolvente es orgánico, normalmente se utiliza dimetil formamida (DMF).



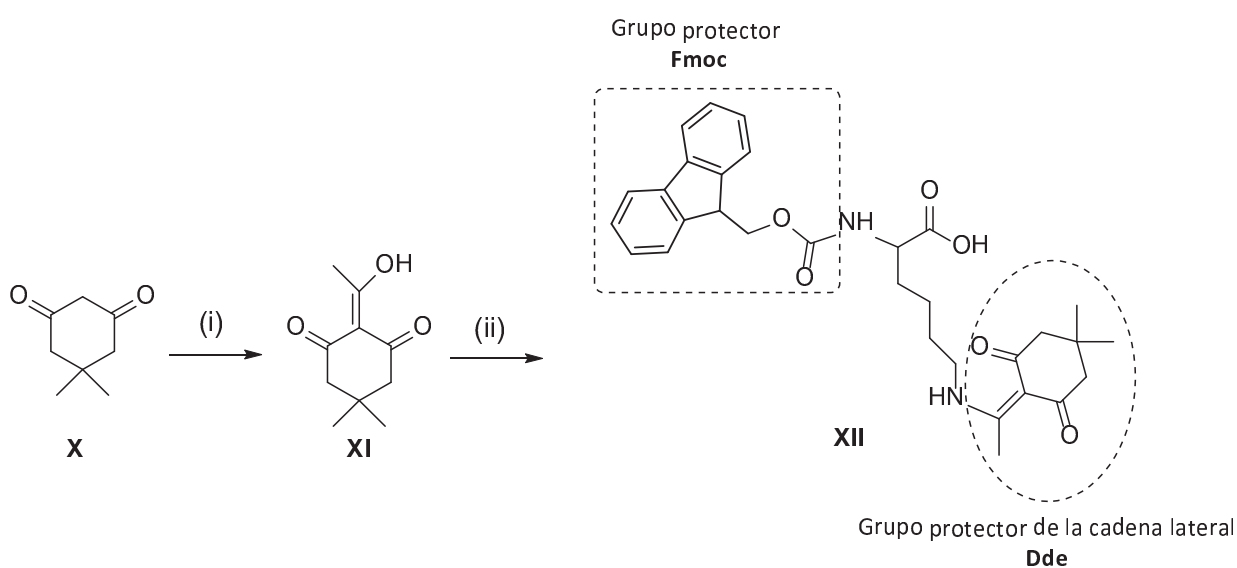
Esquema 2.8. Pasos básicos de la química Fmoc

2.3.2. Doble funcionalización de las nanopartículas: Ortogonalidad Fmoc-Dde.

La funcionalización dual de las nanopartículas mediante la formación de enlaces amida, entre otros, permite la unión controlada de dos moléculas diferentes en la misma partícula y requiere reacciones ortogonales compatibles entre sí.

La ortogonalidad entre grupos protectores es esencial para diseñar una estrategia en fase sólida. Para la síntesis controlada de nuestra estructura, tanto el grupo *N*- α -amino terminal como el grupo amino de la cadena lateral de un derivado de lisina tendrían que estar bloqueados con grupos protectores ortogonales (**Esquema 2.9**). La estrategia clásica se basa en la desprotección básica lábil del grupo N-Fmoc que protege el grupo *N*- α -amino terminal y la desprotección ácida lábil del grupo protector de la cadena lateral (por ejemplo, Boc- *tert*-butiloxycarbonilo), nuestro protocolo modificado se basa en el uso de un grupo protector nucleofílico lábil en la cadena lateral (etil 1-(4,4-dimetil-

2,6-dioxociclohexiliden), Dde)²³¹. El Dde ha sido utilizado como grupo protector de aminas primarias en química en fase sólida, pero en las condiciones estándar para la desprotección (3% v/v de hidracina en DMF)²³² también se escinde el Fmoc. Sin embargo, se ha demostrado la ortogonalidad completa entre el Fmoc y el Dde utilizando hidrocloreuro de hidroxilamina e imidazol en N-metil-2-pirrolidona (NMP) para eliminar el Dde sin desproteger el Fmoc²³³. De esta forma, la hidracina da lugar a una adición de Michael a un pH inferior a 7, que evita al mismo tiempo que el grupo Fmoc se vea afectado. La aplicación de esta metodología proporciona una estrategia eficaz para bifuncionalizar las nanopartículas.



Esquema 2.9. Síntesis de Fmoc-Lys-OH. Funcionalización dual. *Reactivos y condiciones:* (i) DCC, DMAP, CH₃COH, 36h, 51,22%; (ii) Fmoc-Lys-OH, TFA 80,1%), EtOH reflujo, 60 h, 63,27%, 92% en general.

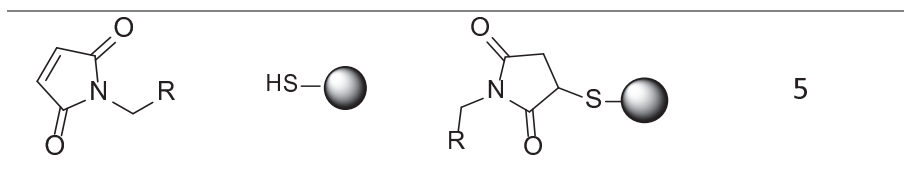
2.3.3. Multifuncionalización de las nanopartículas

La multifuncionalización permite la producción de nanopartículas capaces de transportar dos o más moléculas simultáneamente (por ejemplo, una molécula biológicamente relevante y un fluoróforo para su seguimiento). Subsecuentemente, la ruptura selectiva del Fmoc o el Dde (Figura 2.10) permite la unión directa de la molécula de manera que su posición pueda ser conocida y facilita la introducción de una estructura que pueda ser acoplada fácilmente a las nanopartículas y elongarla utilizando los protocolos del Fmoc de una manera dirigida.

