

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica**



**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE MICROESFERAS  
BIODEGRADABLES DE AGENTES NEUROPROTECTORES  
PARA EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS  
DEGENERATIVAS QUE AFECTAN AL SEGMENTO  
POSTERIOR DEL OJO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Patricia Checa Casalengua**

Bajo la dirección de los doctores  
Rocío Herrero Vanrell  
Irene Bravo Osuna mpero

**Madrid, 2012**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica**



**TESIS DOCTORAL**

**Diseño y evaluación de microesferas biodegradables de agentes neuroprotectores para el tratamiento de patologías degenerativas que afectan al segmento posterior del ojo**

**Patricia Checa Casalengua**

**Madrid, 2012**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica**



**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID PRESENTADA POR**

**Patricia Checa Casalengua**

**Bajo la dirección de las doctoras**

**Rocío Herrero Vanrell  
Irene Bravo Osuna**

**Madrid, 2012**



DRA. ROCÍO HERRERO VANRELL Y DRA. IRENE BRAVO OSUNA,  
PROFESORAS TITULAR Y AYUDANTE DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE  
FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DE LA FACULTAD DE  
FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**CERTIFICAN:**

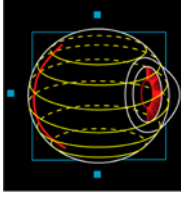
Que la presente memoria titulada "Diseño y evaluación de microesferas biodegradables de agentes neuroprotectores para el tratamiento de patologías degenerativas que afectan al segmento posterior del ojo" ha sido elaborada bajo su dirección por la Licenciada en Farmacia Dña. Patricia Checa Casalengua en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y, hallándose concluída, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para así conste, expiden y firman la presente certificación en Madrid a 30 de Abril de 2012.

Fdo: Rocío Herrero Vanrell

Fdo: Irene Bravo Osuna





THE SCHEPENS  
EYE RESEARCH  
INSTITUTE



An Affiliate of

**Harvard Medical School**

---

MICHAEL J. YOUNG Ph.D.

de Gunzburg Director, Minda de Gunzburg Research Center  
for Retinal Transplantation

Re: Patricia Checa Casalengua

Friday, October 28, 2011

To Whom It May Concern:

This letter is to confirm that Patricia Checa Casalengua has been a visiting scientist in my laboratory at the Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School, from August 1-October 31 2011. During her time in the lab, Patricia has worked on novel strategies aimed at neuroprotection in the diseased retina. Drug delivery approaches using microparticles have been evaluated for efficacy in isolated retinal neurons.

Sincerely,

Michael J. Young, PhD



## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han acompañado y prestado su ayuda en el largo camino recorrido hasta finalizar esta Tesis Doctoral:

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Irene T. Molina Martínez y al Dr. Juan José Torrado Durán, Directores del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica durante los años en los que he desarrollado esta Tesis Doctoral, por haberme permitido la realización de la misma en el departamento.

A las Doctoras Rocío Herrero Vanrell e Irene Bravo Osuna, directoras de esta tesis doctoral, y a la Dra. Irene T. Molina Martínez, a la que siempre he considerado una directora más, les quiero agradecer la oportunidad que me han dado de trabajar en su grupo de investigación, su confianza, sus consejos y su dedicación. Gracias por vuestro constante apoyo tanto profesional como personal.

Al Dr. Michael J. Young, del Departamento de Oftalmología del Schepens Eye Research Institute de la Facultad de Medicina de la Universidad de Harvard, y a todo su equipo, entre ellos el Dr. Budd A. Tucker del Departamento de Oftalmología del Institute for Vision Research de la Facultad de Medicina de la Universidad de Iowa, les agradezco su inestimable trabajo en los estudios *in vivo* y de bioactividad desarrollados en esta tesis. No cabe duda de que su participación ha enriquecido el trabajo realizado.

De forma especial también quiero agradecer al Dr. Michael J. Young el haberme permitido realizar una estancia científica en su centro. Él y todo su grupo me acogieron de una manera excepcional e hicieron más fáciles mis días en Boston. Muchas gracias por permitirme vivir esta experiencia tan importante para mi formación como investigadora.

A Alberto Bartolomé y al Dr. Carlos Guillén, ambos del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, les agradezco su inestimable ayuda en los ensayos de electroforesis. Gracias por recibirme siempre con una sonrisa, ha sido un placer trabajar con vosotros.

Asimismo, quiero agradecer a la Comunidad de Madrid la concesión del contrato de Personal Investigador de Apoyo en el marco del IV Plan de Investigación Científica e Innovación Tecnológica, gracias al cual he podido realizar esta Tesis Doctoral.

Para todos mis compañeros y amigos del Departamento, los que continúan y los que ya se fueron, sólo tengo palabras de agradecimiento. Gracias a todos por vuestra comprensión, amistad y ayuda prestada durante estos años. Especialmente, quiero agradecer a mis compañeras de laboratorio los buenos momentos compartidos, de cada una de vosotras he aprendido algo y gracias a vuestra calidad humana el día a día ha sido más sencillo.

Por último, mi agradecimiento más profundo es para mi familia. A mis padres, por su entrega, apoyo incondicional y sabios consejos, por dar todo a sus hijos y enseñarnos las cosas verdaderamente importantes en la vida. A mi abuelo, por creer en mí y sentirse orgulloso de lo que soy y de lo que hago. A mi hermano, por ser un ejemplo de trabajo, constancia y tenacidad, por su cariño y su compañía durante todos estos años. A mi novio, por su generosidad y paciencia, por estar a mi lado en los momentos difíciles y llenar de ilusión mi presente y mi futuro.

*A mi abuelita,  
siempre estarás en mi corazón.*



## RESUMEN

Las patologías neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo se caracterizan por ser devastadoras y comprometer la visión en un gran número de sujetos. Representan un grupo de enfermedades que cursan con un daño progresivo del nervio óptico y pérdida de fotorreceptores y células ganglionares de la retina (CGR), que sin un tratamiento continuado, pueden conducir a ceguera irreversible. Las nuevas tendencias en el tratamiento de estas enfermedades neurodegenerativas oculares están basadas en la neuroprotección, siendo la administración de factores neurotróficos una de las estrategias más prometedoras. Al tratarse de patologías que presentan una etiología multifactorial, el tratamiento combinado con distintos agentes terapéuticos (agentes neuroprotectores y antioxidantes) que actúen sobre los diversos mecanismos implicados en la patogénesis puede resultar de gran utilidad. Debido a que este tipo de afecciones son generalmente crónicas, se hace patente la necesidad de formas de administración oftálmicas capaces de proporcionar concentraciones terapéuticas de las sustancias activas en su lugar de acción durante periodos de tiempo prolongados que permitan disminuir el número de administraciones. Además, si el sistema desarrollado es biodegradable, desaparecerá una vez ejercido su efecto, evitando así un proceso quirúrgico al ser retirado.

El desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha basado en el diseño de nuevas formulaciones de terapia combinada, microesferas biodegradables cargadas con agentes neuroprotectores (GDNF, Factor Neurotrófico Derivado de la línea celular Glial y BDNF, Factor Neurotrófico Derivo del Cerebro) y vitamina E como agente antioxidante, para el tratamiento de patologías neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo. Para esto, se ha desarrollado un nuevo método de microencapsulación con el objeto de preservar la integridad del producto biotecnológico encapsulado. Posteriormente, se ha procedido a la esterilización de las formulaciones, puesto que están destinadas a ser administradas por vía intravítrea, proponiendo la combinación de distintos recursos tecnológicos que atenuaran la degradación del factor neuroprotector. Finalmente, se ha evaluado el posible efecto

antiangiogénico con el empleo de estas nuevas formulaciones. En este caso, se han encapsulado dos factores neurotróficos (GDNF y BDNF) junto con vitamina E. Cada uno de estos trabajos ha sido objeto de una publicación científica.



