



**REAL ACADEMIA
GALEGA DE CIENCIAS**

**LA NATURALEZA COMO FUENTE DE
INSPIRACIÓN EN EL DISEÑO DE
NANOMEDICAMENTOS**

Excma. Sra. Dña. María José Alonso Fernández

Discurso de Ingreso como Académica de Número

Santiago de Compostela, 12 de Noviembre de 2014

ÍNDICE

PRÓLOGO

DISCURSO

I. La evolución en el diseño de medicamentos y el origen de la nanotecnología farmacéutica

II. El diseño de nanotransportadores capaces de superar las barreras biológicas

III. El diseño de materiales bioinspirados y su comportamiento biológico

III.a. Lípidos

III.b. Proteínas:

III.b.1. Los anticuerpos monoclonales

III.b.2. La albúmina

III.b.3. El colágeno

III.b.4. La protamina

III.b.5. La fibroína

III.c. Polisacáridos:

III.c.1. El quitosano

III.c.2. El ácido hialurónico

IV. El diseño de nanotransportadores bioinspirados

IV.a. Transportadores naturales bioinspirados

IV.a.1. Células humanas

IV.a.2. Microorganismos

IV.a.3. Exosomas

IV.b. Transportadores sintéticos bioinspirados, constituidos a partir de materiales naturales

IV.b.1. Liposomas

IV.b.2. Nanopartículas y nanocápsulas

V. Aportaciones del grupo de investigación NANOBIOFÁRMACOS al diseño de nanotransportadores sintéticos bioinspirados

V.a. Las nanocápsulas y nanopartículas de quitosano como sistemas de transporte a través de mucosas

V.a.1. Administración por vía ocular

V.a.2. Administración por vía nasal

V.a.2. Administración por vía oral

V.b. Las nanocápsulas y nanopartículas de protamina como sistemas de transporte de antígenos

V.c. Las nanocápsulas de ácido hialurónico como sistemas de transporte de fármacos antitumorales

VI. Conclusiones y perspectivas futuras

REFERENCIAS

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia Galega de Ciencias,
Excmos. Sras. y Sres. Académicos,
Autoridades,
Sras., Sres., amigas y amigos,

PRÓLOGO

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a los miembros de la Real Academia de las Ciencias de Galicia que han avalado y apoyado mi candidatura como Académica de número. Me siento muy honrada de formar parte de esta Academia y de poder contribuir a su actividad en pro de la ciencia.

Hoy se me presenta una ocasión formidable para hacer referencia a todas las personas de quienes he aprendido, con quienes he compartido mis grandes satisfacciones, pero también mis pequeñas frustraciones, dudas y preocupaciones que con frecuencia acompañan en la búsqueda de lo desconocido en este maravilloso mundo de la ciencia. Debo centrar mi agradecimiento en aquellas personas que han tenido una influencia más directa, pero soy consciente que son muchos más de los que aquí menciono, los que me han ayudado en mi desarrollo personal y profesional. Sin duda, las personas que más han influido en mi carrera científica son aquéllas con quienes me he formado, los profesores Patrick Couvreur, Robert Langer y, de forma muy especial, mi maestro y mentor, el profesor José Luis Vila Jato, con quien me inicié en la carrera investigadora en el año 1981. Quiero aprovechar esta ocasión para agradecerle la confianza que depositó en mí y las alas que me dio en un momento en que este tipo de libertad era ciertamente excepcional. Quiero agradecerle igualmente por haber propiciado la apertura de nuestro departamento al exterior, promoviendo la colaboración con la industria y las relaciones internacionales; todos sus discípulos nos hemos beneficiado de ello y es digno tenerlo presente.

Además del apoyo e influencia de mis maestros, en mi contribución a la ciencia he contado con un equipo de colaboradores que me han mostrado siempre un apoyo incondicional y entre los que quiero destacar especialmente a Loli Torres, quien gracias a la ciencia se ha convertido en una de mis mejores amigas y aliadas. Pero he de reconocer que toda mi trayectoria no hubiese sido posible si no hubiese contado con discípulos del máximo nivel y de quienes me siento muy orgullosa. Muchos de ellos ocupan cargos relevantes en la universidad y en la industria farmacéutica y con algunos de ellos, como son Marcos, Noemi, María y Desirée tengo el gusto de estar colaborando actualmente.

Más allá de todo reconocimiento profesional, tengo claro que mi trayectoria se debe sobre todo a mis padres, a quienes considero verdaderamente sabios al ser capaces de reconocer, en un entorno muy desfavorable, la importancia de una formación a la

que ellos nunca pudieron acceder. Ese ha sido su gran legado, por el que me siento orgullosa de haberlos tenido como padres. Y quiero agradecer también muy especialmente a mi marido Ramón y mi hijo Javier Gang, quienes me aportan una felicidad sosegada y, con ella, la inspiración y el empeño en mi trabajo. Además de mis padres, tenerlos a ellos es el mayor privilegio que la vida me ha dado.

En este discurso de ingreso he querido abordar un tema que me ha maravillado a lo largo de mi trayectoria, que es lo que la naturaleza ofrece como fuente de inspiración en el desarrollo de nuevos medicamentos. Y con esto, no me estoy refiriendo únicamente al conocimiento necesario de nuestra biología, sino también a la observación del comportamiento de la naturaleza en general. Porque, como se suele decir, la naturaleza es sabia y cada molécula tiene su función y su razón de ser; por tanto cuando más observemos y conozcamos la naturaleza, más posibilidades tendremos de progresar en el desarrollo de medicamentos, a través de la simulación de los comportamientos naturales de los seres vivos.

Por ello, a lo largo de mi discurso, abordaré en primer lugar la complejidad asociada al diseño y desarrollo de nuevos medicamentos, y la importancia de la interacción del fármaco con su entorno biológico en su camino hacia la diana terapéutica. Seguidamente, haré hincapié en el potencial que ofrece la nanotecnología a la hora de resolver los problemas de los fármacos y, en particular, su utilidad para facilitar la superación de todas las barreras biológicas que el fármaco ha de afrontar. Dentro de las nanotecnologías disponibles en el momento actual, me centraré en aquellas bioinspiradas por la naturaleza. Esta inspiración se centra en el uso de materiales presentes en los seres vivos y que presentan propiedades y comportamientos de interés para el transporte y liberación de fármacos en el organismo. Pero además, esta inspiración incluye el diseño de nanoestructuras basadas en la simulación del comportamiento biológico de organismos vivos. En este proceso de simulación o mimetización cabe incluir sistemas naturales modificados y sistemas sintéticos, siendo éstos últimos aquéllos en los que he centrado mi actividad investigadora. Así, finalizaré mi discurso presentando nanoestructuras innovadoras diseñadas en mi grupo de investigación y las múltiples aplicaciones de que han sido objeto hasta el momento. Esta reflexión comparativa de lo que ofrece la naturaleza y lo que hemos diseñado, sin duda pondrá de manifiesto las múltiples incertidumbres a las que nos enfrentamos los que nos dedicamos a la ciencia relacionada con el comportamiento biológico del ser humano y el modo de interferir en esa biología a través del medicamento.

Con esto quiero finalizar dedicando este discurso a mi hijo Javier Gang, quien me hace pensar cada día y cuestionarme el porqué de las cosas con un sentimiento de la mayor felicidad.

DISCURSO

I. La evolución en el diseño de medicamentos y el origen de la nanotecnología farmacéutica

El modo en que se han venido diseñando los medicamentos a lo largo de la historia ha evolucionado significativamente. Partiendo simplemente de probar los remedios que ofrecía la naturaleza, el siglo XX propició el desarrollo espectacular de la síntesis química y, con ello, la producción masiva de medicamentos. Esta síntesis, inicialmente basada en producir las moléculas, para las que de modo intuitivo se les suponía una acción, dio paso al diseño racional de fármacos. Sin embargo el limitado conocimiento biológico existente en aquel momento hizo que esta tendencia diera lugar a escasos resultados. El reconocimiento de este hecho se tradujo en un impulso hacia el estudio de la biología humana y, con ello, al auge de la biología molecular y celular. Asimismo, y ante las nuevas capacidades que en la década de los 80 empezaron a ofrecer las tecnologías de la información, se propició el estudio robotizado de nuestra biología y con él, el nacimiento de las llamadas "**ciencias ómicas**" (farmacogenómica, proteómica, lipidómica, ... etc.). Las capacidades de los sistemas robotizados fueron propuestas además para proceder a un *screening* masivo de moléculas, tratando de identificar de una forma iterativa posibles candidatos a fármacos y la identificación de dianas biológicas.

Simultáneamente a esta evolución en el proceso de diseño de los fármacos, el nacimiento de la biofarmacia y farmacocinética en la década de los años 50, permitió iniciar el desarrollo del conocimiento en torno a la interacción de los fármacos con el organismo. Este conocimiento ha dado lugar a una mejor percepción de la extraordinaria complejidad de los eventos a los que se enfrenta un fármaco en su tránsito por la biología humana. Con ello, la tecnología farmacéutica se fue modernizando pasando de tener un papel meramente físico, de empaquetado, a un papel esencial en la respuesta y toxicidad de los fármacos. Esta capacidad ha contribuido en gran medida el nacimiento de la nanotecnología farmacéutica. Este concepto que, en general, se asocia al de nanomedicina, se refiere al uso de la nanotecnología para el desarrollo de medicamentos, entendiéndose como tal cualquier sustancia utilizada para prevenir, diagnosticar o curar enfermedades. Por tanto, asociados al término de nanomedicamento, debemos incluir los nanosistemas de diagnóstico y las nanovacunas.