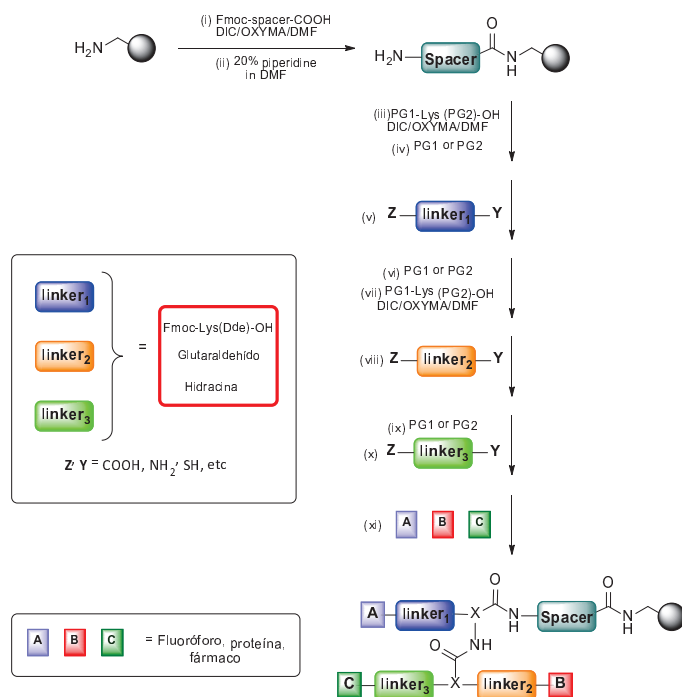
Una de las características más importantes de la multifuncionalización es la conjugación controlada de varias moléculas bioactivas en la misma partícula²³⁴. Esto requiere condiciones de acoplamiento bioortogonal, es decir, la capacidad de llevar a cabo reacciones quimioselectivas en presencia de grupos funcionales como los grupos amino, carboxilo o tiol en condiciones fisiológicas. La forma más común de conjugar biomoléculas es a través de grupos amino o carboxilo y la formación de enlaces amida, como se ha explicado anteriormente. Aunque son muchas las conjugaciones que pueden realizarse, como, por ejemplo, un ácido puede activarse mediante la formación de un succinimidil éster para reaccionar directamente con las aminas libres. Otra forma de bioconjugación es mediante la reacción de grupos cetona con hidracina dando lugar a enlaces de hidrazona estables²³⁵. Otra reacción bien conocida en el campo de la bioconjugación es la generación de tioéteres a partir de maleimidas y tioles²³⁶. Además, las nanopartículas tiolfuncionalizadas se pueden unir mediante puentes de disulfuro a compuestos bioactivos que tenga tioles libres dando lugar a un enlace disulfuro escindible intracelularmente²³⁷ (**Tabla 2.5**).

Tabla 2.5. Representación esquemática de las conjugaciones más frecuentes para la multifuncionalización de las nanopartículas

Grupos funcionales	Nanopartículas	Conjugación	Capítulos
R-COOH	$\text{H}_2\text{N}-\text{NP}$	$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{NP}$	3, 4, 5, 6
R-NH ₂	$\text{HOOC}-\text{NP}$	$\text{R}-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NP}$	4, 5, 6
NH ₂ -NH ₂	$\text{R}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NP}$	$\text{H}_2\text{N}-\text{N}=\text{C}-\text{H}-\text{NP}$	4, 5, 6
R-SH	$\text{HS}-\text{NP}$	$\text{R}-\text{S}-\text{S}-\text{NP}$	5



La multifuncionalización permite construir nanotransportadores que llevan diferentes moléculas sensibles a múltiples vías de señalización. El objetivo principal de estos nanovehículos sería superar la complejidad del microambiente tumoral a través de la coordinación perfecta de mecanismos y funcionalidades de respuesta múltiple²³⁸. La llamada “multifuncionalidad” puede conseguirse de muchas maneras diferentes, para lo cual los ejemplos típicos incluyen imágenes multimodales, administración simultánea de dos o más fármacos contra el cáncer complementarios, simultaneando la implementación de la quimioterapia con otros tratamientos de apoyo, como la radiación, la fototerapia y las terapias fotodinámicas, y la combinación de capacidades diagnósticas y terapéuticas. El **Esquema 2.10** muestra un ejemplo de multifuncionalización de nanopartículas utilizado en este proyecto de investigación, donde se unen tres *linkers* diferentes a las nanopartículas mediante estrategias ortogonales que permitirán, posteriormente, la conjugación de distintas biomoléculas.



Esquema 2.10. Multifuncionalización. Estrategia general de la síntesis en fase sólida aplicada a las nanopartículas.

2.4. Discusión

En este capítulo, se ha hecho una breve descripción de los diferentes métodos para la preparación y caracterización de las nanopartículas. Se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de poblaciones monodispersas de las nanopartículas reticuladas de diferentes tamaños (desde 100 nm hasta 500 nm). Es importante destacar el hecho de sintetizar nanopartículas con consistencia entre lotes siendo esto de máxima relevancia para su posterior y potencial traslación del nanosistema.

Las distintas propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, como el tamaño, propiedades de la superficie, forma, composición y estabilidad son críticamente relevantes para las interacciones fisiológicas particulares que se establecen entre las nanopartículas y el medio biológico²¹⁵. Estas interacciones fisiológicas pueden proporcionar beneficios en las aplicaciones médicas, incluyendo mejoras en la eficacia, reducción de los efectos secundarios, prevención y tratamiento terapéutico^{239,240}. La caracterización fisicoquímica de las nanopartículas sintetizadas nos muestra que son de poblaciones monodispersas y estables a lo largo del tiempo. Se ha demostrado que estas nanopartículas no afectan la viabilidad celular incluso cuando se lleva a cabo la incubación con concentraciones elevadas de nanopartículas. Estudios preliminares de análisis de la corona proteica formada en contacto con medios de cultivo muestran que un componente mayoritario de dicha corona es la proteína BSA. Deberá realizarse un estudio mas detallado de dicho efecto empleando otras técnicas disponibles para confirmar este resultado y poder diseñar futuras estrategias de recubrimiento para evitar la formación de la corona proteica.

Gracias a la estabilidad de las nanopartículas de poliestireno en disolventes orgánicos, proporcionada por su estructura reticulada, se pueden llevar a cabo fácilmente numerosas reacciones químicas con estos materiales y se ha introducido brevemente la aplicación de protocolos de fase sólida estándar para la multifuncionalación de las nanopartículas basados en la ortogonalidad entre grupos protectores.

Capítulo III

Capítulo III. Desarrollo de un método basado en espectrofotometría para la cuantificación de nanopartículas por célula. Un parámetro clave para evaluar los ensayos celulares basados en nanopartículas.

3.1. Cuantificación de nanopartículas

En las últimas décadas, la nanotecnología se ha convertido en una herramienta esencial en el área biomédica y biotecnológica con un gran número de productos basados en nanopartículas que podemos encontrar en el mercado²⁴¹. Las nanopartículas hechas de un amplio rango de materiales tanto orgánicos como inorgánicos se han utilizado en diferentes aplicaciones biológicas y médicas como el diagnóstico, obtención de imágenes no invasivas y la liberación de fármacos, por mencionar algunos²⁴²⁻²⁴⁵. Por lo tanto, las nanopartículas “ingenierizadas” (eNPs) han cobrado gran importancia en varios campos incluyendo el de los fármacos dirigidos, sistemas de liberación genética, biosensores y tratamiento de cáncer^{181,183,184,187,190,192,246-249}. En particular, las eNPs de poliestireno presentan un uso muy extendido como sistemas para aplicaciones *in vitro* como separación, marcaje y liberación celular^{176,250}.