## INDICE

<b>FINANCIACIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>DIVULGACIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
1.1 Anatomofisiología ocular .....	17
1.2 Vías de administración de fármacos para el tratamiento de patologías oftálmicas .....	22
1.2.1 Administración tópica .....	23
1.2.2 Administración por vías que implican efecto sistémico .....	26
1.2.3 Administración periocular .....	26
1.2.4 Administración intravítrea .....	29
1.3 Sistemas de liberación controlada de fármacos por vía oftálmica .....	30
1.3.1 Liposomas .....	31
1.3.2 Nano- y micropartículas .....	32
1.3.3 Implantes .....	36
1.4 Patologías degenerativas que afectan al segmento posterior del ojo .....	42
1.4.1 Degeneración macular asociada a la edad (DMAE) .....	42
1.4.2 Glaucoma .....	44
1.4.3 Retinopatía diabética (RD) .....	47
1.4.4 Retinosis pigmentaria (RP).....	49
1.4.5 Neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL) .....	51

1.5 Neuroprotección ocular.....	52
1.5.1 Prevención de la excitotoxicidad inducida por glutamato ..	54
1.5.2 Prevención de la disfunción mitocondrial .....	55
1.5.3 Administración de agentes antioxidantes .....	56
1.5.4 Prevención de la agregación proteica .....	58
1.5.5 Administración de agentes antiinflamatorios .....	59
1.5.6 Administración de factores neurotróficos exógenos .....	60
1.6 Factores neurotróficos: GDNF y BDNF .....	62
1.7 Vitamina E.....	65
1.8 Técnicas de microencapsulación de fármacos.....	68
1.8.1 Encapsulación de proteínas .....	71
<b>2 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....</b>	<b>77</b>
<b>3 OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO .....</b>	<b>81</b>
3.1 Microesferas de PLGA cargadas con GDNF y Vit E elaboradas mediante un nuevo sistema de microencapsulación, incrementan la supervivencia de células ganglionares de la retina en un modelo experimental de glaucoma .....	84
3.2 Estrategias tecnológicas para mantener la actividad biológica de las proteínas tras su encapsulación y esterilización mediante radiación gamma.....	85
3.3 Actividad antiangiogénica de la combinación de un agente neuroprotector y un antioxidante (GDNF-Vitamina E) encapsulados en un nuevo sistema de cesión en forma de microesferas.....	87
3.4 Ensayos preliminares de encapsulación de GDNF en microesferas de PLGA. Efecto de la vitamina E como coadyuvante en la microencapsulación de proteínas para administración intravítrea .....	88

3.5 Integración celular permanente a partir del trasplante conjunto de microesferas biodegradables de PLGA cargadas con MMP2 y células progenitoras de la retina .....	89
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>93</b>
4.1 Retinal ganglion cells survival in a glaucoma model by GDNF/Vit E PLGA microspheres prepared according to a novel microencapsulation procedure .....	93
4.2 Preservation of biological activity of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) after microencapsulation and sterilization by gamma irradiation .....	123
4.3 Anti-angiogenic effect of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)-vitamin E combination encapsulated in a novel microsphere delivery system .....	155
4.4 Vitamin E effect as coadjuvant in protein microencapsulation for intravitreal administration .....	183
4.5 Robust cell integration from co-transplantation of biodegradable MMP2-PLGA microspheres with retinal progenitor cells .....	205
<b>5 DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>235</b>
<b>6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>253</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>257</b>



## FINANCIACIÓN

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias al apoyo económico recibido de diferentes organismos públicos que han financiado los siguientes proyectos de investigación que se señalan a continuación y en los que he participado como personal investigador:

- Funcionalización de polímeros para la fabricación de productos biomédicos avanzados (BIOAVAN). (Ministerio de Educación y Ciencia, PSE-300-100-2006-1, Subproyecto PSS-300-100-2006-4).

- Funcionalización de polímeros para la fabricación de productos biomédicos avanzados (BIOAVAN). (Ministerio de Educación y Ciencia, PSE-300-100-2006-1, Subproyecto PSS-300-100-2006-5).

- Funcionalización de polímeros para la fabricación de productos biomédicos avanzados (BIOAVAN). (Ministerio de Educación y Ciencia, PSE-300100-2007-4, Subproyecto PSS-300-100-2007-13).

- Red Temática de investigación cooperativa. Instituto de Salud Carlos III. Red Patología ocular del envejecimiento, calidad visual y calidad de vida. RETICS. (Ministerio de Sanidad y Consumo, RD07/0062/2002).

- Diseño y evaluación de sistemas microparticulares biodegradables de agentes neuroprotectores para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares. (Ministerio de Ciencia e Innovación, MAT2010-18242, Subprograma MAT).

En lo que respecta a la financiación personal, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral he disfrutado de las siguientes becas:

- Beca Art. 83 LOU. Proyecto NANOFARMA. Programa de Consorcios Estratégicos Nacionales de Investigación Técnica (CENIT). Subproyecto: "Estudios biofarmacéuticos y farmacocinéticos de medicamentos" con FAES

FARMA S.A. (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industria (CDTI).  
Ministerio de Industria, Turismo y Comercio) (2007-2009).

- Contrato de Personal Investigador de apoyo (Comunidad de Madrid).  
Proyecto de Investigación: Desarrollo de microesferas biodegradables de  
administración intraocular para el tratamiento neuroprotector precoz del  
glaucoma (2009-actualidad).

- Ayuda complementaria otorgada por el Dr. Michael J Young para la  
realización de la estancia breve de 3 meses en el Schepens Eye Research  
Institute, Harvard Medical School, Harvard University (Agosto-Octubre 2011).

## **DIVULGACIÓN CIENTÍFICA**

El trabajo desarrollado durante esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- Retinal ganglion cells survival in a glaucoma model by GDNF/Vit E PLGA microspheres prepared according to a novel microencapsulation procedure. Checa-Casalengua P, Jiang C, Bravo-Osuna I, Tucker BA, Molina-Martínez IT, Young MJ, Herrero-Vanrell R. *Journal of Controlled Release*, 2011 156:92-100.

- Preservation of biological activity of Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) after microencapsulation and sterilization by gamma irradiation. P. Checa-Casalengua, C. Jiang, I. Bravo-Osuna, B. A. Tucker, I.T. Molina-Martínez, M.J. Young, R. Herrero-Vanrell. Enviado a *International Journal of Pharmaceutics*.

- Anti-angiogenic effect of Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)-vitamin E combination encapsulated in a novel microsphere delivery system. P. Checa-Casalengua, C. V. Regatieri, I. Bravo-Osuna, I.T. Molina-Martínez, M.M. Puebla-Gonzalez, R. Herrero-Vanrell, M. J. Young. Enviado a *Investigative Ophthalmology & Visual Science*.

- Vitamin E effect as coadjuvant in protein microencapsulation for intravitreal administration. P. Checa-Casalengua, C.G. García-Caballero, I.T. Molina-Martínez, R. Herrero-Vanrell, I. Bravo-Osuna. Enviado a *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (Note)*.

Además, he participado en el siguiente trabajo de investigación:

- Robust cell integration from co-transplantation of biodegradable MMP2-PLGA microspheres with retinal progenitor cells. J. Yao, B.A. Tucker, X. Zhang, P. Checa-Casalengua, R. Herrero-Vanrell, M.J. Young. *Biomaterials*, 2011 32(4):1041-1050.

El trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral ha sido presentado a los siguientes congresos:

- Sterilized GDNF microspheres for intraocular administration. Influence of Vitamin E addition. P. Checa-Casalengua, I. Bravo-Osuna, C. Jiang, B.A. Tucker, I.T. Molina-Martínez, M.J. Young, R. Herrero-Vanrell. ARVO 2011 Annual Meeting, Florida, EEUU. (Comunicación en panel).

- Effects of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) releasing Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) microparticles on retinal progenitor cells (RPCs). J. Yang, J. Wang, P. Checa-Casalengua, I.T. Molina-Martínez, R. Herrero-Vanrell, H. Klassen. ARVO 2011 Annual Meeting, Florida, EEUU. (Comunicación en panel).

- The anti-angiogenic effect of Human Glial Derived Neurotrophic Factor: A study using a novel microsphere delivery system. M. G. Trese, C.V. Regatieri, B.A. Tucker, R. Herrero-Vanrell, P. Checa-Casalengua, M.J. Young. ARVO 2011 Annual Meeting, Florida, EEUU. (Comunicación en panel).

- Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) enriched Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) microspheres suppress apoptosis *in vitro*. S. Kamjoo, V.R. Sharma, J. Yang, P. Checa-Casalengua, I.T. Molina-Martínez, R. Herrero-Vanrell, G. A. Limb, H. Klassen, M.C. Kenney, B.D. Kuppermann. ARVO 2011 Annual Meeting, Florida, EEUU. (Comunicación en panel).

- Sterilized GDNF microspheres for intraocular administration. Influence of Vitamin E addition. P. Checa-Casalengua, I. Bravo-Osuna, C. Jiang, B.A. Tucker, I.T. Molina-Martínez, M.J. Young, R. Herrero-Vanrell. 2011 Pan-American Research Day. Florida, EEUU. (Comunicación Oral).

- Micropartículas de PLGA cargadas con GDNF para el tratamiento de enfermedades degenerativas del nervio óptico. Influencia de la adición de vitamina E. P. Checa-Casalengua, I. Bravo-Osuna, B.A. Tucker, M.J. Young, M.M. Puebla González, I.T. Molina Martínez, R. Herrero-Vanrell. X Congreso

de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica. Madrid, España, 2011. (Comunicación en panel).

- Release rate of GDNF form PLGA microspheres for the treatment of neural degenerative diseases. Influence of Vitamin E addition. P. Checa-Casalengua, I. Bravo-Osuna, B.A Tucker, I.T. Molina-Martínez, M.J Young, R. Herrero-Vanrell. ARVO 2010 Annual Meeting. Florida, EEUU. (Comunicación en panel).

- Release rate of GDNF form PLGA microspheres for the treatment of neural degenerative diseases. Influence of Vitamin E addition. P. Checa-Casalengua, I. Bravo-Osuna, B.A Tucker, I.T. Molina-Martínez, M.J Young, R. Herrero-Vanrell. 2010 Pan-American Research Day. Florida, EEUU. (Comunicación oral).

- Nuevas formulaciones de agentes neuroprotectores para el tratamiento del glaucoma. I. Bravo-Osuna, P. Checa-Casalengua, I.T. Molina-Martínez, R. Herrero-Vanrell. Reunión de Farmacólogos de la Comunidad de Madrid. Madrid, España, 2010. (Comunicación oral).

- Microspheres for Retinal Diseases. R. Herrero-Vanrell, I. Bravo-Osuna, D. Barbosa, P. Checa-Casalengua,, I.T. Molina-Martínez. The 8th International Symposium on Ocular Pharmacology and Therapeutics. Roma, Italia, 2009. (Comunicación oral).

- PLGA microparticles loaded with neuroprotective agents (GDNF and BDNF) for intraocular administration. R. Herrero-Vanrell, P. Checa-Casalengua, B.A. Tucker, I.T. Molina-Martínez, M.J. Young, I. Bravo-Osuna. ARVO Summer Eye Reserch Conference. Maryland, EE.UU, 2009. (Comunicación en panel)

- PLGA microparticles loaded with neuroprotective agents (GDNF and BDNF). A potential treatment for glaucoma. R. Herrero-Vanrell, P. Checa-Casalengua, I.T. Molina-Martínez, B.A. Tucker, M.J. Young, I. Bravo-Osuna. ARVO 2009 Annual Meeting. Florida, EE.UU. (Comunicación en panel).

- Sterilization of GDNF-PLGA microparticles for intraocular administration. D.Barbosa, P. Checa-Casalengua, I. Bravo-Osuna, B.A. Tucker, M.J. Young, R. Herrero-Vanrell. ARVO 2009 Annual Meeting. Florida, EE.UU. (Comunicación en panel).

- Micropartículas de PLGA cargadas con agentes neuroprotectores (GDNF y BDNF). Un tratamiento potencial para el glaucoma. P. Checa-Casalengua, I. Bravo-Osuna, I.T. Molina Martínez, B. Tucker, M.J. Young, R. Herrero-Vanrell. IX Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica. Pamplona (Navarra, España), 2009. (Comunicación oral).

- Sustained release of glial cell-line derived neurotrophic factor from PLGA microparticles. A new strategy for glaucoma treatment. P. Checa-Casalengua, I. Bravo-Osuna, S. Sacristán de la Odra, M.J. Young, I.T. Molina Martínez, R. Herrero-Vanrell. VIII Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery. Alcalá de Henares (Madrid, España), 2008. (Comunicación oral).

- GDNF-loaded PLGA microparticles for glaucoma treatment. In vitro release. R. Herrero-Vanrell, P. Checa-Casalengua, S. Sacristán, I.T. Molina-Martínez, M.J. Young, M.F. Refojo, I. Bravo-Osuna. ARVO 2008 Annual Meeting. Florida, EE.UU. (Comunicación en panel).

- Effect of Experimental Parameters on the preparation of BSA loaded GDNF PLGA/VitE microparticles. S. Sacristán de la Odra, I. Bravo-Osuna, P. Checa-Casalengua, M. Lucena-Rodriguez, I.T. Molina-Martínez, R. Herrero-Vanrell. 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Barcelona, España, 2008. (Comunicación en panel).

- GDNF-loaded PLGA microparticles for intravitreal administration. Effect of BSA on the in-vitro release. Checa-Casalengua, P, Bravo-Osuna I, Sacristán S, Molina-Martínez I.T, Young M.J., Herrero-Vanrell R. 7th International Symposium on Ocular Pharmacology and Therapeutics. Budapest, Hungría, 2007. (Comunicación en panel).

## ABREVIATURAS

<b>A/O/A</b>	Acuo-óleo-acuosa
<b>A/O</b>	Acuo-oleosa
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>NeuN</b>	Núcleo neuronal
<b>ARPE-19</b>	Células Adultas del Epitelio Pigmentario de la Retina ( <i>Adult human retinal pigment epithelial cells</i> )
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BDNF</b>	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro ( <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina Serica Bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>BSS</b>	Solución Salina Balanceada ( <i>Buffer Saline Solution</i> )
<b>CGR</b>	Células Ganglionares de la Retina
<b>CMH</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>CMVH</b>	Citomegalovirus humano
<b>CNTF</b>	Factor Neurotrófico Derivado del nervio Ciliar ( <i>Ciliary Neurotrophic Factor</i> )
<b>Cop-1</b>	Copolímero 1
<b>CoQ<sub>10</sub></b>	Coenzima Q10
<b>CPR</b>	Células Progenitoras de la Retina
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>DHPE</b>	Dihexadecanoil-glicero-fosfoetanolamina ( <i>Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine</i> )
<b>DMAE</b>	Degeneración Macular Asociada a la Edad
<b>EGb761</b>	Extracto procedente de las hojas de Ginkgo Biloba
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
<b>EMA</b>	<i>European Medicines Agency</i>
<b>EPR</b>	Epitelio Pigmentario de la Retina
<b>EVA</b>	Acetato de etilvinilo
<b>FDA</b>	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )

<b>FGF</b>	Factor de Crecimiento Fibroblástico
<b>GDNF</b>	Factor Neurotrófico Derivado de la Glía ( <i>Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor</i> )
<b>GFR</b>	Receptor de Factor de Crecimiento ( <i>Growth Factor Receptor</i> )
<b>GLC756</b>	Fármaco antiglaucomatoso
<b>GPC</b>	Cromatografía de Permeación en Gel ( <i>Gel Permeation Chromatography</i> )
<b>HSA</b>	Albúmina Sérica Humana ( <i>Human Serum Albumin</i> )
<b>HSP</b>	Proteínas de Choque Térmico ( <i>Heat Shock Protein</i> )
<b>HUVEC</b>	Células endoteliales humanas de cordón umbilical ( <i>Human umbilical vein endothelial cells</i> )
<b>JAK-STAT</b>	( <i>Janus kinases, signal transducers and activators of transcription</i> )
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>MK801</b>	Maleato de 5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d] cicloheptan-5,10-imina
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercurio
<b>MMP2</b>	Metaloproteinasa 2
<b>MP/MPs</b>	Micropartículas
<b>MS/MSs</b>	Microesferas
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
<b>NGF</b>	Factor de Crecimiento Neuronal ( <i>Nerve Growth Factor</i> )
<b>NMDA</b>	N-metil D-aspartato
<b>NO</b>	Óxido Nitroso
<b>NOHL</b>	Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber
<b>NT</b>	Neurotrofinas
<b>O/A</b>	Óleo-acuosa
<b>O/O</b>	Óleo-oleosa
<b>PBS</b>	Solución fosfato isotónica ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PEDF</b>	Factor derivado del epitelio pigmentario ( <i>Pigment Epithelium Derived Factor</i> )
<b>PGA</b>	Ácido poliglicólico