El desarrollo de nuevos fármacos ha venido fundamentalmente ligado a la identificación de dianas terapéuticas, haciendo escasa consideración a los aspectos farmacocinéticos y partiendo únicamente de la premisa de la necesidad de un bajo peso molecular y un carácter moderadamente lipofílico. Es decir que, salvo los estudios farmacodinámicos relacionados con la interacción del fármaco y su diana

terapéutica, el conocimiento del resto de los eventos a los que se enfrenta el fármaco en su tránsito por el organismo, se ha simplificado, asumiendo en general que las moléculas difunden libremente según procesos de difusión pasiva. Sin embargo, este planteamiento simplista, unido a los sistemas de producción y screening masivos, han dado lugar a que se hayan despreciado muchos compuestos, potenciales candidatos a fármacos, por no disponer de las características biofarmacéuticas y farmacocinéticas que se consideraban indispensables. Así, ante la reconocida ineficiencia de este planteamiento y las dificultades para diseñar nuevos fármacos, en los últimos años hemos asistido a un cambio de paradigma. Se ha asumido que el mundo de los fármacos de bajo peso molecular y moderado carácter lipofílico es reducido y que necesitamos planteamientos más innovadores que permitan diseñar y hacer factible la administración de moléculas complejas. Surge así la biotecnología aportando moléculas tales como los péptidos, las proteínas, los anticuerpos monoclonales y una amplia variedad de moléculas basadas en ácidos nucleicos, moléculas con frecuencia ligadas al concepto de terapia génica. A esta tendencia ha contribuido además la química biológica, permitiendo en la actualidad obtener péptidos sintéticos y modificar químicamente esta serie de moléculas complejas.

A esta conjunción de la química, la biología y la biotecnología, se ha unido también la nanotecnología farmacéutica. La nanotecnología ha dado lugar al desarrollo de nanoestructuras transportadoras que confieren a los fármacos una habilidad para superar barreras biológicas, así como una capacidad de orientación y acceso a la diana terapéutica.

II. El diseño de nanotransportadores capaces de superar las barreras biológicas

Desde el momento en que un fármaco se administra y ejerce su acción hasta que se elimina, transcurren numerosos eventos que representan continuos retos en el devenir de los fármacos en el organismo. Según se refleja en la Figura 1, asumiendo que el fármaco se administra por vía intravenosa, nos encontramos con que puede ser rápidamente degradado en el torrente sanguíneo, a la vez que ser objeto de una distribución indiscriminada. Es decir que el fármaco puede pasar a acumularse no únicamente en el órgano diana, sino también en lugares no deseados, propiciando así la aparición de efectos adversos. La importancia de esta distribución indiscriminada depende del balance toxicidad/eficacia inherente al fármaco, pero existen numerosos ejemplos de fármacos cuya toxicidad puede resultar dramática para el paciente. La necesidad de modificar el perfil de biodistribución de los fármacos ha dado lugar al concepto de “*drug targeting*” u orientación selectiva. Este concepto ha venido asociado a la aplicación de la nanotecnología al diseño de transportadores capaces de conducir al fármaco a su lugar de acción.

Sin embargo, la administración intravenosa se ha de restringir al ámbito hospitalario y el resto de las modalidades de administración de fármacos, y de forma notable la administración oral, llevan anejas barreras que resultan muy difíciles de franquear sobre todo para las moléculas complejas de última generación a las que me he referido en el apartado anterior. En efecto, a la hora de abordar cualquiera de las barreras mucosas o la piel, nos encontramos con que muchos fármacos no son capaces de superar el papel defensivo y biológico de esas barreras. Más concretamente, muchos de ellos sufren procesos degradativos y, en general, no son capaces de atravesar el moco y los epitelios restrictivos característicos de esas barreras. Además de ello, existen las limitaciones anatómicas que dificultan el contacto de las moléculas activas con el epitelio absorbente. Y todas estas barreras se justifican por el simple hecho de que nuestro organismo no está lógicamente diseñado, o dicho de otro modo, no ha evolucionado cara a conseguir una administración eficiente de los fármacos, sino más bien para protegernos de agentes externos que puedan ser nocivos y promover únicamente la absorción de nutrientes esenciales para la salud.

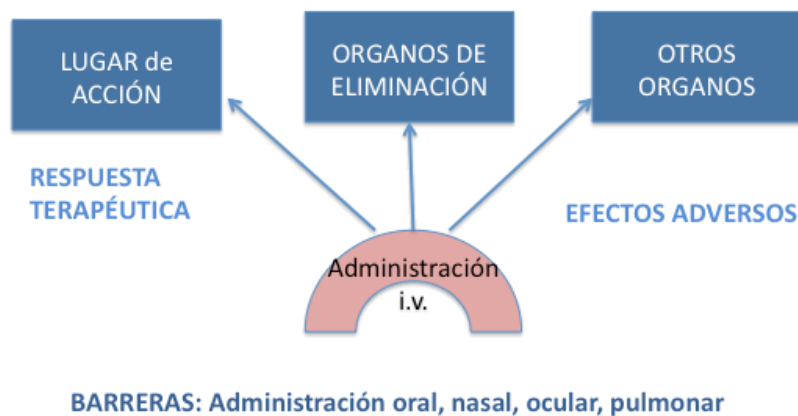


Figura 1. Ilustración de los eventos a los que se enfrenta un fármaco tras su administración a un organismo.

La nanotecnología surge de la necesidad de facilitar a las moléculas activas el acceso a su diana terapéutica, pasando a tener una función primordial en la administración de fármacos complejos. De este modo, y según se muestra en la Figura 2, hasta el momento se han diseñado una amplia variedad de nanoestructuras de composición y arquitecturas muy variables y con un diverso espectro de aplicaciones. En algunos casos, como es el tratamiento del cáncer o infecciones severas, las nanoestructuras se diseñan con la finalidad de modificar su biodistribución y promover su acumulación en el órgano o tejido diana, en otros, como es el caso de las vacunas, la finalidad es la de facilitar su presentación al sistema inmune y, con ello la generación de una respuesta inmune protectora y en otras muchas situaciones, el objetivo se centra en hacer viable el transporte de la molécula a través de superficies mucosas, tales como

la mucosa intestinal, la nasal, la pulmonar, la ocular, la sublingual, la bucal, y también a través de la piel. En el apartado V se presentan ejemplos específicos de estas aplicaciones, los cuales han sido fruto de la actividad de mi equipo de investigación.

III. El diseño de materiales bioinspirados y su comportamiento biológico

III.a. Lípidos

Los lípidos cumplen funciones diversas en los organismos vivos, entre ellas la de reserva energética (como los triglicéridos), la estructural (como los fosfolípidos de las bicapas) y la reguladora, hormonal y de comunicación celular (como las vitaminas liposolubles y las hormonas esteroideas). Además están los ácidos biliares, los cuales tienen una función transportadora de los lípidos de la dieta a través de la pared intestinal, siendo esta actividad promovida por los ácidos biliares.

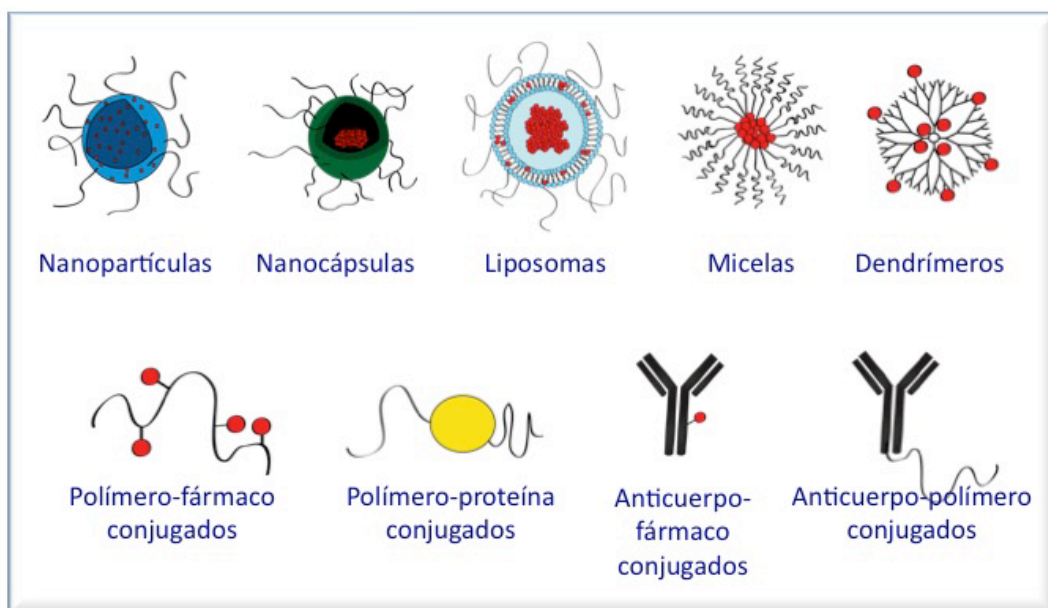


Figura 2. Ilustración de la estructura de nanosistemas de liberación de fármacos

Los lípidos han estado siempre presentes en la formulación de los fármacos bajo la forma de soluciones oleosas, emulsiones y tensoactivos (ej. fosfolípidos). Además, representan el constituyente esencial de las primeras nanoestructuras propuestas como sistemas de transporte de fármacos en el organismo, los liposomas.

III.b. Proteínas

Las proteínas desempeñan un papel fundamental para la vida y son las biomoléculas más versátiles y diversas. Son imprescindibles para el crecimiento del organismo y realizan una enorme cantidad de funciones diferentes, entre las que destacan su función estructural. La proteína más relevante en cuanto a su función estructural es el colágeno. Destacan además la función inmunológica (anticuerpos), enzimática, contráctil (actina y miosina) y una amplia variedad de funciones asociadas a una extensa lista de proteínas.

Desde el punto de vista de su utilización en el diseño de transportadores bioinspirados destacan los anticuerpos monoclonales por su función de direccionamiento, las proteínas que circulan en sangre, como es la albúmina y las que tienen funciones estructurales, tales como el colágeno, la protamina o la fibroína, presentes en diferentes organismos animales y a las que me referiré a continuación.