A medida que aumenta el número de eNP utilizadas, la pregunta sobre cuántas nanopartículas interactúan con las células y pueden ser internalizadas es cada vez más importante para cualquier aplicación biomédica. Por un lado, la dosis administrada de nanopartículas a las células diana es un parámetro clave en la evaluación de su eficacia para realizar la acción deseada (por ejemplo, liberar la sustancia terapéutica o inducir un efecto específico). Por otro lado, la evaluación de las nanopartículas intracelulares también es crucial desde el punto de vista de la seguridad ya que las nanopartículas pueden entrar accidentalmente en contacto involuntario con el resto de células.

La comunidad científica está de acuerdo en que el método de elección para la cuantificación de la internalización de las nanopartículas depende principalmente de la investigación en curso, los dispositivos analíticos disponibles, así como el tipo de nanopartículas utilizadas. En los últimos años, han surgido diversas técnicas de vanguardia que pueden cuantificar las nanopartículas en función de sus características distintivas, por ejemplo, composición química, propiedades ópticas o propiedades magnéticas. En general, la cuantificación se describe como el acto de dar un valor

numérico a una medición, incluido la calibración de un sistema (método e instrumento) y la formación de una escala de calibración²⁵¹. Desde el punto de vista de la química analítica, el término cuantificación se puede explicar cómo el proceso de determinación de una cantidad de (un) analito (s), por ejemplo - especie química, presente en una muestra. En biología celular, la cuantificación a menudo se describe con los atributos de la medición en sí (por ejemplo, exactitud y precisión), mientras que en la comunidad médica y farmacéutica el término cuantificación generalmente se correlaciona con el proceso de adquisición de un fármaco.

3.1.1. Requisitos necesarios para la cuantificación celular de nanopartículas

En primer lugar, la detección inequívoca de nanopartículas en una célula es un requisito previo para su posterior cuantificación²⁵². Pero al mismo tiempo, esta detección constituye un reto debido al tamaño nanométrico de la partícula y al hecho de que en algunos casos solo un porcentaje pequeño de nanopartículas puede estar asociado con las células, rayando los límites de sensibilidad o resolución de algunas de las técnicas. Es importante destacar que la detección de las nanopartículas en el entorno biológicamente complejo es razonablemente necesaria para distinguir las partículas de otras partes celulares de tamaños similares, como, por ejemplo, los ribosomas. Una vez realizada la cuantificación, los valores obtenidos se traducen en diferentes relaciones, por ejemplo, masa de la NP, número de NPs o superficie de la NP por volumen de referencia que puede ser una población celular, número o unidad de volumen (μm^3). En este contexto, el resultado de una técnica cuantitativa depende de la calidad de los parámetros, entre otros, la exactitud, precisión, sensibilidad y resolución. Para empezar, la exactitud de la medición de un dispositivo es el rango del sesgo estadístico y como de cerca se está del valor real, mientras que la precisión indica la reproducibilidad y la repetitividad de la medición. La precisión también refleja la heterogeneidad de un objeto y puede estimarse de manera confiable mediante experimentos repetidos. Tanto la sensibilidad como la resolución, que definen la cantidad más pequeña y el objeto más pequeño que se puede detectar, respectivamente, dependen en gran medida del método utilizado. Estos parámetros del método se manifiestan en la calidad general y el rendimiento de las herramientas analíticas cuantitativas respectivas. Sin embargo, también hay otros criterios que son importantes para la calidad de estas técnicas,

incluida la validación de la medición con muestras estándar. Todos estos criterios están en concordancia con los requisitos de la FDA y la EMA para el desarrollo general y el establecimiento de métodos bioanalíticos²⁵³ incluyendo una descripción detallada de la tecnología analítica, analito diana (NP) y la muestra (tipo de célula).

En segundo lugar, otro requisito clave para la cuantificación de nanopartículas por célula es reflejar la variabilidad biológica. Esto no solo se refiere a las diferencias obvias entre los diversos tipos celulares existentes (por ejemplo, células vegetales frente a células de mamíferos, células procariotas frente a eucariotas), sino también sobre las posibles diferencias en la internalización de las nanopartículas en una población celular debido, por ejemplo, a diferentes fases del ciclo celular. Se han observado grandes diferencias en la internalización celular *in vitro* de nanopartículas utilizando células del epitelio alveolar humano²⁵⁴ y la vejiga urinaria humana²⁵⁵. Esta es la razón por la cual presentar un tamaño de muestra de células representativo como requisito previo es de suma importancia para producir valores de medición exactos y precisos.

Finalmente, una cuantificación eficiente y confiable implica un muestreo imparcial, es decir, puntos de medición elegidos al azar en la muestra, lo que significa que cualquier objeto en la población debe tener las mismas posibilidades de ser medido.

3.1.2. Técnicas de cuantificación de nanopartículas

Son varias las técnicas analíticas que pueden utilizarse pero principalmente incluyen métodos espectroscópicos y de imagen. Las técnicas espectroscópicas basadas en plasma de acoplamiento inductivo (ICP, del inglés "*inductively coupled plasma*"), acoplado a la espectrometría de emisión óptica (ICP-OES, del inglés "*optical emission spectrometry*")²⁵⁶ para medida de la radiación emitida, así como la espectrometría de masas (ICP-MS, del inglés "*mass spectrometry*")¹⁷⁵ para la medida de las relaciones masa/carga de los iones producidos, puede proporcionar una composición elemental cuantitativa y aplicarse a una amplia gama de nanopartículas metálicas o puntos cuánticos²⁵⁷. La principal ventaja de estas técnicas es que presenta un rango de detección muy sensible. Sin embargo, estos métodos no permiten la determinación de la masa de la nanopartícula en una sola célula, generalmente se refieren a una población celular, por lo que no se aconsejan para ensayos de cultivo celular²⁵⁸.