<b>PIO</b>	Presión Intraocular
<b>PLA</b>	Ácido Poliláctico
<b>PLGA</b>	Ácido Poli(láctico-co-glicólico)
<b>PPO</b>	Presión de Perfusión Ocular
<b>PVA</b>	Alcohol Polivinílico
<b>PVR</b>	Vitreoretinopatía proliferativa
<b>RD</b>	Retinopatía Diabética
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>RP</b>	Retinosis Pigmentaria
<b>S/O/A</b>	Sólido-óleo-acuosa
<b>S/O/O</b>	Sólido-óleo-oleosa
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral ( <i>Tumor Necrosis Factor</i> )
<b>TRITC</b>	Isotiocianato de Tetrametilrodamina ( <i>Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine</i> )
<b>TRK</b>	Tirosina Kinasa
<b>VEGF</b>	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
<b>Vit E</b>	Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)



# INTRODUCCIÓN

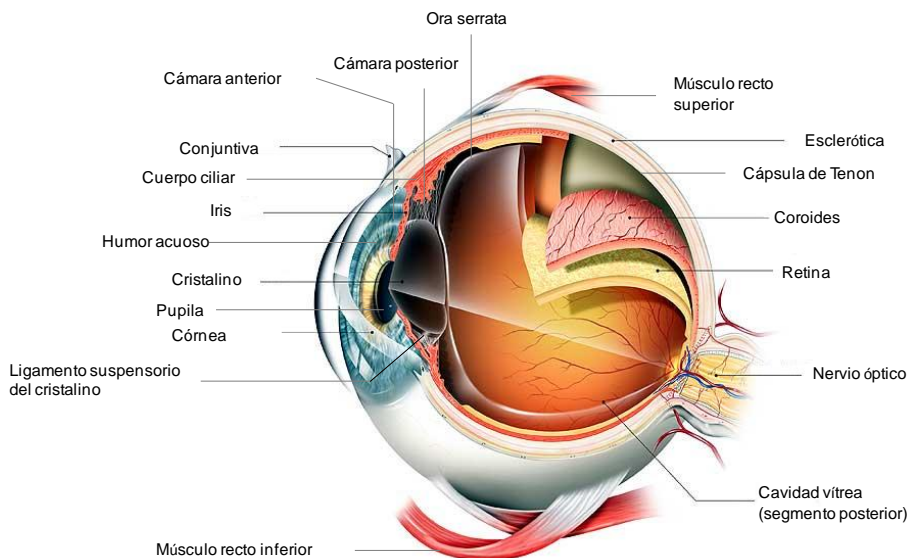


## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Anatomofisiología ocular

El ojo o globo ocular es el órgano de la visión. Está formado por dos segmentos de esferas de diámetro diferente y que reciben la denominación de segmento anterior y segmento posterior. El *segmento anterior*, representa un sexto del globo ocular y es más prominente que el *segmento posterior*, que comprende cinco sextos de la circunferencia total del globo ocular. A su vez, el ojo está compuesto por tres túnicas o capas concéntricas y por los elementos contenidos en su interior. De fuera a dentro, estas tres capas son:

- Capa fibrosa o externa, constituida por la córnea y la esclerótica o esclera.
- Capa intermedia, vascular o úvea, que contiene el iris, el cuerpo ciliar y la coroides.
- Capa interna o nerviosa, también denominada retina.

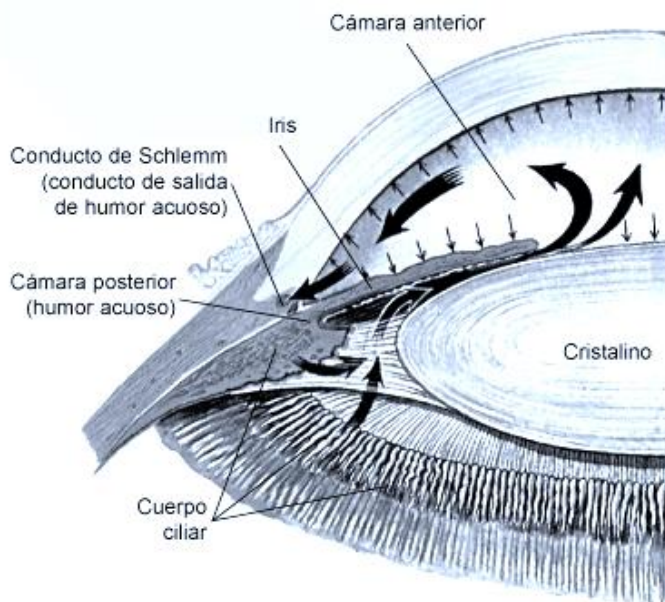


**Figura 1** Estructura del globo ocular

La **capa fibrosa** del globo ocular consta de una parte posterior opaca (esclerótica o esclera) y una parte anterior transparente o córnea. La unión entre esclera y córnea se denomina limbo esclerocorneal. La *esclerótica* o *esclera* es una membrana firme compuesta por una superficie externa blanca (epiesclera), que presenta inserciones de los tendones del músculo orbitario y un estroma corneal constituido por tejido conectivo fibroelástico. El espacio epiescleral separa la esclera de la cara interna de la cápsula de Tenon. En su parte posterior la lámina cribosa de la esclera está formada por una malla colágena con multitud de orificios por los que atraviesan las fibras nerviosas de la retina que formarán el nervio óptico. En la zona central se encuentra un orificio de mayor tamaño que permite el paso de la arteria y venas centrales de la retina. La *córnea* es una estructura transparente que ocupa la porción anterior del globo ocular. Presenta una curvatura más acentuada que la del resto del globo ocular. A ella se debe la mayor parte de la refracción de los rayos luminosos que penetran en el ojo.

La **úvea** está constituida por tres zonas anatómicamente diferentes: la coroides, el iris y el cuerpo ciliar. La *coroides* es una capa vascular situada entre la esclera y la retina, que aporta nutrición a las capas retinianas más externas. Entre la coriocapilar (capa más interna de la coroides) y la retina se encuentra la membrana de Bruch que separa ambas estructuras. Esta lámina forma parte de la barrera hematorretiniana. El *iris* es un diafragma ajustable que deja un orificio central (la pupila) encargado de regular la cantidad de luz que penetra en el ojo. Tiene una gama cromática que se extiende desde el azul claro al marrón oscuro. Está inmerso en el humor acuoso y divide el segmento anterior del ojo en las cámaras anterior y posterior. El ángulo de la cámara anterior se sitúa en la unión del iris y la córnea. El *cuerpo ciliar* está situado entre el iris y la ora serrata. Está formado por dos zonas diferenciadas: la pars plicata y la pars plana. La pars plicata, a su vez, contiene el músculo ciliar y los procesos ciliares. El músculo ciliar está formado por fibras musculares lisas y es responsable de la acomodación. En los procesos ciliares se insertan las fibras del ligamento suspensorio del cristalino que se encargan de mantener el cristalino en su posición. Los procesos ciliares son los responsables de la producción del humor acuoso. Dicho fluido se produce mediante un mecanismo

de secreción activa (80% del total) y por mecanismos de secreción pasiva, como ultrafiltración y difusión, que dependen, a su vez, de la presión sanguínea, presión osmótica plasmática y presión intraocular. Está compuesto por agua en un 99%, aporta nutrientes a las estructuras avasculares del ojo y es el principal responsable del mantenimiento de la presión intraocular. El humor acuoso rellena la cámara posterior y por la pupila pasa a la cámara anterior. Su drenaje se produce por tres vías diferentes. La vía trabecular representa el 80% del drenaje. A través de la red trabecular, el humor acuoso llega al canal de Schlemm y de ahí, atravesando los conductos eferentes, se dirige al sistema venoso. En la vía úveoescleral (20% restante), el humor acuoso fluye a través del cuerpo ciliar hacia el espacio supracoroideo, pasando a la circulación venosa del cuerpo ciliar, la coroides y la esclera. Un pequeño volumen de humor acuoso drena directamente por el iris.