III.b.1. Los anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales son capaces de reconocer y unirse específicamente a numerosas moléculas, fundamentalmente a aquella de naturaleza proteica. Gracias a esta capacidad han sido muy utilizados en el ámbito del diagnóstico para la detección de hormonas, vitaminas, citocinas, alérgenos, así como de numerosos marcadores tumorales y una amplia variedad de marcadores asociados a muchas enfermedades. Por estas propiedades los anticuerpos monoclonales son las sustancias más utilizadas en el ámbito del diagnóstico clínico, así como en la identificación de marcadores y dianas terapéuticas.

Además de las aplicaciones en el diagnóstico de enfermedades y en el descubrimiento de fármacos, destacan las aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos monoclonales como tales o como vehículos transportadores de otros fármacos. Entre las aplicaciones específicas de los anticuerpos monoclonales como fármacos destaca su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, como por ejemplo la artritis reumatoide, el cáncer o la inmunosupresión. Por otro lado, desde hace décadas se ha explorado el uso de anticuerpos para conseguir la orientación selectiva de fármaco hacia las células diana que presentan en su superficie un antígeno capaz de ser reconocido por el anticuerpo. Esta aplicación ha sido estudiada bajo la forma de conjugado de anticuerpo con fármaco o bien bajo la forma de anticuerpo unido covalentemente a estructuras nanométricas. Desafortunadamente, a pesar del esfuerzo realizado en esta línea, las formulaciones basadas en esta estrategia no han conseguido llegar al mercado. Las razones que justifican el escaso éxito logrado hasta el momento podrían encontrarse en la limitada especificidad de los anticuerpos por las células diana, en las dificultades para su manipulación de forma que mantengan su especificidad y funcionalidad tras su administración in vivo y, por último, en los

posibles efectos adversos, en particular de naturaleza inmunológica, asociados a la modificación de los anticuerpos. Sin embargo, a pesar de estos inconvenientes, el análisis realizado de los estudios actualmente en fase clínica permite prever un futuro prometedor para el uso de anticuerpos como transportadores de fármacos indicados en tratamientos específicos (Janthur et al., 2012)

III.b.2. La albúmina

La albúmina es una proteína que se sintetiza en el hígado y se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre, y una de las más abundantes en el ser humano. Esta proteína desempeña fundamentalmente una función de transporte de diversos componentes biológicos (hormonas, ácidos grasos, bilirrubina, ... etc.), así como de fármacos. De hecho, la mayor parte de los fármacos se unen en una gran proporción a proteínas plasmáticas.

La albúmina ha sido uno de los primeros biomateriales utilizados en la elaboración de nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos (Birrenbach, 1973; Birrenbach y Speiser, 1976)). A pesar de su desarrollo temprano, hubieron de pasar varias décadas para que este tipo de nanopartículas pudiese ver la luz en el mercado como sistemas de transporte de fármacos antitumorales (Gradishar et al. 2006)

III.b.3. El colágeno

El colágeno es una proteína que forma fibras que se encuentran en todos los animales. El colágeno es secretado por las células del tejido conjuntivo como los fibroblastos, así como por otros tipos celulares. Es el componente más abundante de la piel y de los huesos, cubriendo un 25% de la masa total de proteínas en los mamíferos. Las fibras colágenas son flexibles, pero ofrecen gran resistencia a la tracción. Cuando el colágeno se desnaturaliza por ebullición y se deja enfriar, manteniéndolo en una solución acuosa, se convierte en una sustancia muy conocida, la gelatina.

Tanto en forma de colágeno como de gelatina, esta proteína ha recibido gran atención como biomaterial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos (Nezhadi et al., 2009; Sripriyalakshmi et al., 2014) y también en ingeniería de tejidos (Santoro et al., 2014).

III.b.4. La protamina

Otro péptido con demostrada capacidad para aumentar la permeabilidad de epitelios es la protamina (Reynolds et al. 2005). La protamina es un polipéptido rico en arginina

que es sintetizado en la última etapa de la espermatide de muchos animales y plantas, siendo su papel fisiológico la condensación del ADN (Balhorn R, 2007).

La protamina es utilizada actualmente como excipiente farmacéutico y como fármaco. Así, se encuentra en el mercado una formulación que consiste en un complejo de protamina-insulina que da lugar a una cesión sostenida de la insulina. Por otro lado, ha sido comercializado como fármaco antagonista de la heparina y, por tanto capaz de revertir el efecto de la heparina en situaciones de hemorragias.

Además, este polipéptido ha sido objeto de estudio en numerosos trabajos de investigación. En particular, y debido a su alta afinidad por el material genético, la protamina ha sido ampliamente estudiada como vehículo de diversos tipos de material genético (ADN, ARN y siARN). Más recientemente, nuestro grupo ha desarrollado nanopartículas y nanocápsulas de protamina con una demostrada capacidad para actuar como sistemas de liberación de antígenos. Además, se ha demostrado que la asociación de antígenos y material genético a la protamina facilita su internalización celular (Gonzalez Aramundiz J.V., 2013).

III.b.5. La fibroína

La fibroína es un tipo de proteína con carácter fibroso producida por algunos artrópodos, como el gusano de seda o las arañas durante la segregación del hilo. El hilo se compone de dos proteínas principales: la sericina y la fibroína. La fibroína es el núcleo estructural de la seda; y la sericina, el material pegajoso que la rodea.

Precisamente por su resistencia y biodegradabilidad la fibroína es utilizada desde hace tiempo como hilo de sutura. Más recientemente ha recibido especial atención como biomaterial de interés tanto en el ámbito de la liberación de fármacos como en dermofarmacia y cosmética (Kundu et al., 2014; Shi et al., 2014; Yucel et al., 2014).

III.c. Polisacáridos

Los polisacáridos son carbohidratos de origen natural compuestos de unidades repetitivas mono- o disacáridicas, unidas por enlaces glucosídicos (Figura 3). Son muchos los polisacáridos presentes en la naturaleza y, de todos ellos, los más utilizados en el diseño de nanosistemas de liberación de fármacos son el quitosano y el ácido hialurónico. Estos dos polisacáridos se obtienen de fuentes distintas (el quitosano a partir del caparazón de los crustáceos y el ácido hialurónico a partir de tejido conectivo de animales) y son estructuralmente distintos, presentando el quitosano carga positiva y el ácido hialurónico carga negativa. Sin, embargo, ambos comparten una serie de propiedades comunes. Por ejemplo, ambos son de carácter

hidrofílico y son estructuralmente muy flexibles, lo que les permite interactuar fácilmente con otras moléculas a través de uniones no covalentes. En esta capacidad residen igualmente sus propiedades gelificantes y también su capacidad para interactuar con el entorno biológico. Estas propiedades, unidas a su buena biocompatibilidad y biodegradabilidad justifican su éxito en el terreno biofarmacéutico. De hecho, ambos biomateriales se utilizan en cicatrización y otras formas de tratamientos dermatológicos. Otros aspectos diferenciales se describen a continuación.

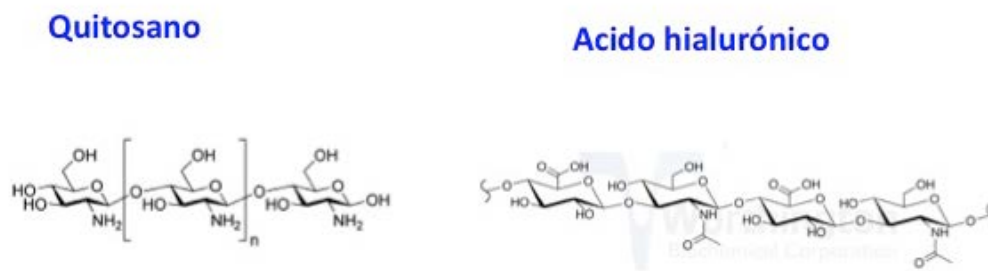


Figura 3. Estructura química de la molécula de quitano (izquierda) y de la molécula de ácido hialurónico (derecha)

III.c.1. El quitano

El quitano es el producto derivado de la desacetilación de la quitina, presente en una amplia variedad de seres vivos, y particularmente abundante en crustáceos e insectos. La quitina es el escudo protector de estos seres vivos; sin embargo, su uso como tal no es viable, debido a la imposibilidad para disolverla en los disolventes habituales. Consta de unidades repetitivas de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces glucosídicos.

Este copolímero es fácilmente degradado por varios enzimas presentes en las mucosas y otros fluidos fisiológicos, tales como la lisozima, la di-N-acetilquitobiosidasa, la quitotriosidasa y la N-acetil-β-D-glucosaminidasa. Aunque el quitano no se encuentra todavía en ningún medicamento comercializado, sí forma parte de la lista de excipientes GRAS (Generally Regarded As Safe) de la FDA. También se usa como complemento alimenticio para reducir la absorción de grasa y en la cicatrización de heridas, por lo que existe una documentada constatación de su buena tolerabilidad por vía tópica y por vía oral. Por otra parte, el quitano forma parte de diversas formulaciones que se encuentran en diversas fases de desarrollo clínico.

III.c.2. El ácido hialurónico

El ácido hialurónico es una molécula endógena que se encuentra en todos los tejidos y fluidos de los vertebrados. Es un componente esencial de la matriz extracelular que soporta los tejidos del organismo y se encuentra también en el fluido sinovial. Está compuesto por unidades disacarídicas de ácido glucurónico y *N*-acetil-glucosamina unidos por enlaces glucosídicos (Figura 3).