Las técnicas cuantitativas basadas en la fluorescencia proporcionan métodos altamente sensibles ya que solo se pueden detectar uno o varios fluorocromos de forma individual. Estas técnicas requieren una señal de fluorescencia de las nanopartículas como parte de las propiedades de las nanopartículas como los puntos cuánticos²⁵⁹ o mediante el marcaje de las mismas²⁶⁰. Estos tipos de nanopartículas se pueden detectar y cuantificar mediante espectroscopía de fluorescencia, citometría de flujo o técnicas de obtención de imágenes de fluorescencia. Sin embargo, los límites de resolución de algunos de estos métodos como la citometría de flujo no permiten detectar nanopartículas individuales. Aquí, la carga de nanopartícula por célula se expresa normalmente como un marcador indirecto como el número de los eventos o la intensidad de la señal asociada con la nanopartícula y esto también depende en gran medida de la resolución del detector.

En la citometría de flujo, las células individuales pasan un flujo constante en frente de una unidad de detección láser que recoge las señales fluorescentes de una sola célula en los detectores apropiados. La señal fluorescente integrada de las células individuales se mide por la dispersión lateral y se interpreta como nanopartículas que contienen células o células libres de nanopartículas. Es un método rápido para obtener la cantidad relativa de células cargadas y/o asociadas con nanopartículas marcadas fluorescentemente (o que poseen propiedades fluorescentes)^{260,261}.

En microscopía de fluorescencia, la cuantificación de los eventos se hace en base a imágenes digitales. Los eventos se pueden contar manualmente o mediante un análisis automatizado *in silico* siguiendo un proceso de segmentación de imágenes. Sin embargo, es necesario garantizar la distinción entre las nanopartículas y el material biológico, lo que significa que la señal derivada de la nanopartícula debe exceder el ruido inducido por autofluorescencia. Los métodos de cuantificación fluorescente no tienen en cuenta posibles blanqueamientos o atenuación de la señal fluorescente a concentraciones locales altas del fluorocromo y son fácilmente propensos a los artefactos que conducen a la cuantificación incorrecta. La característica común de todos los métodos basados en fluorescencia es el hecho de que la señal de fluorescencia no es absoluta porque la intensidad de la señal depende de la fuente de excitación, el número de fluoróforos por nanopartícula, el rendimiento cuántico del fluoróforo o de la propia nanopartícula y la sensibilidad del detector. Por lo tanto, las señales se comparan con

una muestra de control y se dan como valores relativos, es decir, resultados semicuantitativos. Por lo tanto, los métodos de fluorescencia no indican la masa ni el número de nanopartícula, pero permiten la comparación entre diferentes condiciones.

También se puede realizar la cuantificación de nanopartículas mediante técnicas de microscopía electrónica como SEM o TEM, obteniéndose información sobre el número de nanopartículas por célula, o bien, sobre la superficie de las nanopartículas que puede ser importante para explicar las interacciones de las nanopartículas con el medio biológico.

Por lo tanto, para correlacionar las eNPs con las respuestas biológicas sólidas y asegurarnos la reproductibilidad y significancia de los resultados es crucial un método preciso y fiable para cuantificar el número de nanopartículas utilizadas por ensayo. Sin embargo, en numerosos ensayos celulares con nanopartículas los parámetros que se utilizan normalmente son el número de células sembradas y el volumen (microlitros) de la suspensión de nanopartículas con un contenido sólido estimado (% p/v). Dado que este ensayo se adapta bien al modelo de colisión de partículas²⁶², la mejor manera de describir el protocolo utilizado en el mismo sería proporcionar el número de nanopartículas frente al número de células. Un parámetro de este tipo permite evaluar la actuación de las eNPs en diferentes líneas celulares.

La manera usual de determinar el número de nanopartículas por microlitro de suspensión se basa en la aplicación de una ecuación donde los valores del contenido sólido y el tamaño son absolutamente necesarios (**Ecuación 1**). Sin embargo, la preparación de eNPs requiere numerosos pasos de centrifugación con la consecuente pérdida de eNPs provocando una reducción inevitable del contenido sólido en cada uno de los pasos. Por lo tanto, este método se aplicaría al final de cada paso al permitir la cuantificación del número de nanopartículas por microlitro de suspensión, en lugar de referirse al contenido sólido calculado inicialmente (**Figura 3.1**). Esto es aún más relevante en la síntesis por pasos de las eNPs y en los estudios de *high-throughput*, ya que se realiza generalmente a pequeña escala, siendo impracticable la medida del contenido sólido. Consecuentemente, la pérdida de eNPs se traduce en una concentración desconocida de eNPs lo cual es un gran inconveniente en el desarrollo y

entendimiento de numerosos experimentos y es una cuestión muy importante para obtener resultados reproducibles en diferentes laboratorios y en diferentes ensayos.

$$N^{\circ} \text{ NPs/mL} = \frac{6 \times 10^{10} \times \text{Contenido Sólido (\%)} \times \rho_{\text{suspensión}}}{\pi \times \rho_{\text{partículas}} \times d^3}$$

Dónde:

Contenido Sólido = % en peso (g por 100 mL)

$$\rho_{\text{suspensión}} = \frac{100 \times \rho_{\text{partículas}}}{\text{Contenido Sólido (\%)} \times (1 - \rho_{\text{partículas}}) + (100 - \rho_{\text{partículas}})}$$

$\rho_{\text{partículas}} = 1 \text{ g/dm}^3$, para las partículas de poliestireno

Ecuación 1. Cálculo del número total de nanopartículas por microlitro de suspensión.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado un método práctico para estimar el número de nanopartículas de poliestireno por microlitro mediante la dispersión de la luz óptica utilizando espectrofotómetros convencionales y volúmenes pequeños. Este nuevo método está inspirado en el método nefelométrico común usado para estimar el número de bacterias en suspensión. Este método nos permite utilizar el número de eNPs añadidas por célula como un parámetro para ensayos celulares.

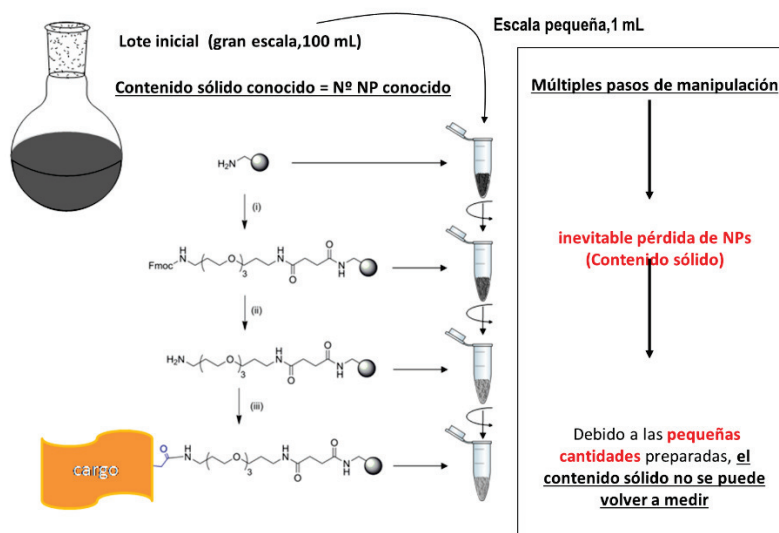


Figura 3.1. Representación esquemática de la pérdida de contenido sólido durante la funcionalización de las nanopartículas.