**Figura 2** Drenaje del humor acuoso

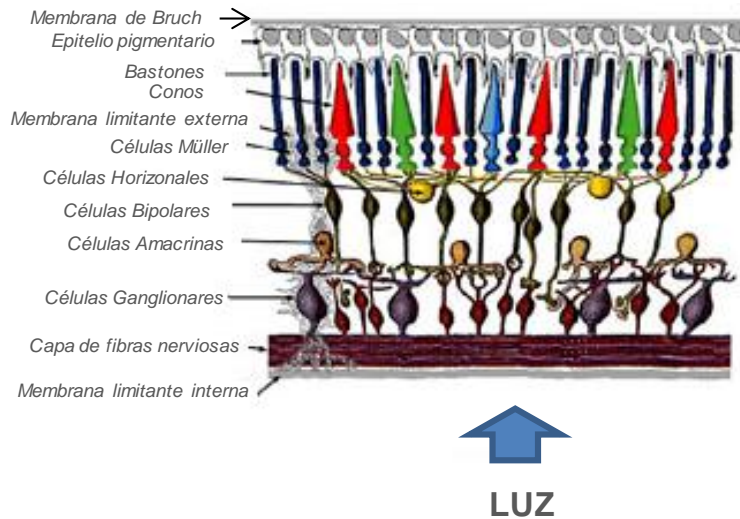
La **capa nerviosa** o **retina** es el estrato sensorial neural del globo ocular. La retina se compone de dos regiones básicas: la capa externa o epitelio pigmentario de la retina y la capa interna o capa neural de la retina.

El *epitelio pigmentario de la retina (EPR)*, adherido a la membrana de Bruch, es una monocapa de células simples cónicas que contienen melanina. La presencia de uniones intercelulares estrechas entre estas células (“tight junctions”) es esencial para regular la difusión transepitelial a través de los espacios paracelulares. Entre las funciones del EPR destacan:

- La absorción de la luz que atraviesa la capa neural.
- El aislamiento de las células de la retina de las sustancias transportadas por la sangre, ya que es uno de los principales componentes de la barrera hematorretiniana.
- La fagocitosis y degradación de los discos membranosos de conos y bastones.
- La restauración de la fotosensibilidad, ya que las células del epitelio pigmentario de la retina poseen el aparato metabólico necesario para sintetizar los pigmentos visuales (opsinas).

La *capa neural de la retina*, está formada por tres grupos funcionales de neuronas retinianas:

- Fotorreceptores, responsables de proporcionar la visión cercana y el color (conos) y la visión periférica y nocturna (bastones).
- Neuronas de conducción directa: células bipolares y ganglionares, responsables de la transmisión del impulso nervioso hasta el cerebro.
- Neuronas de asociación: células horizontales y amacrinas, son interneuronas que interactúan en el proceso de transmisión del impulso nervioso y establecen conexiones entre las células bipolares y ganglionares.
- Las células de Müller y astrocitos sirven de apoyo y sostén al conjunto.



**Figura 3** Estructura de las diferentes capas que componen la retina junto con la membrana de Bruch.

La disposición y asociación de los núcleos y prolongaciones de estas células traen como consecuencia que la retina se organice en diez capas, donde la luz captada por los conos y bastones es transformada en impulsos nerviosos, que son transmitidos a las células bipolares y después a las ganglionares. Por último, las células ganglionares envían sus axones como componentes del *nervio óptico* hasta el cerebro, dónde se procesan las imágenes.

Otras estructuras de interés que forman parte del globo ocular son el cristalino, la cavidad vítrea o los anejos del globo ocular.

El ***cristalino***, situado justo detrás del iris, es una lente transparente y avascular que ofrece poder de refracción y acomodación para que los rayos luminosos se desvíen e incidan sobre la retina.

La ***cavidad vítrea*** o segmento posterior es el mayor compartimento del ojo. En su interior se encuentra el *humor vítreo*, formado por un gel que contiene alrededor del 99% de agua, colágeno y glucosaminoglicanos, en especial ácido hialurónico.

Entre los **anejos del globo ocular** se encuentran la conjuntiva, los párpados, la glándula lagrimal y los músculos extraoculares. La *conjuntiva* es una mucosa delgada y transparente que recubre la parte anterior de la esclera hasta el limbo y la parte posterior hasta los párpados. Los *párpados* tienen como función principal la protección de los ojos y contribuyen a la lubricación de la superficie ocular. Su piel es laxa y elástica y contienen las glándulas de Meibomio, Zeis y Moll. La *glándula lagrimal* está localizada en el ángulo superoexterno de la órbita, su función se basa en la producción de lágrimas para mantener la humedad en la córnea y conjuntiva. Los *músculos extraoculares* son seis, su función coordinada permite los movimientos verticales, laterales y rotatorios del ojo<sup>1,2</sup>.

### **1.2 Vías de administración de fármacos para el tratamiento de patologías oftálmicas.**

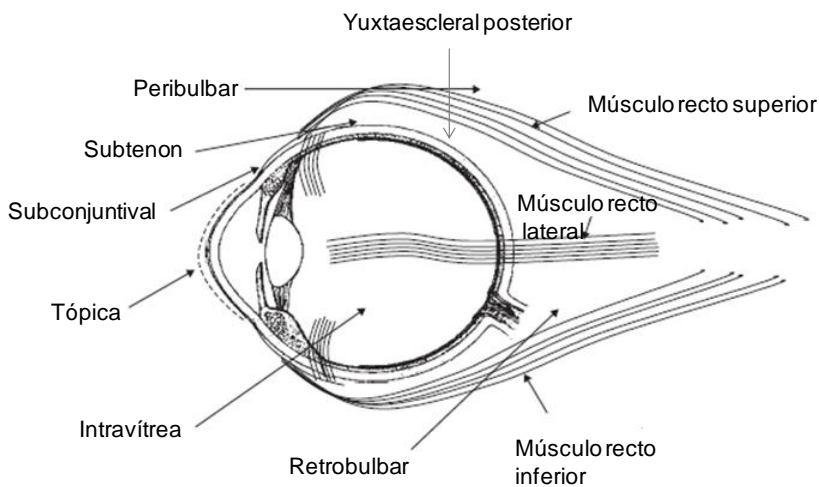
La farmacoterapia de las patologías oftálmicas requiere que la concentración de sustancia activa que llega a los tejidos oculares sea eficaz. Para ello, dependiendo de la afección ocular, el fármaco tendrá que alcanzar el lugar de acción teniendo que atravesar en determinados casos, distintas barreras biológicas. Por tanto, la selección adecuada de la vía de administración es fundamental y depende, principalmente, de la localización del tejido diana.

Las distintas barreras estáticas (córnea, esclera, retina y barrera hematorretiniana) y dinámicas (flujo sanguíneo conjuntival y coroidal, aclaramiento linfático y producción lagrimal) presentes en el globo ocular representan un importante reto para la administración de fármacos en el ojo, especialmente en el tratamiento de las patologías que afectan al segmento posterior<sup>3</sup>. Dichas patologías se caracterizan por ser devastadoras y comprometer la visión en un gran número de sujetos. Dada la gravedad de estas enfermedades, resulta primordial tanto la instauración rápida del tratamiento como el mantenimiento de concentraciones eficaces en el lugar de acción durante el mayor tiempo posible. Sin embargo, la eficacia terapéutica de los tratamientos farmacológicos en esta zona se encuentra limitada,

fundamentalmente, por la dificultad de acceso de la sustancia activa a los tejidos diana<sup>4</sup>.

Las vías de administración de fármacos más utilizadas para el tratamiento de enfermedades oftálmicas son: tópica, periocular e intravítrea. En algunos casos se emplean también vías que implican efecto sistémico<sup>3, 5-7</sup>.

La figura 3 representa las principales vías de administración de fármacos a nivel ocular.