Se sabe que el ácido hialurónico tiene afinidad por determinadas proteínas. Entre otras, tiene una afinidad importante por la proteína CD44, que es una proteína de membrana que se encuentra en los linfocitos y también en células de epitelios, como por ejemplo el conjuntival. Además, esta proteína está sobre-expresada en muchos tipos de células cancerígenas y se sabe que la unión de ácido hialurónico con esta proteína es esencial para conseguir la diferenciación de las células cancerígenas, así como su proliferación y migración.

Debido a estas interesantes propiedades, el ácido hialurónico se utiliza en la práctica clínica para el tratamiento de la osteoartritis, tras su administración por vía intra-articular y para el tratamiento del ojo seco, cuando se administra en forma de lágrimas artificiales por vía ocular.

Además de las aplicaciones descritas para estos polisacáridos, cuando se administran en forma de solución en humanos, ambos han sido objeto de abundante literatura que muestra la posibilidad de diseñar nanoestructuras que ofrecen ventajas específicas con respecto a los polímeros en solución. Nuestro grupo ha sido pionero en el diseño de estas nanoestructuras y ha puesto de manifiesto ciertas aplicaciones como se refleja en el apartado V.

IV. El diseño de nanotransportadores bioinspirados

A lo largo de las pasadas décadas tanto microorganismos patógenos como células han sido utilizados como vehículos naturales de transporte de fármacos aprovechando las funciones para las que la propia naturaleza los ha diseñado. Esto ha llevado a investigar en gran detalle los mecanismos de funcionamiento de células y patógenos, principalmente en todo lo que se refiere a los factores que motivan su movimiento y capacidad invasiva en el organismo. Como consecuencia se han identificado diversos marcadores condicionantes del tropismo de estos transportadores. Este conocimiento, además de ayudar a comprender el funcionamiento de nuestro organismo ha ayudado significativamente al diseño de sistemas artificiales bioinspirados.

IV.a. Transportadores naturales bioinspirados

Diversos tipos de células humanas y también microorganismos han sido utilizados como tales para el transporte de fármacos en el organismo, a la vez que han sido fuente de inspiración en el diseño de sistemas sintéticos. También se ha explorado la combinación de ambas estrategias, es decir la asociación de sistemas nanométricos sintéticos y soportes celulares o microbianos. A continuación se describen las características y potencialidades de cada uno de estos sistemas tanto naturales como sintéticos y sus combinaciones.

IV.a.1. Células humanas

Diversos tipos de células, entre ellos las células madre, los glóbulos rojos, los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos han sido utilizados como tales para el transporte de fármacos en el organismo, así como también asociados a otras nanoestructuras. Estas terapias han adquirido gran auge en las últimas décadas y han recibido la denominación de terapias celulares.

IV.a.1.1. Glóbulos rojos

Los glóbulos rojos son las células más abundantes en nuestro organismo y han sido propuestos como sistemas transportadores de fármacos desde hace más de 30 años. Su tamaño (7–8 μm), su forma discoidal y su flexibilidad les permite colarse por los poros de los capilares a pesar de tener un tamaño superior ($\sim 3 \mu\text{m}$ de diámetro de poro). Estas características y su elevado tiempo de circulación en el torrente sanguíneo (~ 120 días), los convierte en vehículos eficaces para el transporte de fármacos y su posterior liberación en el torrente sanguíneo y determinados órganos. Así por ejemplo, los glóbulos rojos han sido diseñados para la liberación de agentes trombolíticos (Murciano et al., 2003). Más recientemente, se ha propuesto también la asociación de nanopartículas a los glóbulos rojos a fin de prolongar su tiempo de circulación en sangre (Chambers et al., 2007). Sin embargo, a pesar de la abundante literatura al respecto del uso y modificación de glóbulos rojos como sistemas de transporte de fármacos, la complejidad asociada a la terapia, unida al reducido espacio de actividad (el torrente sanguíneo), ha limitado la traslación de esta estrategia terapéutica a la práctica clínica (Magnani et al. 2014). A pesar de estas dificultades, la idea de utilizar células humanas como transportadores de fármacos ha abierto nuevos horizontes hacia el mundo de las terapias celulares, que se mencionan a continuación.

IV.a.1.2. Macrófagos

Los macrófagos tienen una función eminentemente protectora, asociada a su tendencia natural a dirigirse a las regiones del organismo que se vean alteradas por procesos patológicos; tendencia que es mediada por la secreción de citoquinas y otras moléculas a nivel del tejido dañado o de los vasos sanguíneos de sus inmediaciones. Esta habilidad para reconocer los lugares donde se desarrolla la enfermedad ha llevado a que se hayan propuesto desde hace bastante tiempo como sistemas de transporte de moléculas terapéuticas. Más recientemente, y debido a la capacidad innata de los macrófagos de fagocitar partículas, se ha propuesto la idea de cargarlos con nanopartículas que llevan asociados fármacos. Por ejemplo, en esta línea se ha propuesto la asociación de fármacos antiretrovirales a macrófagos obtenidos de la médula ósea para el tratamiento del SIDA (Dou et al., 2006). Esta estrategia ha sido igualmente aplicada para transportar fármacos a las zonas de hipoxia poco vascularizadas de algunos tumores sólidos, zonas que reclaman la presencia de macrófagos y en las que el acceso de fármacos está muy restringido.

La orientación específica de los macrófagos a las zonas donde se encuentra la patología, los convierte en transportadores excepcionales de fármacos, sin embargo, esta orientación no es totalmente selectiva, lo que conduce a respuestas asociadas indeseables. Por tanto, la posibilidad de explotación de esta estrategia pasa por mejorar dicha selectividad y el éxito estará muy condicionado al tipo de fármaco transportado.

IV.a.1.3. Linfocitos

Los linfocitos modificados genéticamente están teniendo éxito principalmente en la inmunoterapia del cáncer y en particular en la vacunación terapéutica frente al cáncer. De hecho, en estos momentos existe una terapia en fase de desarrollo clínico avanzado que consiste en la extracción de linfocitos T del propio paciente, posterior modificación genética de los mismos para que expresen el antígeno tumoral y, finalmente, re-infusión al paciente (Rosemberg et al., 2008). Asimismo los linfocitos han sido utilizados como soporte de sistemas sintéticos de liberación de fármacos.

A pesar del logro de haber alcanzado la fase de desarrollo clínico, el gran reto a la hora de implantar estas terapias reside en las dificultades para preservar la integridad, y por tanto la funcionalidad, de las células extraídas tras su modificación genética.

IV.a.1.4. Células madre

Las células madre han sido ampliamente estudiadas en terapia génica, en particular en la terapia del cáncer. Esto se debe a la posibilidad de ser modificadas genéticamente, así como a su tropismo positivo hacia el tumor. En efecto, en el proceso de formación del tumor, las células malignas emiten señales que atraen a las

células madre, especialmente células madre mesenquimales, y ayudan a su proliferación, formándose así el estroma tumoral. Partiendo de esta observación se han modificado genéticamente células madre para que expresen proteínas antitumorales, tales como interferones e interleuquinas. Los resultados en animales de experimentación han puesto de manifiesto el éxito de esta estrategia en una amplia variedad de tumores implantados en animales. Sin embargo, a pesar de ello, las aplicaciones en humanos se han visto limitadas por la toxicidad observada.

Una estrategia más reciente, es la que combina el uso de nanopartículas con células madre. En un trabajo pionero se puso de manifiesto la capacidad de las células madre para internalizar nanopartículas elaboradas a partir de lípidos o polímeros sin que se vea alterada su funcionabilidad, así como su capacidad para migrar a tumores distantes (Roger et al., 2010). Esta estrategia que combina el uso de nanopartículas y células madre constituye la línea de investigación de Marcos García, discípulo y colaborador actual (Reguera-Nuñez et al., 2014). Este ámbito suscita un gran interés ya que abre amplias posibilidades terapéuticas, si bien su avance está condicionado a un mejor conocimiento de los mecanismos que rigen el comportamiento de las células madre.

IV.a.2. Microorganismos

Los patógenos, tales como virus y bacterias han desarrollado inteligentes estrategias para evadir nuestro sistema inmune y acceder a zonas remotas de nuestro organismo y conseguir la invasión de células específicas. Por ello, el conocimiento de su comportamiento ha llevado a proponer su uso como sistemas naturales de transporte pero también ha tenido un gran impacto en la nanotecnología y el desarrollo de nanotransportadores sintéticos.

IV.a.2.1. Bacterias

Las bacterias modificadas genéticamente y desprovistas de su maquinaria celular – bacterias fantasma- han sido propuestas de forma independiente o combinadas con nanopartículas sintéticas, para la liberación o producción selectiva de fármacos como se describe a continuación.

Bacterias recombinantes

Los extraordinarios avances en ingeniería genética han permitido la inserción de vectores plasmídicos codificadores de antígenos y fármacos de naturaleza proteica, por ejemplo anticuerpos, citoquinas y otros, en las bacterias. De este modo, las bacterias pueden producir el fármaco “*in vivo*” e “*in situ*”, en el lugar al que van dirigidas. Las bacterias utilizadas con este propósito son bacterias no patógenas, también llamadas GRAS (Generally Regarded As Safe) tales como *Lactococcus lactis* y también bacterias comensales tales como *Streptococcus gordonii*, conocida por su

habilidad para colonizar superficies mucosas del organismo humano. En particular el uso de *L. Lactis* para conseguir la producción de interleukina-10 (IL-10) a nivel de la mucosa intestinal, es un tratamiento que se encuentra en fase de desarrollo clínico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino. La misma bacteria ha sido modificada para producir factor 1 trefoil para el tratamiento de la mucositis oral, tratamiento que se encuentra también en fase de investigación clínica.

Otras bacterias han sido modificadas genéticamente para lograr la expresión y secreción de antígenos, tales como antígenos antitetánicos o frente al virus del papiloma humano (HPV), in vivo. Por último, las bacterias han sido utilizadas como vectores de RNA interferente (siRNA), de interés en el tratamiento del cáncer.