3.2. Resultados

3.2.1. Desarrollo de un método espectrofotométrico para cuantificar nanopartículas.

Hasta ahora, el número de nanopartículas sólo se ha tenido en cuenta en los experimentos de fagocitosis donde era importante conocer el número de nanopartículas fagocitadas por célula^{263,264}. Sin embargo, la necesidad de obtener unos resultados de internalización celular reproducibles utilizando eNPs sometidas a numerosos pasos para conjugarles diferentes grupos químicos y biológicos nos hizo desarrollar un método de aproximación para calcular el número de nanopartículas por microlitro. Basado en el principio nefelométrico, desarrollamos un método práctico para medir la turbidez de una suspensión de nanopartículas de poliestireno a una densidad óptica de 600 nm de longitud de onda (OD_{600} , del inglés “*optical density*”), según el método nefelométrico para contar bacterias. La luz que atraviesa la suspensión de nanopartículas se dispersa por los fenómenos de refracción, difracción y reflexión y la intensidad de la luz dispersada, que es proporcional al número de nanopartículas en la suspensión²⁶⁵, puede ser recogida por los espectrofotómetros convencionales (**Figura 3.2**).

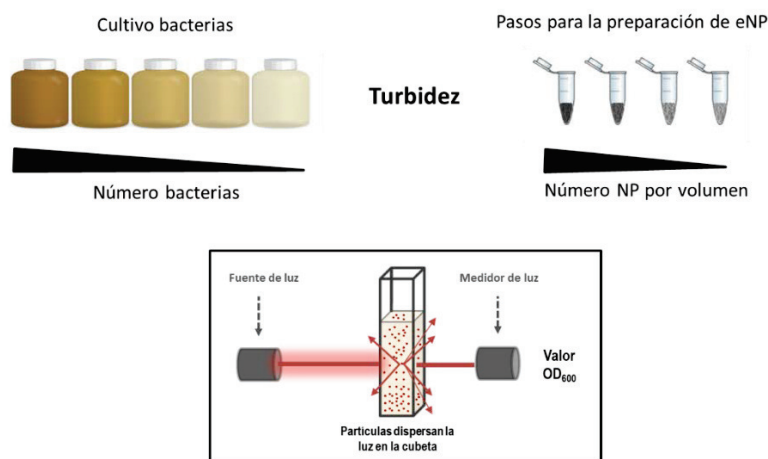


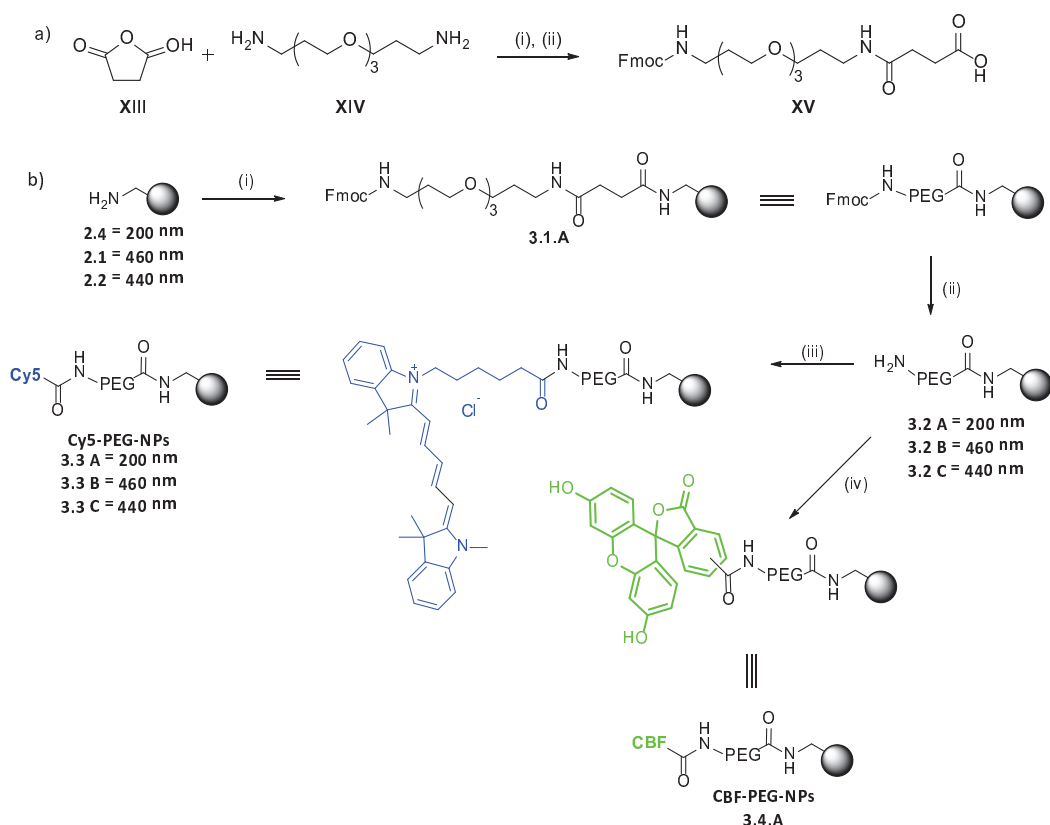
Figura 3.2. Desarrollo del método espectrofotométrico basado en el método nefelométrico.

3.2.1.1. Síntesis y funcionalización de las nanopartículas

El desarrollo del método espectrofotométrico requirió la síntesis de tres suspensiones de nanopartículas con tamaños diferentes. La síntesis de las nanopartículas de poliestireno amino funcionalizadas y reticuladas se realizó siguiendo el protocolo de polimerización por dispersión para obtener una población de nanopartículas de 460 nm

de tamaño (2.1.) (Capítulo 2, apartado 2.2.2.) y el protocolo de polimerización por emulsión libre de emulsionante para la obtención de nanopartículas de 100 (2.3) y 200 nm (2.4) (capítulo 2, apartado 2.2.3.). Las tres suspensiones de nanopartículas fueron monodispersas, con un contenido sólido del 2% cada una. Se calculó el número de nanopartículas por microlitro mediante la ecuación 1 y se obtuvieron valores que se correspondieron con $3,92 \times 10^8$ NP/ μ L para las NPs 2.1 y $3,82 \times 10^{10}$ y $4,77 \times 10^9$ NP/ μ L para las NPs 2.3 y 2.4, respectivamente.