**Figura 4** Principales vías de administración de fármacos a nivel ocular.

### **1.2.1 Administración tópica.**

La administración tópica ocular es la más usada en el tratamiento de patologías oftálmicas, debido a que es una vía no invasiva, de bajo coste y que posee buena aceptación por parte del paciente. Sin embargo, la anatomía y fisiología de la superficie ocular dificultan la penetración de las sustancias activas<sup>8</sup>. Las distintas capas de la córnea, conjuntiva y esclera son barreras efectivas para la penetración de fármacos. Además de éstas, los factores precorneales, el drenaje nasolagrimal y el parpadeo, son responsables de que menos de un 5% de la dosis de fármaco administrado pueda acceder al segmento anterior<sup>3, 9, 10</sup>.

La *córnea* es una barrera mecánica que limita la entrada de sustancias exógenas al interior del ojo. Está formada por tres capas de distinta naturaleza: epitelio, estroma y endotelio. El epitelio corneal posee el 90% del total de las células de la córnea y tiene naturaleza lipídica. Estas células presentan fuertes uniones entre ellas ("tight junctions"), ofreciendo una gran resistencia a la absorción de fármacos hidrofílicos administrados por vía tópica oftálmica. El estroma está constituido por una matriz extracelular y una estructura laminar compuesta por fibras de colágeno. Debido a su alta hidratación, la difusión de fármacos lipofílicos está limitada. Por último, el endotelio corneal está formado por una monocapa de células hexagonales cuyas uniones presentan espacios que permiten el paso de macromoléculas entre el humor acuoso y el estroma, por lo que la penetración de fármacos a través del endotelio está determinada principalmente por su tamaño molecular.

Aunque la penetración de fármacos a través de la *conjuntiva* es poco significativa comparada con la penetración corneal, se sabe que hay ciertas sustancias capaces de atravesar dicha barrera llegando a alcanzar en ciertas ocasiones el segmento posterior del ojo<sup>11</sup>. La conjuntiva, al igual que la córnea, permite el paso de sustancias por vía transcelular o paracelular. Sin embargo, el tamaño de los espacios intercelulares de la conjuntiva es mayor a los de la córnea. De esta forma, aunque las uniones intercelulares están también presentes en la conjuntiva, ésta es más permeable al paso de moléculas hidrofílicas que la córnea. El paso de sustancias activas a través de la conjuntiva se puede producir también por transporte activo, endocitosis o mediante el espacio subconjuntival (mediante inyecciones, implantes o por iontoforesis)<sup>12</sup>.

La *esclera*, constituida por fibras de colágeno y proteoglicanos, tiene una permeabilidad similar a la del estroma corneal. El paso de fármacos a través de la esclera es inversamente proporcional a su peso molecular. Las moléculas cargadas positivamente tienen una mayor resistencia al paso a través de esta membrana, debido a las uniones que se forman con las cargas negativas de los proteoglicanos<sup>3</sup>.

Como se comentó con anterioridad, el problema fundamental de esta vía es la baja penetración de las sustancias activas, resultando en la mayoría de los casos ineficaz en el tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior del ojo. Por tanto, la vía tópica oftálmica se emplea fundamentalmente en el tratamiento de afecciones en la superficie ocular y el segmento anterior del ojo<sup>5, 13</sup>.

Los colirios, pomadas y geles oftálmicos son las formas farmacéuticas más empleadas en la administración de fármacos por vía tópica oftálmica. La penetración del fármaco tras la administración de la forma farmacéutica depende de una serie de factores como son: las propiedades fisicoquímicas de la sustancia activa y de los excipientes, la tonicidad, viscosidad y pH de la formulación, así como las características de la zona de administración. La instilación de un colirio provoca una rápida eliminación del fármaco a nivel precorneal, debido al drenaje nasolagrimal y a la secreción lagrimal. A esto hay que añadir el escaso tiempo de contacto entre la sustancia activa y la superficie ocular. De esta forma, la biodisponibilidad de la sustancia activa se ve reducida y su efecto terapéutico limitado. Por tanto, es frecuente administrar dosis elevadas de fármaco con el objetivo de conseguir concentraciones terapéuticas, lo que puede originar fluctuaciones en las concentraciones de principio activo y posibles efectos secundarios, tanto a nivel ocular como sistémico. Las pomadas y geles oftálmicos incrementan la penetración del fármaco debido al aumento en el tiempo de contacto entre la sustancia activa y la superficie ocular. Sin embargo, provocan visión borrosa en el paciente debido a la diferencia en el índice de refracción entre las lágrimas fluidas y la estructura no fluida y/o no acuosa de la forma farmacéutica. Por esta razón, su uso se limita a la noche<sup>6</sup>.

Actualmente, las investigaciones dedicadas al desarrollo de nuevas formulaciones de administración tópica oftálmica están dirigidas al incremento de la eficacia terapéutica del fármaco, por un lado aumentando su biodisponibilidad, mediante el uso de geles, emulsiones, agentes viscosizantes, promotores de la absorción, profármacos o iontoforesis, por el otro, desarrollando sistemas de cesión controlada que permitan una liberación

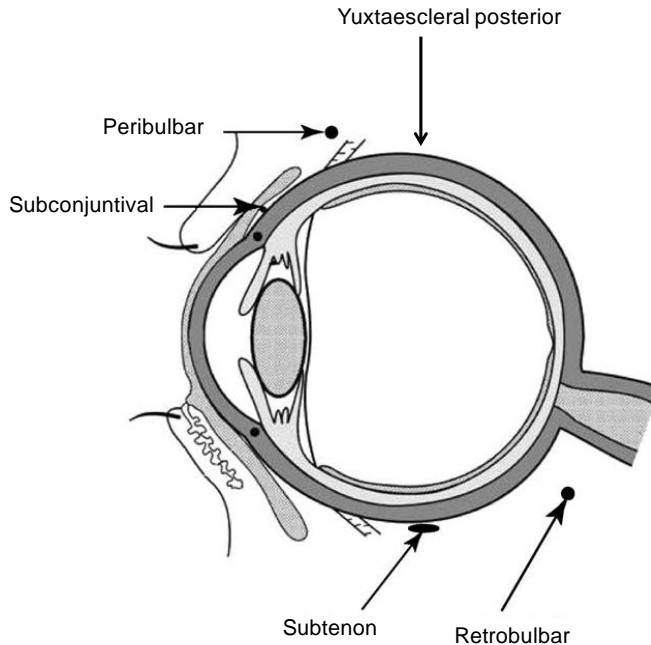
sostenida del fármaco, como son los insertos poliméricos, implantes, micropartículas, liposomas y nanopartículas<sup>6, 9, 10, 13, 14</sup>.

### **1.2.2. Administración por vías que implican efecto sistémico.**

Las vías de administración que implican absorción sistémica de fármacos para el tratamiento de patologías oftálmicas no se utilizan con frecuencia, debido fundamentalmente al limitado acceso del principio activo a los tejidos oculares. El ojo se encuentra separado del resto del organismo mediante la barrera hematoocular, compuesta por dos sistemas: la barrera hematoacuosa, que dificulta el paso de fármacos a la cámara anterior, y la barrera hematorretiniana, que dificulta el acceso de fármacos al espacio extravascular de la retina y al cuerpo vítreo. Sólo las sustancias activas que presentan transporte activo o difusión pasiva favorecida por una elevada lipofilia, podrán atravesar esta última barrera y alcanzar retina y vítreo. En el caso de emplear una de estas vías, se necesitan administrar dosis elevadas de fármaco, que pueden dar lugar a efectos secundarios sistémicos. Por tanto, las vías de administración que implican efecto sistémico no serán útiles en la administración de fármacos potentes con bajo índice terapéutico<sup>3, 6, 8, 15</sup>.

### **1.2.3. Administración periocular.**

Los fármacos administrados por vía periocular se depositan en la parte externa de la esclera. En comparación con la córnea, la esclera es menos resistente al paso de fármacos. La difusión de las sustancias activas a través de la esclera está condicionada por la superficie de la misma (en el hombre 16-17 cm<sup>2</sup>) y el espesor (1 mm), siendo mayor en su porción posterior, cercana a la salida del nervio óptico y más delgada a nivel del ecuador del globo. La administración periocular incluye diferentes vías: subconjuntival, subtenoniana, yuxtaescleral posterior, retrobulbar y peribulbar<sup>3, 5-7, 16, 17</sup>.