Además de modificar genéticamente bacterias vivas para que produzcan determinadas moléculas tras su administración in vivo, algunos autores (Akin et al., 2007) han propuesto la utilización de bacterias atenuadas para cargarlas de nanopartículas que llevan ADN asociado. Con este propósito se ha utilizado, por ejemplo, *Listeria monocitogenes*, con capacidad para penetrar en células tumorales y procurar la transcripción del plásmido asociado.

Bacterias “fantasma”

Las bacterias fantasma son bacterias no vivas desprovistas de su contenido citoplasmático derivadas de bacterias Gram-negativas. La pared celular se mantiene, sin embargo, intacta con todos los componentes de superficie tales como fimbrias, flagelos y polisacáridos, los cuales proporcionan la habilidad de orientar a las bacterias hacia diferentes poblaciones celulares, incluyendo células dendríticas, macrófagos y células tumorales. Desde la perspectiva de la vacunación, las bacterias ofrecen la ventaja de presentar componentes tales como lipopolisacáridos (LPS) con propiedades immunoestimulantes.

En definitiva, las bacterias ofrecen un interesante potencial, sin embargo el hecho de que sean organismos patógenos dificulta el desarrollo clínico de esta estrategia terapéutica. Por otro lado, las bacterias GRAS que no sufren este problema ven limitado su ámbito de aplicación al tratamiento de enfermedades de superficies mucosas.

IV.a.2.2. Virus

Virus modificados genéticamente

Los virus han evolucionado de forma natural hacia sistemas que transfectan sus genes en el hospedador para conseguir de un modo eficiente su autorreplicación. Por tanto, no es sorprendente que los virus hayan sido exhaustivamente investigados como vectores de transfección en células. En particular los adenovirus y virus

adenoasociados, así como los retrovirus y lentivirus representan formas virales muy efectivas de transfección. Sin embargo, y a pesar de la abundantísima información al respecto, el mayor inconveniente ligado al uso de estos sistemas en terapia génica es el de su falta de selectividad y la consiguiente toxicidad.

Partículas virales

Las partículas virales, también denominadas VLP (Virus-Like Particles), están constituidas por agregados de cápside o proteínas de superficie presentes en los virus. Debido a la ausencia de material genético estas partículas no son infectivas y, además, ofrecen ventajas importantes en relación a los virus en el sentido en que su producción y escalado no entrañan complicaciones. Además, son muy resistentes frente a la desnaturalización y puede llevar moléculas asociadas.

Las VLP fueron desarrolladas inicialmente como alternativa a los virus atenuados, con el propósito de la vacunación. Por ejemplo, se obtuvieron mediante su expresión en levaduras VPL formadas por agregados de la proteína L1, presente en la cápside viral de HPV,. Estas partículas inducen una buena respuesta protectora frente a HPV y presentan una muy baja toxicidad, lo que llevo a su comercialización bajo los nombres de Gardasil (Merck) y Cervarix (GSK).

Pero estas proteínas virales pueden ser utilizadas además como vehículos transportadores de numerosas moléculas activas. De hecho, se ha visto la posibilidad de asociar covalentemente a dichas partículas fármacos antitumorales entre otros y se ha detectado un tropismo interesante hacia las células tumorales.

Virosomas

Los virosomas son vesículas esféricas de 20-150 nm constituidos por la membrana fosfolipídica de los viriones y determinadas glicoproteínas de superficie, pero carentes de proteínas de cápsides y de material genético. Se producen generalmente mediante un proceso de solubilización del virus influenza con un detergente y la subsiguiente reconstitución con dos glucoproteínas de superficie, en particular hemaglutinina y neuraminidasa. La presencia de estas proteínas aporta a los virosomas unas propiedades adyuvantes excepcionales, además de la capacidad de transportar fármacos y antígenos. Además, esas proteínas no solo confieren a los virosomas una estabilidad estructural sino también la posibilidad de una orientación selectiva (Lacadamialy et al., 2003) (Earp et al., 2005).

Desde hace tiempo los virosomas se han empleado como vehículos de antígenos. De este modo, se han diseñado vacunas frente al virus de la hepatitis A (Epaxal, Crucell) y el virus influenza (Invivac, Solvay e Inflexal, Crucell). Aunque se ha estudiado

también su aplicación como vehículos transportadores de fármacos, su aplicación en este sentido se ve limitada por el riesgo de respuesta inmunitaria.

De forma general, con respecto al uso de virus en terapéutica cabe decir que, a pesar del gran estudio de que han sido objeto, su aplicación clínica se ha visto limitada por los riesgos potenciales de mutagénesis y respuesta inmune. De todas las modalidades, las VLP y los virosomas son las que han dado lugar a desarrollos más avanzados en clínica.

IV.a.3. Exosomas

Los exosomas son vesículas fosfolipídicas extracelulares que transportan proteínas y ácidos nucleicos de célula a célula, desempeñando un papel primordial en la comunicación intercelular. Debido a su función específica de transporte de material de célula a célula y a su capacidad de orientación selectiva se ha pensado en su interés como sistemas naturales de transporte de fármacos. Sin embargo, dado que presumiblemente no todos los componentes de los exosomas son necesarios para cumplir la función de transporte, existe un interés creciente por el diseño de esas nanoestructuras de forma sintética, haciendo uso de la nanotecnología.

Los exosomas son vesículas de tamaño entre 40-100 nm empleadas en comunicación intercelular, sin embargo en situaciones patológicas, como por ejemplo en cáncer, la actividad aberrante de las células provoca la expulsión de un número mayor de exosomas que transportan elementos clave en proliferación y diseminación celular. En todo caso, y a pesar de que hay una serie de elementos comunes que se han identificado en los exosomas independientemente del tipo celular, como por ejemplo proteínas implicadas en procesos de dirección y adhesión celular (lactadherinas, integrinas y tetraspaninas), su perfil proteico, así como su perfil lipídico, varían dependiendo de su origen.

La aplicación fundamental propuesta para los exosomas es la de vehiculización de fármacos y material genético en cáncer. Sin embargo, a pesar de su atractivo, el uso de los exosomas derivados de células cancerígenas como estrategia terapéutica, se encuentra aún en un estadio preliminar. De hecho se han descrito funciones antagónicas sobre las que es necesario profundizar a fin de identificar los componentes esenciales del transporte y la liberación y poder así diseñar nanotransportadores bioinspirados artificiales. En esta línea innovadora de trabajo se centra la actividad de María de la Fuente, discípula a través de quien hemos conseguido afianzar nuestra colaboración con el servicio de oncología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

IV.b. Transportadores sintéticos bioinspirados, constituidos a partir de materiales naturales

IV.b.1. Liposomas

Los liposomas, descubiertos en el año 1965 de forma casual por el científico británico Alec Bangham, son los primeros nanovehículos propuestos para el transporte y la liberación de fármacos. Se caracterizan por estar formados por una doble capa de fosfolípidos que rodean a un núcleo acuoso, simulando así la estructura de las células. Hasta el momento se han diseñado una amplia variedad de liposomas constituidos a partir de diferentes tipos de fosfolípidos, otros lípidos tales como el colesterol, esfingomielinas y otros lípidos naturales, así como proteínas y polisacáridos.

Los liposomas han sido objeto de una gran atención en el mundo académico, contando en la actualidad con miles de artículos y patentes. Asimismo, esta actividad académica ha dado lugar al desarrollo de más de una docena de formulaciones comercializadas y numerosas formulaciones en ensayos clínicos. Entre las aplicaciones de que han sido objeto los liposomas incluyen tratamientos tales como el cáncer, infecciones fúngicas, y degeneración macular asociada a la edad.

IV.b.2. Nanopartículas y nanocápsulas

El origen de las nanopartículas elaboradas a partir de proteínas o polímeros biodegradables se le atribuye al científico suizo, Peter Speiser (Kreuter, 2007), quien es considerado como el padre de la nanotecnología farmacéutica. Esta idea fue desarrollada por primera vez por su discípulo Gerd Birrenbachn, quien obtuvo nanopartículas de poliacrilamida con la intención de utilizarlas como vehículos de vacunas (Birrenbach, 1973; Birrenbach y Speiser,1976). Seguidamente, el Prof. Speiser publicó la obtención de nanopartículas de gelatina y albúmina haciendo uso de procedimientos suaves y fácilmente escalables (Marti y Oppenheim, 1977; Marti y col. 1978). Curiosamente, aunque este trabajo tuvo inicialmente muy poca trascendencia, hemos de considerarlo como el punto de partida de la formulación de nanopartículas de albúmina destinada al tratamiento del carcinoma de mama que fue comercializada (Abraxane®) para el tratamiento del carcinoma de mama en 2.005 (Harries y col, 2005).

A pesar de las cuatro décadas de trayectoria de las nanopartículas elaboradas a partir de biopolímeros y proteínas, hasta las últimas dos décadas estos nanotransportadores no llegaron a alcanzar una atención significativa. En esta línea destacan muy especialmente las nanopartículas elaboradas a base de quitosano, desarrolladas por primera vez en mi grupo de investigación a finales de los 90 (Calvo et al., 1997; Garcia-Fuentes M. et al., 2012). Las aplicaciones de estas nanopartículas se

describen en el apartado siguiente. De forma global cabe decir que en la actualidad las nanopartículas de quitosano son las que han recibido mayor atención en la literatura científica, en el contexto de las nanopartículas poliméricas. En efecto, son miles los artículos que hacen referencia a las nanopartículas de quitosano elaboradas mediante el método de gelificación iónica, desarrollado por nosotros.

En cuanto a las nanocápsulas elaboradas a partir de materiales bioinspirados, destacan las constituidas por un núcleo oleoso, envuelto de un biopolímero como puede ser el quitosano o el ácido hialurónico. Como se recoge en el apartado siguiente, estas nanocápsulas desarrolladas en nuestro laboratorio, presentan un gran versatilidad ya que pueden estar constituidas por diferentes tipos de aceite y recubiertas por una o múltiples capas.