La aplicación del método se demostró utilizando las nanopartículas amino metiladas 2.4 funcionalizadas con el fluoróforo cianina 5-NHS (Cy5) (3.3 A) y el fluoróforo fluoresceína (CBF) (3.4 A). Con este propósito, se llevaron a cabo una serie de acoplamiento como la conjugación con el espaciador Fmoc-PEG-OH (XV), que se sintetizó previamente como se detalla en el esquema 3.1a, obteniéndose el conjugado 3.1 A, seguido de la desprotección del grupo protector Fmoc (3.2 A) (Esquema 3.1b)) utilizando protocolos estándar de fase sólida de Fmoc partiendo de las nanopartículas de 200 nm 2.4.



Esquema 3.1. a) Síntesis del espaciador Fmoc-PEG-OH; b) Conjugación de los fluoróforos Cy5 y CBF a las nanopartículas PEGiladas (3.1) y desprotegidas (3.2). *Reactivos y condiciones:* a) (i) acetonitrilo, t.a., 3h; (ii) Fmoc-Osu, acetonitrilo, DIPEA, t.a., 12h, 65% total. b) (i) PEG (15 eq), Oxima (15 eq), DIC (15 eq),

DMF, 60 °C, 2h; (ii) 20% piperidina en DMF; (iii) Cy5-NHS (1 eq), DIPEA (0,1 eq), DMF, 25, 1400rpm, 15h; (iii) CBF (15 eq), Oxima (15 eq), DIC (15eq), DMF 60° C, 2 h.

3.2.1.1.1. Caracterización de las nanopartículas

La distribución del tamaño de las nanopartículas Cy5-PEG-NP (**3.3.A**) y CBF-PEG-NP (**3.4.A**) fue determinado cuantitativamente por DLS, obteniéndose un diámetro hidrodinámico de 221 nm con un PDI de 0,008 para las Cy5-PEG-NP (**3.3.A**) y de 221,5 nm con un PDI de 0,021 para las CBF-PEG-NP (**3.4.A**), demostrando que las nanopartículas son monodispersas. El potencial zeta fue -23,9 mV y x mV, respectivamente, valores que se corresponden con una suspensión estable, además el cambio del valor del potencial zeta de +32,3 a -23,9 mV proporciona la primera evidencia de la unión de los fluoróforos Cy5 y CBF (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1. Caracterización de las nanopartículas mediante DLS.

NPs	Media Diámetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
Amino-metil NP (2.1)	222,1 ± 0,3	0,002	32,3 ± 0,2
Conjugación Fmoc-PEG (3.1.A)	220,9 ± 1,14	0,015	-38,9 ± 0,62
Fmoc desprotección (3.2.A)	221,8 ± 0,7	0,017	-31,4 ± 0,3
Cy5-PEG-NP (3.3.A)	221,9 ± 0,8	0,008	-23,9 ± 0,7
CBF-PEG-NP (3.4.A)	221,5 ± 1	0,021	-25,8 ± 0,6

La conjugación de los fluoróforos Cy5 y CBF también fue validada mediante citometría de flujo (**Figura 3.3 a y c**) y microscopía confocal (**Figura 3.3 b y d**). Los diagramas de puntos representativos de la citometría de flujo de la **Figura 3.3** muestran en la parte derecha del diagrama la población de nanopartículas conjugadas a los fluoróforos (color rojo para el fluoróforo Cy5 y color verde para CBF) con respecto a la población de nanopartículas PEGiladas (**3.2.A**), denominadas “*naked*” (color azul). Las imágenes de microscopía confocal muestran la población de nanopartículas conjugadas a los fluoróforos en los canales Cy5 y FITC cor respecto a las nanopartículas *naked*.