**Figura 5** Representación de las vías periorbitales de administración de fármacos.

En la **inyección subconjuntival** el fármaco se deposita debajo de la membrana conjuntival que recubre la esclera<sup>17, 18</sup>, evitando así, la barrera del epitelio conjuntival que limita el paso de fármacos hidrosolubles. A pesar de ello, existen barreras dinámicas, estáticas y metabólicas que dificultan el paso de los fármacos al segmento posterior cuando se emplea este tipo de administración. Entre las barreras dinámicas se encuentran la circulación sistémica y linfática de la conjuntiva, que dan lugar a una rápida eliminación del principio activo. Las moléculas que escapan a la vascularización conjuntival deben atravesar la esclera y la coroides hasta alcanzar la retina. Mientras que la esclera no supone una gran resistencia al paso de fármacos, la coroides, debido a su elevada vascularización, sí ocasiona una considerable eliminación de sustancia activa. Además, la barrera hematorretiniana también limita el acceso del fármaco a la retina<sup>3</sup>.

Aunque la inyección subconjuntival permite alcanzar concentraciones de fármaco en el segmento posterior superiores a las conseguidas por vía sistémica, no está exenta de efectos secundarios. Las principales desventajas son la aparición de hemorragias subconjuntivales masivas, desprendimiento de

retina, irritación ocular, dolor y depósitos de fármaco en la zona de inyección<sup>17, 19, 20</sup>.

La **inyección subtenoniana** implica la administración de la formulación entre la esclera y la cápsula de Tenon. En este caso, debido a que la esclera es una membrana avascular, el tiempo de contacto entre el fármaco y ésta se prolonga, aumentando la penetración del mismo. Sin embargo, esta vía presenta un mayor riesgo de perforación accidental del globo ocular<sup>7, 17</sup>.

La **inyección yuxtaescleral posterior** fue desarrollada por los Laboratorios Alcon para la administración de acetato de anecortave (Retaane®), un análogo sintético del cortisol, en el tratamiento y prevención de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). En este tipo de administración el preparado se deposita directamente en la zona más cercana a la mácula, consiguiendo concentraciones superiores de fármaco en este lugar. El empleo de esta vía reduce el riesgo de endoftalmitis y desprendimiento de retina que se asocian a la inyección intravítrea<sup>21, 22</sup>.

La **administración retrobulbar** se emplea fundamentalmente para la inyección de anestésicos en determinadas cirugías intraoculares. El fármaco es administrado directamente en el cono muscular, una zona ubicada entre los cuatro músculos oculares en la parte posterior del globo. Debido a la proximidad del nervio óptico, de los nervios motores y de los nervios sensoriales, esta vía tiene serios riesgos de provocar daño a nivel ocular.

La ventaja fundamental que presenta la **inyección peribulbar** respecto a la retrobulbar es la disminución del riesgo de lesiones oculares derivadas de la administración. Empleando esta vía, el fármaco es depositado en la parte externa del cono muscular. Aunque ambas vías han demostrado ser útiles en anestesia o aquinesia, su uso está limitado debido al gran número de complicaciones asociadas (perforación del globo ocular, estimulación del reflejo óculo-cardíaco, traumatismo del nervio óptico, hemorragia orbitaria, etc.)<sup>17, 23</sup>.

#### **1.2.4. Administración intravítrea.**

Las inyecciones intravítreas se utilizan con frecuencia en el tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior del ojo, a pesar de la incomodidad que supone para el paciente y las posibles complicaciones que pueden surgir<sup>14</sup>. Entre las patologías susceptibles de requerir este tipo de administración se encuentran aquellas que afectan a la retina y al vítreo y que comprometen la visión de un gran número de pacientes. Dentro de estas patologías destacan la retinopatía diabética, retinosis pigmentaria, uveítis, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), glaucoma, procesos infecciosos causados por el virus del herpes y melanomas<sup>24-30</sup>.

La inyección intravítrea implica el depósito directo de la formulación en la cavidad vítrea, por tanto las concentraciones de principio activo que se alcanzan en el lugar de acción son superiores a las que se logran empleando otras vías de administración. Además, el uso de esta vía evita los efectos secundarios derivados de la administración sistémica y el efecto selectivo a la penetración de fármacos que ejercen tanto la córnea como el cristalino<sup>3, 6, 7, 31</sup>.

La eliminación del fármaco desde el vítreo puede ejercerse por dos vías: a través de la cámara anterior o a través de la retina. Los procesos de eliminación y distribución de fármacos están influenciados por la velocidad de difusión de los mismos a través del vítreo y por la geometría del ojo. En general, las moléculas grandes son retenidas en el vítreo durante períodos prolongados de tiempo (pueden alcanzar hasta semanas); sin embargo, las moléculas menores a 500 Da que no posean una elevada lipofilia se eliminan con mayor rapidez<sup>7</sup>.

Aunque la administración intravítrea de fármacos está logrando cada vez una mayor aceptación en el tratamiento de vitreoretinopatías debido a las ventajas que presenta, no es una vía exenta de problemas. Además de los riesgos inherentes a la utilización de una técnica invasiva, el principal inconveniente de esta vía es que al ser una administración en forma de bolus, resulta claramente insuficiente en el tratamiento efectivo de problemas crónicos, que precisan una

disponibilidad mantenida del agente activo por un periodo prolongado de tiempo. En estas situaciones se necesita la administración repetida de inyecciones intravítreas. Además, los efectos adversos derivados de este tipo de administración, como el desprendimiento de retina, atrofia óptica, cataratas, hemorragia vítrea y endoftalmitis aumentan con la frecuencia de las inyecciones<sup>32</sup>.

Por tanto, en el tratamiento de las patologías crónicas que afectan al segmento posterior del ojo, se hace patente la necesidad de formas de administración oftálmicas alternativas capaces de proporcionar concentraciones terapéuticas del fármaco en su lugar de acción durante periodos de tiempo prolongados reduciendo, en todo lo posible, el número de inyecciones. Estos hechos fundamentan el interés en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos para el tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior del ojo<sup>7, 9, 10, 13, 33</sup>.

### **1.3. Sistemas de liberación controlada de fármacos por vía oftálmica**

Como se ha señalado anteriormente, el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos es cada vez más necesario en el tratamiento de patologías crónicas que afectan al segmento posterior del ojo. Estos sistemas, administrados por vía intravítrea o periocular, poseen ventajas respecto a las formas farmacéuticas convencionales, ya que se alcanzan concentraciones superiores de la sustancia activa en el lugar de acción, ejercen su actividad durante un periodo prolongado de tiempo y evitan los efectos secundarios que pueden aparecer empleando otras vías de administración (sistémica, tópica ocular, etc.).

Los sistemas de liberación controlada de fármacos se clasifican en función de su tamaño en:

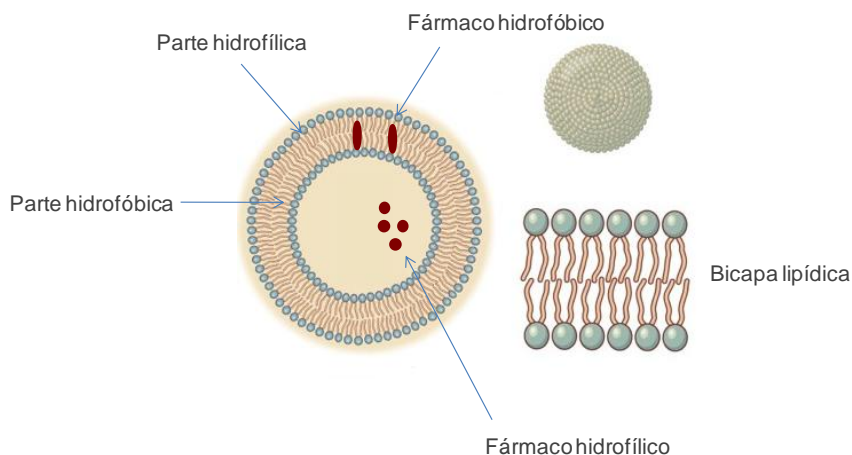
- Micro y nanosistemas: compuestos principalmente por liposomas (20-1000 nm), micropartículas (1-1000  $\mu\text{m}$ ) y nanopartículas (1-1000 nm). La ventaja que ofrecen estas formulaciones es que se pueden

administrar en forma de suspensión mediante una inyección convencional.