V. Aportaciones del grupo de investigación NANOBIOFÁRMACOS al diseño de nanotransportadores sintéticos bioinspirados

Utilizando como fuente de inspiración la naturaleza, nuestro grupo de investigación está especializado en el diseño racional de nanoestructuras destinadas a resolver problemas específicos de los fármacos. De este modo, los materiales utilizados son, en general, materiales bioinspirados por su comportamiento biológico y la forma en que se organizan dichos materiales, es decir su diseño estructural, está igualmente bioinspirado en el comportamiento de los micro-organismos y de diversas poblaciones celulares. Para cumplir este objetivo, las nanoestructuras están generalmente constituidas por un núcleo y una o varias cubiertas de biomateriales. La naturaleza del núcleo viene determinada por el tipo de molécula activa que se pretende incorporar en la estructura, así como por el perfil de liberación que se desea alcanzar en su diana terapéutica. Por otro lado, el/los material/es que forma/n la cubierta se elige/n tomando en consideración la función transportadora de la nanoestructura y las características del entorno biológico al que se ha de enfrentar. En la Figura 4 se muestran fotografías de nanopartículas y nanocápsulas con diferente composición en su núcleo y cubierta desarrolladas en nuestro laboratorio. Se puede apreciar cómo la textura superficial y la estructura interna pueden moldearse en función de la finalidad perseguida.

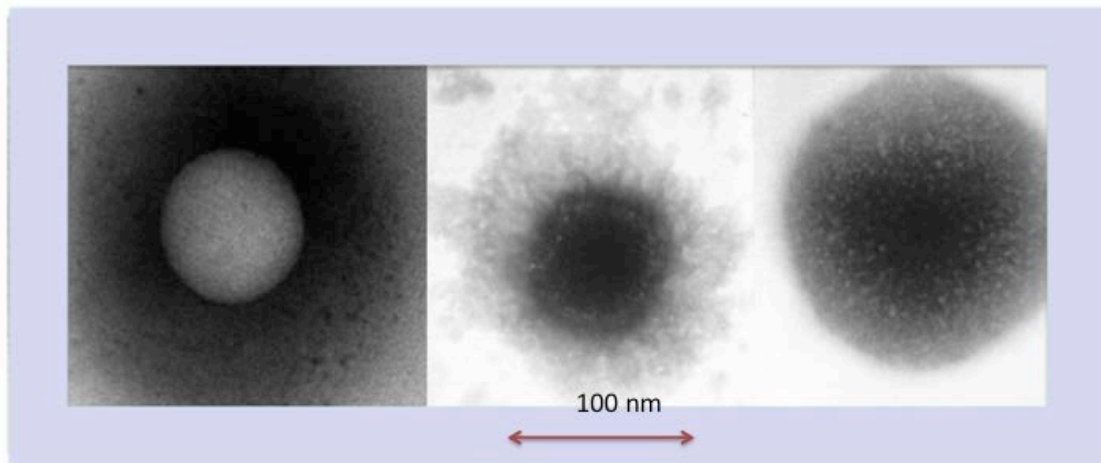


Figura 4. *Imágenes de nanopartículas (centro y derecha) y nanocápsulas (izquierda) elaboradas a partir del quitosano, observadas en el microscopio electrónico de transmisión.*

En nuestro afán por simular la naturaleza, recientemente hemos procedido al desarrollo de nanocápsulas flexibles y compartimentadas, es decir que poseen diferentes compartimentos en los que podemos alojar distintos ingredientes activos. Esta compartimentación se ha logrado gracias a la formación de múltiples capas, así como a la integración de cristales líquidos en el seno de un núcleo oleoso. En la Figura 5 se muestran ilustraciones de nanoestructuras, en las que se pueden encapsular diferentes moléculas activas y funcionales tanto en el núcleo como en las múltiples cubiertas. Así por ejemplo, en el núcleo se pueden alojar uno o más fármacos, antígenos o moléculas inmunomoduladoras (de interés en inmunoterapias y vacunación), mientras que en las cubiertas se pueden asociar fármacos adicionales y también moléculas funcionales responsables de la estabilización, del control de la liberación del fármacos o de la orientación selectiva de las nanoestructuras. Gracias a este tipo de estructura multicompartmental, es posible modular en tipo de exposición de los componentes activos (oculto en el núcleo o expuesto en la superficie), así como su liberación.

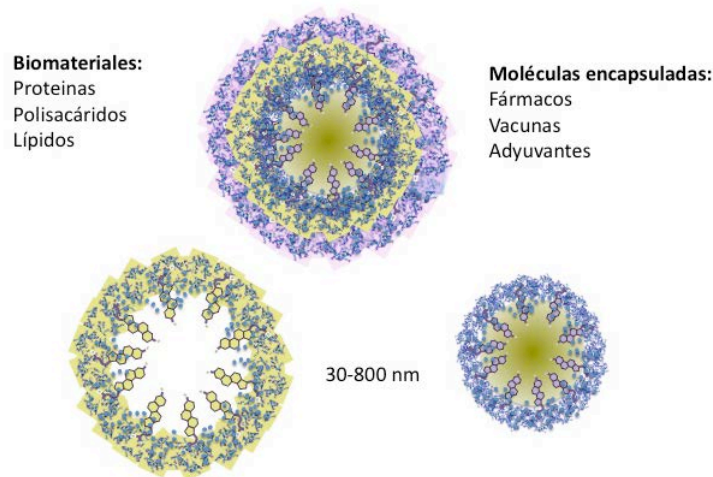


Figura 5. Ilustración de las nanocápsulas formadas por un núcleo oleoso y una o varias cubiertas poliméricas

V.a. Las nanocápsulas y nanopartículas de quitosano como sistemas de transporte a través de mucosas

El biopolímero quitosano atrajo mi atención a principios de la década de los 90 por sus propiedades bioadhesivas y permeabilizantes, pero también por su facilidad para gelificar. Haciendo uso de ese comportamiento procedimos al diseño de nanoestructuras con diferente composición y configuración estructural y, seguidamente, procedimos al estudio de su comportamiento biológico tras su administración por diferentes vías.

V.a.1. Administración por vía ocular

Tras la administración de nanopartículas fluorescentes por vía tópica a conejos procedimos a la evaluación de su adhesividad y capacidad de penetración corneal mediante microscopía confocal de fluorescencia y a través de su cuantificación por fluorimetría. Ambos estudios pusieron de manifiesto una importante interacción de dichas partículas con el epitelio corneal y conjuntival, quedando fundamentalmente retenidas en la primera capa de dicho epitelio.

Las citadas nanopartículas fueron utilizadas para facilitar la retención de la ciclosporina A, fármaco de interés en el tratamiento del ojo seco y de procesos inflamatorios a nivel de la superficie ocular. Las cantidades de ciclosporina adherida a la superficie corneal y conjuntival alcanzaron valores 5 veces superiores a los conseguidos tras la administración de la ciclosporina libre, dejando así evidencia del interés potencial de dicha formulación para tratar las patologías indicadas.

Años más tarde, procedimos al diseño de nanopartículas constituidas de quitosano y ácido hialurónico con la finalidad de utilizarlas como transportadores de material genético. Para evaluar esta capacidad utilizamos como molécula modelo el plásmido ADN codificador de la proteína fluorescente verde. Tras la instilación tópica de dichas nanopartículas pudimos observar, en el microscopio confocal, una intensa fluorescencia verde asociada a la expresión de la citada proteína (Figura 6). Fue interesante también comprobar que dicha fluorescencia se mantenía durante al menos 5 días.

En conjunto, los resultados obtenidos no dejaron lugar a dudas sobre la capacidad de las nanopartículas de quitosano para superar la membrana celular del epitelio corneal y conjuntival. Además dichas nanoestructuras mostraron una toxicidad muy baja tras la administración de dosis repetidas.

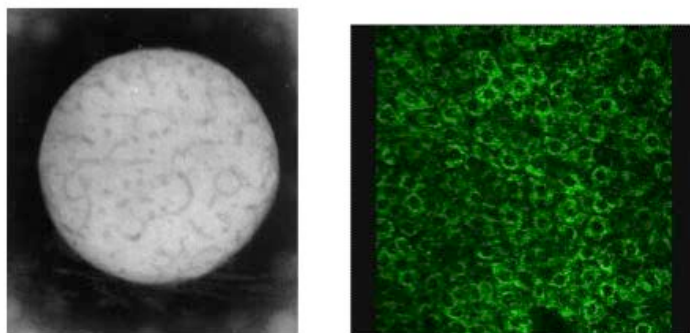


Figura 6. Imagen del epitelio corneal extraído del conejo (derecha) que fue tratado por vía tópica ocular con nanopartículas cargadas del plásmido DNA codificador de la proteína fluorescente verde (izquierda). La imagen, obtenida en el microscopio confocal muestra la eficiencia de transfección lograda con las nanopartículas.

V.a.2. Administración por vía nasal

Siendo conscientes de los problemas asociados a la administración parenteral de fármacos peptídicos y, de forma particular, de la insulina, nos propusimos explorar el potencial de las nanopartículas de quitosano para conseguir la absorción sistémica de dicho fármaco. Los resultados relativos a los valores de glucemia obtenidos en conejos tras la administración nasal de la insulina asociada a nanopartículas de quitosano, pusieron claramente de relieve la capacidad promotora de la absorción de dichas nanopartículas. En efecto, tras la administración de la insulina libre no se observó una respuesta apreciable, sin embargo, cuando la insulina se administra

asociada a las nanopartículas de quitosano, se apreció un pico rápido de descenso de glucosa.