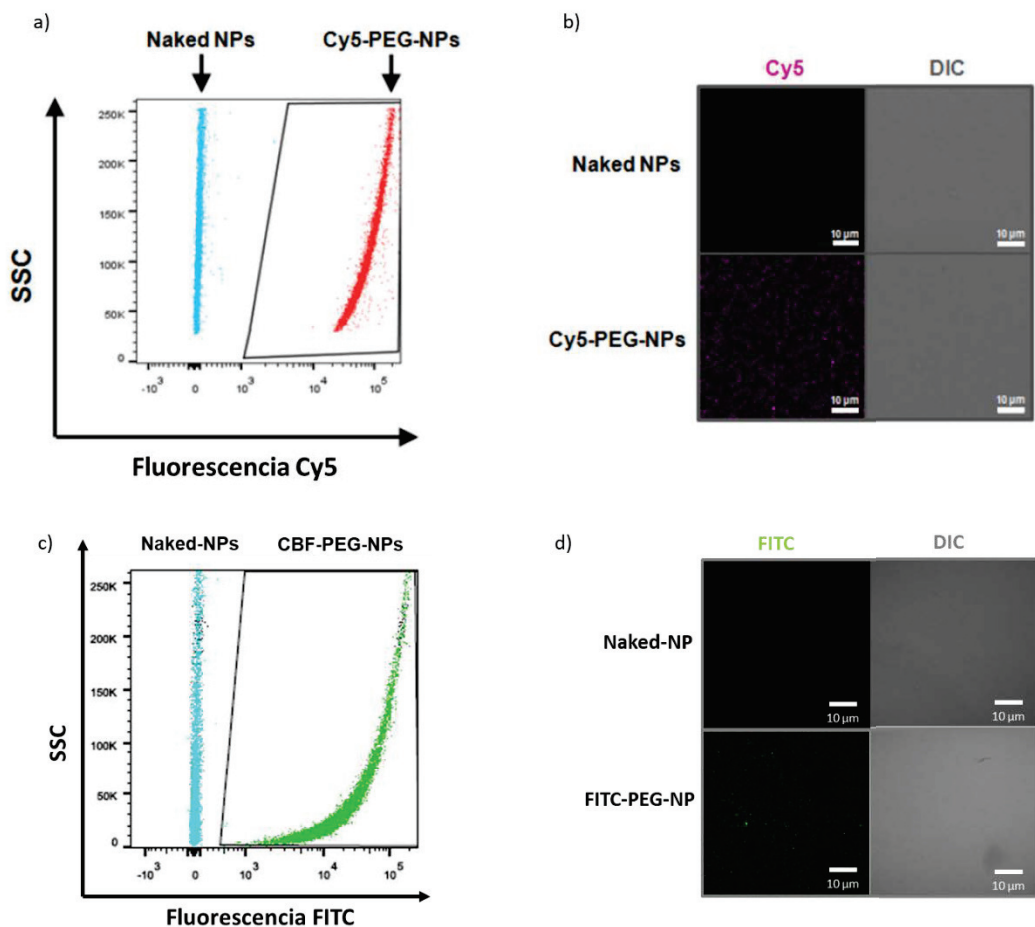


Figura 3.3. Caracterización de la fluorescencia de las Cy5-PEG-NP (3.3.A) y CBF-PEG-NP (3.4.A). a) Gráfico de puntos superpuestos representativo de citometría de flujo de las NPs PEGiladas 3.2.A (“naked”) (azul) y las Cy5-PEG-NP 3.3.A (rojo). b) Microscopía de fluorescencia confocal de las NPs *naked* (3.2.A) y las Cy5-PEG-NP (3.3.A). c) Gráfico de puntos de las NPs PEGiladas 3.2.A (“naked”) (azul) y las CBF-PEG-NP 3.4.A (verde). d) Microscopía de fluorescencia confocal de las NP *naked* (3.2.A) y las CBF-PEG-NP (3.4.A). SSC, dispersión lateral. DIC. Barra de escala, 10 μm .

3.2.1.2. Elaboración de las curvas de calibración

Para comprobar la viabilidad de este método, se utilizaron las tres suspensiones de nanopartículas (2.1, 2.3 y 2.4), sintetizadas en el capítulo anterior, como suspensiones madre. Se prepararon 26 diluciones de cada suspensión madre y se midió en paralelo la densidad óptica a 600 nm de cada una de las diluciones con dos espectrofotómetros diferentes con distintos espesores: a) uno convencional con cubetas de 1 cm de espesor (*Eppendorf BioPhotometer*) y, b) con 1mm de espesor (*NanoDrop ND-1000 espectrofotómetro, Thermo Fisher Scientific*). Los valores de la OD_{600} frente a las concentraciones de nanopartícula (NP/ μL) se representaron en gráficos de dispersión y

se analizaron para cada tamaño de nanopartícula y cada espectrofotómetro. Todos los diagramas de dispersión obtenidos a partir de cada tipo de nanopartícula con los dos espectrofotómetros se ajustaron con modelos de regresión lineal ($r^2 = 0,99$). Las líneas ajustadas obtenidas con los dos espectrofotómetros distintos para cada tamaño de nanopartícula dieron pendientes iguales, siendo el rango dinámico la única diferencia detectada, aunque, como se esperaba, las pendientes fueron diferentes para los tres tipos de nanopartículas (**Figura 3.4, a, b y c**). Tras la calibración se trazaron las curvas y se pudo determinar el número de nanopartículas por microlitro correspondiente a una unidad de OD₆₀₀ para cada tamaño de nanopartícula (**Tabla 3.2**). Las nanopartículas más pequeñas presentan mayor número de nanopartículas por microlitro correspondientes a una OD₆₀₀. Se esperaban estas diferencias ya que las nanopartículas más grandes dispersan más luz que las más pequeñas.

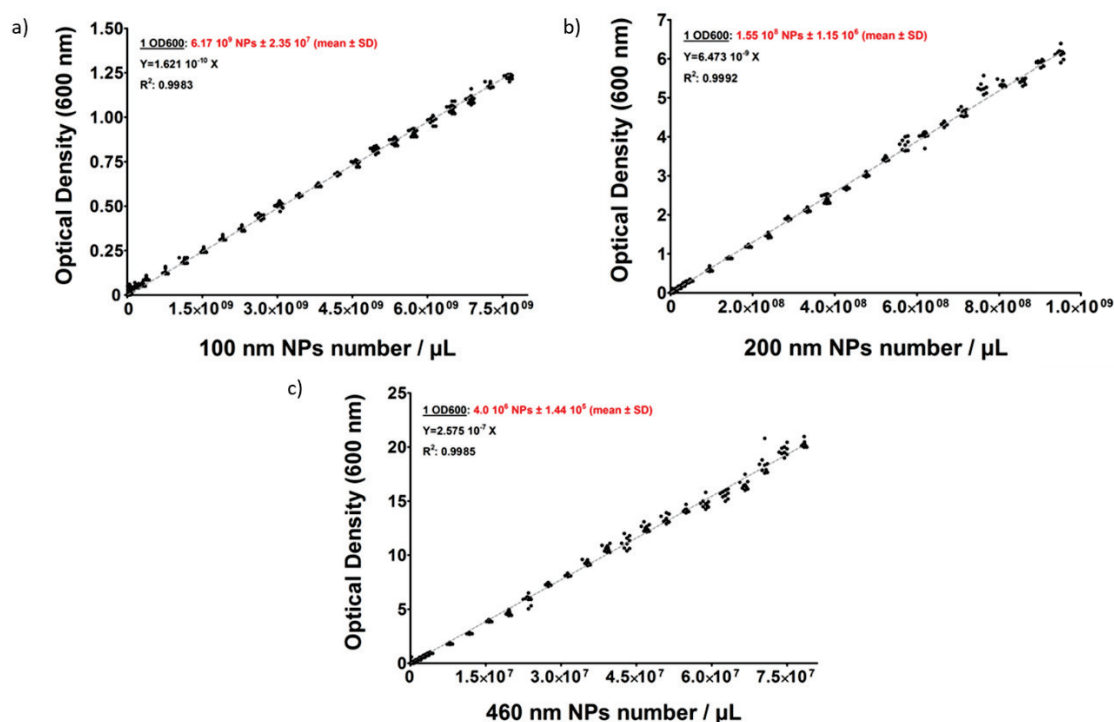


Figura 3.3. Representación de las mediciones de la OD₆₀₀ frente al número de NP/μL. Los datos fueron analizados por el software GraphPad de acuerdo con una ecuación lineal de regresión lineal. a) Curva de calibración de NP de 100 nm (**2.3**). b) Curva de calibración de NP de 200 nm (**2.4**). c) Curva de calibración de NP de 460 nm (**2.1**). El valor de 1 OD₆₀₀, la ecuación de línea y el factor de correlación (r2) se indican para cada tamaño de NP. Se midieron nueve repeticiones por concentración de NP.

Tabla 3.2. Número de NP por microlitro correspondiente a una unidad de OD₆₀₀.