Años más tarde, valoramos igualmente la respuesta conseguida con un nuevo prototipo de nanopartículas de quitosano, que contenían además ciclodextrinas atrapadas en su estructura. Una vez más los niveles de glucemia en conejos experimentaron un descenso significativo tras la administración de dicho prototipo, ilustrando de este modo el efecto cooperativo del quitosano y de las ciclodextrinas a la hora de incrementar la permeabilidad del epitelio de la mucosa nasal (Teijeiro et al., 2009).

Además de macromoléculas de carácter terapéutico, como es la insulina, nuestra atención se centró en la asociación de proteínas de naturaleza antigénica a nanopartículas de quitosano. Para ello, y contando con el apoyo de la Organización Mundial de la Salud (OMS), nos propusimos estudiar el comportamiento de la vacuna antitetánica administrada por vía nasal. Los resultados obtenidos mostraron la posibilidad de generar una respuesta inmune tras la administración de las nanopartículas por vía nasal; respuesta que fue muy superior a la conseguida tras la administración del antígeno libre (Vila et al., 2004). Igualmente, y a través de una colaboración con la Fundación Bill y Melinda Gates, pudimos poner de manifiesto la eficacia de esta estrategia para la administración de la vacuna de la hepatitis por vía nasal (Prego et al., 2010; Vicente et al., 2013) (Figura 7). En dicho proyecto trabajamos de forma consorciada con varios grupos americanos y también con la Dra. África González de la Universidad de Vigo. Finalmente, y una vez validado el valor de las nanopartículas de quitosano para la administración nasal de antígenos, nuestro objetivo más reciente se ha centrado en el desarrollo de una vacuna nasal frente al sida. Para cumplir con este propósito hemos establecido una colaboración con diversos grupos americanos y canadienses. Los resultados obtenidos hasta el momento como consecuencia de nuestra actividad en un consorcio canadiense son muy prometedores en cuanto que hemos podido detectar una importante respuesta de la vacuna asociada a nanopartículas, tras su administración en monos, por vía nasal.

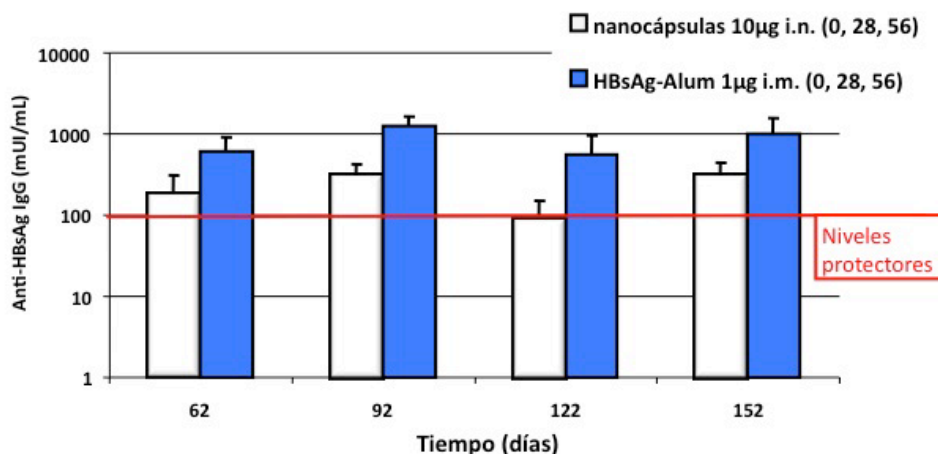


Figura 7.- Niveles de IgGs obtenidos tras la instilación por vía nasal de nanocápsulas de quitosano cargadas del antígeno de la hepatitis y tras la administración por vía intramuscular del mismo antígeno asociado al adyuvante fosfato de aluminio (formulación comercializada)

V.a.2. Administración por vía oral

A la luz de los resultados obtenidos tras la administración de nanopartículas de quitosano por vía nasal, nuestro interés se centró en un objetivo si cabe más ambicioso que es la adaptación de la tecnología a la administración oral de péptidos. En esta línea el primer objetivo a cumplir residía en mantener la estabilidad de las nanopartículas en fluidos intestinales. Al día de hoy han sido varios los prototipos con los que hemos logrado este objetivo, más concretamente las nanopartículas híbridas de quitosano y glucomanano, así como también los complejos fosfolípido-quitosano y las nanocápsulas lipídicas de quitosano (Prego et al., 2005; 2006). De los resultados presentados en la Figura 8, se puede concluir la capacidad de las nanopartículas de quitosano para mejorar la absorción de la insulina tras su administración por vía oral en ratas.

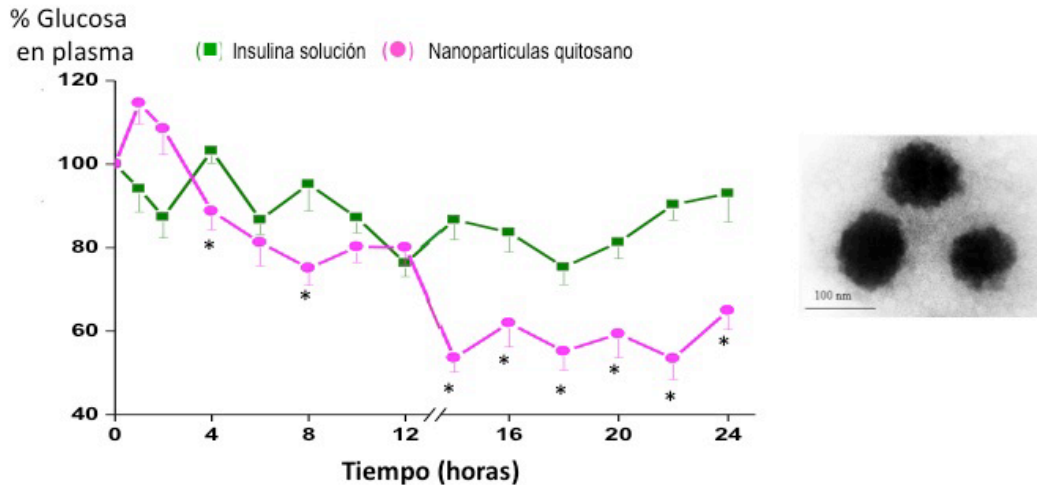


Figura 8. Niveles de glucosa obtenidos tras la administración oral en ratas de nanopartículas de quitosano-glucomanano (CS-GM) cargadas de insulina

En definitiva, a lo largo de 15 años de trabajo con este biomaterial, podemos decir que el quitosano ofrece oportunidades interesantes en el desarrollo de nanomedicamentos. Destaca, sin embargo, el hecho de que en la actualidad no exista ningún medicamento que contenga este biomaterial. Ello se justifica por los importantes requisitos regulatorios que se han de cumplir para la introducción en el mercado de un nuevo biomaterial que ha de ser asimilado por el organismo. De hecho, el quitosano se viene consumiendo desde hace décadas como producto para reducir la absorción de grasas, tras su administración por vía oral. También se ha utilizado por vía tópica en cosmética y en la forma de películas o fibras que favorecen la cicatrización de heridas y detienen hemorragias. En su uso como medicamento destacan una decena de formulaciones en fase de investigación clínica, entre las que se encuentra una formulación de lágrimas artificiales, una formulación nasal de morfina y una formulación de una vacuna.

V.b. Las nanocápsulas y nanopartículas de protamina como sistemas de transporte de antígenos

Movidos por los resultados obtenidos para las nanocápsulas de quitosano, recientemente mi grupo de investigación se ha dirigido a la búsqueda de biomateriales alternativos dotados, al igual que el quitosano, de una carga positiva. Inicialmente nuestro esfuerzo se centró en la poliarginina y, seguidamente, en la protamina, por ser un biomaterial de origen natural que contiene un 70% de arginina. La presencia de arginina en la protamina confiere a este material propiedades promotoras de la penetración, así como una alta capacidad para la adhesión y asociación de material genético, según se indicó en el apartado III.b.4.

Hasta el momento, hemos desarrollado diferentes prototipos de nanocápsulas y nanopartículas de protamina que han ido dirigidas a la asociación de antígenos y a su uso como vehículos para la inmunización (Gonzalez Aramundiz, 2013). Más recientemente, hemos explorado igualmente, en colaboración con el Dr. Merayo (Universidad de Oviedo, Clínica Fernández-Vega), el interés de estas nanocápsulas en el tratamiento de úlceras corneales. Aunque nuestros resultados en esta línea son aún preliminares, el perfil de estas nanocápsulas resulta muy prometedor para un amplio espectro de aplicaciones y, de forma particular como vehículos para promover el transporte de fármacos a través de barreras mucosas.

V.c. Las nanocápsulas de ácido hialurónico como sistemas de transporte de fármacos antitumorales

Por su origen natural y sus propiedades bioadhesivas, el ácido hialurónico ha suscitado una gran atención como biomaterial. Mi interés por el mismo vino inicialmente motivado por su atractivo para la vía oftálmica. Este interés se tradujo en el desarrollo de una formulación de nanopartículas de quitosano-ácido hialurónico para la terapia génica ocular referida en el apartado V.a.. Sin embargo, más recientemente, nos propusimos el desarrollo de nanocápsulas de ácido hialurónico dirigidas al transporte de fármacos antitumorales (Oyarzun-Ampuero et al., 2013). El diseño racional de estas nanoestructuras estuvo motivado por el hecho de que las células tumorales, en general, sobre-expresan el receptor CD44 por el que presenta una gran afinidad el ácido hialurónico. Estudios actualmente en curso nos permitirán valorar el potencial de esta estrategia.