Tamaño NPs	Número de NPs por microlitro correspondientes a una unidad de OD ₆₀₀ (media ± DS)
2.1 (460 nm)	4×10^6 NPs/ μ L \pm $1,44 \times 10^5$
2.4 (200 nm)	$1,55 \times 10^8$ NPs/ μ L \pm $1,15 \times 10^6$
2.3 (100 nm)	$6,17 \times 10^9$ NPs/ μ L \pm $2,35 \times 10^7$

Tras el desarrollo del método espectrofotométrico, éste se utilizó para el cálculo del número de nanopartículas sintetizadas en otros lotes, pasando a ser un método rutinario en nuestro laboratorio para la caracterización de las nanopartículas sintetizadas. En la **Figura 3.4.** se representan las curvas de calibración de varias nanopartículas de diferente tamaño sintetizadas en el laboratorio como ejemplo representativo. Y la **Tabla 3.3** muestra el número de nanopartículas por microlitro correspondiente a una unidad de OD₆₀₀ para cada tamaño de nanopartícula.

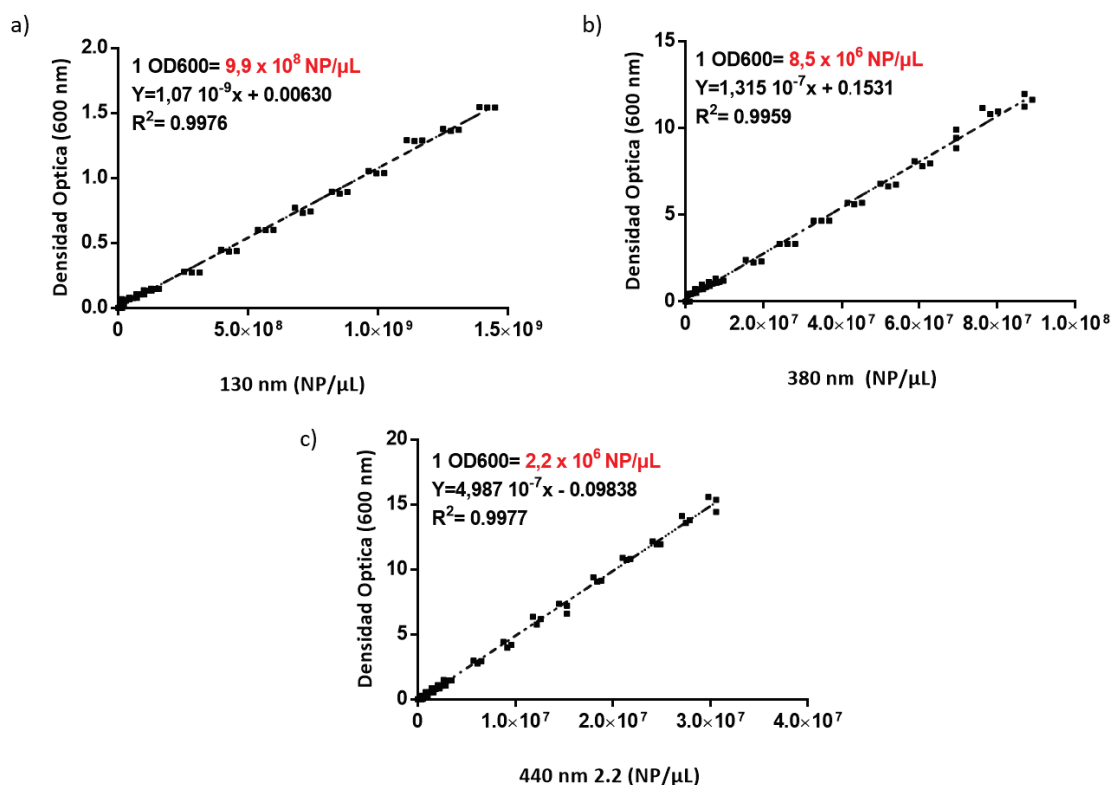


Figura 3.4. Representación de las mediciones de la OD₆₀₀ frente al número de NP/ μ L. Los datos fueron analizados por el software GraphPad de acuerdo con una ecuación lineal de regresión lineal. a) Curva de calibración de NP de 130 nm. b) Curva de calibración de NP de 380 nm. c) Curva de calibración de NP de

440 nm (2.4). El valor de 1 OD₆₀₀, la ecuación de línea y el factor de correlación (r²) se indican para cada tamaño de NP. Se midieron tres repeticiones por concentración de NP.

Tamaño NPs	Número de NPs por microlitro correspondientes a una unidad de OD ₆₀₀ (media ± DS)
460 nm (2.2)	$1,8 \times 10^8$ NPs/ μ L \pm $7,5 \times 10^6$
380 nm	$6,60 \times 10^8$ NPs/ μ L \pm $3,03 \times 10^7$
130 nm	$1,49 \times 10^{10}$ NPs/ μ L \pm $1,3 \times 10^9$

Tabla 3.3. Número de NP por microlitro correspondiente a una unidad de OD₆₀₀.

3.2.1.3. Aplicación del método espectrofotométrico

Este método sencillo para preparar curvas estándar utilizando los lotes iniciales de suspensiones de nanopartículas nos permite estimar, utilizando 1 microlitro de suspensión, el número de nanopartículas en los lotes finales, tras los múltiples procesos de manipulación. Para demostrar la aplicabilidad de este método, se usó un mililitro de las nanopartículas 2.4 que contenían $4,83 \times 10^9$ NP/ μ L para producir Cy5-PEG-NP (3.3 A). Esto requiere tres reacciones químicas y múltiples lavados consistentes en ciclos de centrifugación y dispersión (Figura 3.4 a). Después de cada reacción química, la suspensión de eNPs fue analizada por espectrofotometría y los valores de OD₆₀₀ recogidos por triplicado. Se calculó el número de nanopartículas aplicando la fórmula nueva presentada anteriormente para las nanopartículas de 200 nm (2.4) (Figura 3.4 b). Como era de esperar, estos datos mostraban que después de cada reacción química con sus correspondientes lavados había siempre pérdida de nanopartículas, disminuyendo el número inicial de nanopartículas de $4,83 \times 10^9$ NP/ μ L a $3,86 \times 10^9$ Cy5-PEG-NP (3.3 A)/ μ L al final del proceso (Figura 3.4 c). La reducción significativa en el número de nanopartículas (21% de disminución relativa con respecto a la concentración original) confirma que la cuantificación de las mismas es necesaria después de cada procedimiento potencialmente perturbador y, por lo tanto, la aplicación de un modelo sencillo para determinar el número de nanopartículas, como el que aquí mostramos.