VI. Conclusiones y perspectivas futuras

En definitiva, el conocimiento acumulado hasta el momento en el ámbito de la nanotecnología farmacéutica, nos permite concluir que la naturaleza se presenta como una fuente inagotable de inspiración en el diseño de nanomedicamentos. Nos inspira en el proceso de identificación de nuevos biomateriales en base a sus funciones biológicas, a la vez que nos inspira en el proceso de diseño de nanoestructuras capaces de transportar fármacos en nuestro organismo. Sin duda, la mayor limitación hacia el progreso en este ámbito reside en el todavía limitado conocimiento de la naturaleza y de forma particular de nuestra biología. El progreso en estos ámbitos y el ejercicio de una investigación transdisciplinar marcarán la evolución en el desarrollo de nuevos nanomedicamentos. Por tanto, cabe pensar que es en la intersección del conocimiento biológico y en el desarrollo de nuevos materiales y nanotecnologías

donde se encontrará la clave para futuros hallazgos que marcarán la innovación en el mundo del nanomedicamento.

REFERENCIAS

Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C., Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* 13, 238 (1965).

Szoka F., Papahadjopoulos D., Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9, 467 (1980).

Birrenbach G., Speiser P.P., Polymerized micelles and their use as adjuvants in Immunology, *J. Pharm. Sci.*, 65, 1763 (1976).

Birrenbach G., Über Mizellpolymerisate, mögliche Einschulussverbindungen (Nanokapseln) und deren Eignung als Adjuvatien, Dissertation ETH, Zürich, 5071 (1973).

Gabizon A., Papahadjopoulos D., Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake in tumours, *Proc. Natul. Acad. Sci.*, 85, 6949 (1988).

Martin F. J., Hubbell W.L., Papahadjopoulos D., Immunospecific targeting of liposomes to cells: a novel and efficient method for covalent attachment of Fab' fragments via disulfide bonds, *Biochemistry*, 20, 4229-4238 (1981).

Marty J.J., Oppenheim R.C., Speiser P., Nanoparticles-a new colloidal drug delivery system, *Pharm. Acta Helv.*, 53, 17 (1978)

Akin, D. et al. Bacteria-mediated delivery of nanoparticles and cargo into cells. *Nature Nanotechnol.* 2, 441-449 (2007).

Baldrick, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56, 290-299 (2010).

Balhorn, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 8, 227 (2007).

Bhattacharya, S., Mazumder, B. Virosomes: A novel strategy for drug delivery and targeting. *Biopharm International Supp.* 24, 9-14 (2011).

Calvo, P., Remuñan-López, C., Vila-Jato J. L. & Alonso, M. J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.* 14, 1431-1436 (1997).

Calvo P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan coated polyester nanocapsules and submicronemulsions. *Colloid Polym. Sci.* 275, 46-53 (1997).

Chambers, E. & Mitragotri, S. Long circulating nanoparticles via adhesion on red blood cells: mechanism and extended circulation. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 232, 958-966 (2007).

De Campos, A.M., Sanchez, A. & Alonso, M. J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* 224,159-168 (2001).

De Campos, A. M., Diebold, Y., Carvalho, E. L. S., Sanchez, A. & Alonso, M. J. Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: in vitro stability, in vivo fate, and cellular toxicity. *Pharm. Res.* 21, 803-810 (2004).

De la Fuente, M., Seijo, B. & Alonso, M. J., Design of novel polysaccharidic nanostructures for gene delivery. *Nanotechnology* 19, 075105 (2008).

De la Fuente, M., Seijo B. & Alonso, M. J. Bioadhesive hyaluronan–chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue. *Gene Ther.*15, 668-676 (2008).

De la Fuente, M., Seijo, B. & Alonso, M. J. Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy. *Invest. Ophtha Imol. Vis. Sci.* 49, 2016-2024 (2008).

De la Fuente, M., Seijo, B. & Alonso, M. J. Bioadhesive hyaluronan-chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue. *Gene Ther.* 15, 668-676 (2008).

Dou, H. et al. Development of a macrophage-based nanoparticle platform for antiretroviral drug delivery. *Blood* 108, 2827-2835 (2006).

Earp, L. J., Delos, S. E., Park, H. E. & White, J. M. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 285, 25–66 (2005).

Fernandez-Urrusuno, R., Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L. & Alonso, M. J. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* 16, 1576-1581 (1999).

Garcia-Fuentes, M. & Alonso, M. J. Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand?. *J. Control. Release* 161, 496-504 (2012).

Girish, K. S. & Kemparaju, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 80, 1921-1943 (2007).

Gonzalez Aramundiz, J. V. Nuevos nanosistemas a base de protamina para la liberación de antígenos. Tesis doctoral (2013)

Gradishar, W. J. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opin. Pharmacotherapy* 7, 1041, 2006

Janthur, W., Cantoni, N. & Mamot, C. Drug conjugates such as antibody drug conjugates (ADCs), Immunotoxins and immunoliposomes challenge daily clinical practice. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 16020 (2012).

Jin-Wook Yoo et al. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 521-535 (2011).

Kooijmans, S. A., Vader, P., van Dommelen, S. M., van Solinge, W. W., Schiffelers, R. M. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *Int. J. Nanomedicine* 7, 1525-1541 (2012).

Kundua, B., Kurlandb, N. E., Banoa, S., Patrac, C., Engelc, F. B., Yadavallib, V.K., , , Kundua, S. C. Silk proteins for biomedical applications: Bioengineering perspectives. *Progress in Polymer Science* 39, 251-267 (2014).

Lakadamyali, M., Rust, M. J. & Zhuang, X. Endocytosis of influenza viruses, *Microbes Infect.* 6, 929-936 (2004).

Li, H., Guo, L., Li, J., Liu, N., Qi R. & Liu J. Expression of hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in stomach cancers: relevance with tumor progression. *Int. J. Oncol.* 17, 927-959 (2000).

Magnani, M. & Rossi, L. Approaches to erythrocyte-mediated drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 11, 677 (2014).

Mayr, U. B., Walcher, P., Azimpour, C., Riedmann, E., Haller, C., Lubitz, W. Bacterial ghosts as antigen delivery vehicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1381-1391 (2005).

Murciano, J. C. et al. Prophylactic fibrinolysis through selective dissolution of nascent clots by tPA-carrying erythrocytes. *Nature Biotech.* 21, 891-896 (2003).

Muzykantov, V. R. Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 403-427 (2010).

Nezhadi, S. H., Choong P. F. M., Lotfipour, F. & Dass, C. R. Gelatin-based delivery systems for cancer gene therapy. *J. Drug Target.* 17, 731 (2009).

Oyarzun-Ampuero, F. A., Rivera-Rodríguez, G. R., Alonso, M.J. & Torres, D. Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49, 483-490 (2013).

Prego, C., Garcia, M., Torres, D. & Alonso, M. J. Transmucosal macromolecular drug delivery. *J. Control. Release* 101, 151-162 (2005).

Prego, C., Torres, D. & Alonso, M. J. Chitosan nanocapsules as carriers for oral peptide delivery: effect of chitosan molecular weight and type of salt on the in vitro behaviour and in vivo effectiveness. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 2921-2928 (2006).

Prego, C., Torres, D., Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Quinoa, E. & Alonso, M. J. Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery — Effect of chitosan pegylation degree. *J. Control. Release* 111, 299-308 (2006).

Prego, C., Fabre, M., Torres, D. & Alonso, M. J. Efficacy and mechanism of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery. *Pharm. Res.* 23, 549-556 (2006).

Prego, C., Paolicelli, P., Diaz, B., Vicente, S., Sanchez, A., Gonzalez-Fernandez, A. et al. Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. *Vaccine* 28, 2607-2614 (2010).

Reguera-Nuñez, E., Roca, C., Hardy, E., de la Fuente, M., Csaba, N., & Garcia-Fuentes, M. Implantable controlled release devices for BMP-7 delivery and suppression of glioblastoma initiating cells. *Biomaterials* 35, 2859-2867 (2014).

Reynolds, F., Weissleder, R. & Josephson, L. Protamine as an efficient membrane-translocating peptide. *Bioconjug Chem.* 16,1240-1245 (2005).

Roger, M. et al. Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for delivery of nanoparticles to brain tumors. *Biomaterials* 31, 8393-8401 (2010).

Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A. & Dudley, M. E. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Rev. Cancer* 8, 299-308 (2008).

Santoroa, M., Tatarab, A. M., Mikos, A. G. Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. *J. Control. Release* 190, 210 (2014).

Shi, P., Gustafson, J. A. & MacKay, A. Genetically engineered nanocarriers for drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* 9, 1617–1626 (2014).

Sripriyalakshmi, S., Jose, P., Ravindran, A., Anjali, C. H. Recent trends in drug delivery system using protein nanoparticles. *Cell Biochem. Biophys.* 70, 17 (2014).

Teijeiro-Osorio, D., Remunan-Lopez, C. & Alonso, M. J. New generation of hybrid poly/oligosaccharide nanoparticles as carriers for the nasal delivery of macromolecules. *Biomacromolecules* 10, 243-249 (2009).

Trapani, A., Lopodota, A., Franco, M., Cioffi, N., Ieva, E., Garcia-Fuentes, M. et al. A comparative study of chitosan and chitosan/cyclodextrin nanoparticles as potential carriers for the oral delivery of small peptides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75, 26–32 (2010).

Van Braeckel-Budimir, N. Bacterium-like particles for efficient immune stimulation of

existing vaccines and new subunit vaccines in mucosal applications. *Front Immunol.* 4, 282 (2013).

Vicente, S., Peleteiro, M., Díaz-Freitas, B., González-Fernández, A., Sanchez, A. & Alonso, M. J. Co-delivery of viral proteins and TLR7 agonist from polysaccharide nanocapsules: a needle-free vaccination strategy. *J. Control. Release* 172, 773-781 (2013).

Vila, A., Sanchez, A., Janes, K., Behrens, I., Kissel, T., Vila-Jato, J.L. et al. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 123–131 (2004).

Yucela, T., Lovetta, M. L., Kaplana, D. L. Silk-based biomaterials for sustained drug delivery, *J. Control. Release* 190, 381 (2014).