- Implantes (> 1mm): biodegradables y no biodegradables. Requieren cirugía para su implantación y en el caso de los no biodegradables también para su retirada.

### 1.3.1 *Liposomas*

Los liposomas son estructuras vesiculares compuestas por una o más bicapas lipídicas concéntricas separadas entre ellas por compartimentos acuosos. Se pueden distinguir distintos tipos de liposomas según su tamaño y morfología: vesículas unilaminares pequeñas (SUV) (20-200 nm de diámetro), vesículas unilaminares grandes (LUV) (>200 nm) y vesículas multilaminares (MLV) (>500 nm). Generalmente, las membranas liposomales están formadas por una mezcla de fosfolípidos y otros aditivos como son el colesterol, los glicolípidos, la esfingosina u otras sustancias anfifílicas. Las moléculas activas se incorporan en el interior de los liposomas en función de su solubilidad, los fármacos hidrofílicos en los compartimentos acuosos y los hidrofóbicos en las membranas lipídicas<sup>34</sup>.



**Figura 6** Representación esquemática de la estructura de un liposoma y la incorporación de fármacos en su interior.

La eficacia de los liposomas como sistemas de liberación de fármacos en la terapia oftalmológica depende de una serie de factores como son la eficacia de

encapsulación del fármaco en los liposomas, el tamaño y la carga superficial de las vesículas, la distribución del fármaco en los sistemas y la estabilidad de los mismos<sup>34, 35</sup>.

El estudio de los liposomas en el tratamiento de las patologías oftálmicas comienza con el trabajo de Smolin y *col.* (1981) en el que se demostró que una formulación que incorporaba liposomas cargados con el fármaco antiviral idoxuridina y administrada por vía tópica era más eficaz que la molécula libre en el tratamiento de estados agudos y crónicos de queratitis herpética. Además, se observó no solo un incremento en la penetración corneal del fármaco, sino también una mayor afinidad de la molécula activa por las células infectadas con el virus del herpes<sup>36</sup>. Desde entonces, varios investigadores han estudiado el uso de liposomas en la terapia oftalmológica. Una gran variedad de compuestos (proteínas, oligonucleótidos, quimioterápicos o agentes de contraste) han sido encapsulados en estos sistemas para su administración intravítrea<sup>37-39</sup>.

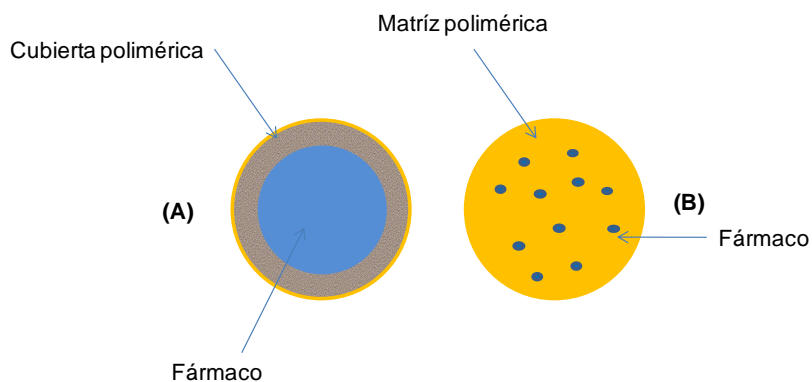
Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas que presentan estos sistemas, tienen un uso terapéutico limitado debido a sus inconvenientes. Entre ellos destacan, su corto periodo de conservación, baja estabilidad en medios acuosos y dificultad de esterilización<sup>6, 34</sup>.

En la actualidad, la única formulación liposomal para el tratamiento de patologías oftálmicas en uso clínico es el Visudyne® (Novartis Pharmaceuticals, USA), cuyo principio activo, la verteporfina, es empleado en terapia fotodinámica por vía intravenosa para el tratamiento de la neovascularización coroidal y la DMAE<sup>6</sup>.

### **1.3.2. Nano- y micropartículas.**

Las nano- y micropartículas constituyen los sistemas que en la actualidad presentan un mayor grado de versatilidad. Estas estructuras son capaces de encapsular fármacos en su interior y en el caso de las micropartículas liberarlos de forma prolongada.

Como ya se ha indicado anteriormente, la diferencia entre las nano- y micropartículas radica en su tamaño. Las nanopartículas poseen un tamaño comprendido entre 1-1000 nm, mientras que las micropartículas tienen tamaños entre 1-1000  $\mu\text{m}$ . Atendiendo a su estructura se pueden clasificar en dos grupos: micro- y nanocápsulas y micro- y nanoesferas. Las micro- y nanocápsulas están formadas por una cavidad central sólida, líquida o semisólida, rodeada de una cubierta polimérica que da lugar a un sistema reservorio. Las micro- y nanoesferas son sistemas matriciales en los que la sustancia activa se encuentra dispersa de forma uniforme en un entramado polimérico. Ambos sistemas permiten vehiculizar sustancias activas de distinta naturaleza, tanto hidrofílicas como lipofílicas, presentando una estabilidad óptima *in vitro* e *in vivo*<sup>6, 15, 31, 40</sup>.



**Figura 7** Representación esquemática de la estructura de una nano- microcápsula (A) y una nano- microesfera (B) y la incorporación de fármacos en su interior.

El desarrollo de las micro- y nanopartículas surge ante la necesidad de conseguir una liberación controlada de fármacos, una administración lo más sencilla posible que conlleve el menor riesgo para el paciente, una disminución en los efectos adversos y un tratamiento que pueda realizarse en una única inyección o al menos con administraciones separadas en el tiempo.

Los polímeros más comúnmente empleados en la elaboración de nano- y micropartículas para uso oftálmico son el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA). Ambos, están aceptados por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso en humanos y son biomateriales de amplia aplicación biomédica<sup>10, 14, 15</sup>. Este hecho se basa en su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad. Las cadenas poliméricas son hidrolizadas dando lugar a metabolitos naturales (ácidos láctico y glicólico) que se eliminan del organismo por el ciclo de Krebs, sin presentar toxicidad. Dependiendo de su composición y del peso molecular, estos polímeros pueden tener velocidades de degradación que van desde meses hasta años<sup>31, 41, 42</sup>. En estos sistemas, la sustancia activa encapsulada es liberada como consecuencia de la erosión del material, debido a la ruptura de las cadenas poliméricas vía hidrólisis autocatalítica (ácida o básica) y/o hidrólisis enzimática<sup>43</sup>. Además, se puede seleccionar su aplicación en función de sus características. Por ejemplo, el ácido poliláctico de alto peso molecular se emplea como material de sutura cuando se necesita una elevada fuerza mecánica. Por el contrario, polímeros amorfos de bajo peso molecular son útiles en el desarrollo de sistemas de cesión controlada donde se pretende que el material desaparezca del lugar de acción una vez ejercido el efecto<sup>44</sup>.

Los polímeros derivados del ácido poliláctico, ácido poliglicólico o sus copolímeros han sido formulados como micro- y nanopartículas para su administración intravítrea o periocular, demostrando buena tolerancia en los tejidos de la zona<sup>4, 45, 46</sup>.

La administración de estos sistemas se realiza mediante la inyección de una suspensión de los mismos, a través de una aguja o cánula cuyo tamaño varía en función del tamaño de los sistemas y de la vía de administración (intravítrea o periocular)<sup>4, 31</sup>. Las micro- y nanopartículas son suspendidas en una solución fisiológica que actúa como vehículo en la administración. Los vehículos que más frecuentemente se emplean en este tipo de inyecciones son soluciones isotónicas de tampón fosfato salino (PBS) y la solución salina balanceada (BSS), de pH 7.4. Sin embargo, debido a la tendencia que pueden poseer las partículas de quedarse adheridas a las jeringas, algunos investigadores han

estudiado el uso de vehículos viscosos, como soluciones acuosas de ácido hialurónico o de hidroxipropilmetilcelulosa<sup>31</sup>.

Inicialmente, se pensó que las microesferas inyectadas en el vítreo podrían interferir con la visión debido a la opacidad de los sistemas. Sin embargo, en estudios posteriores se demostró que las micropartículas mayores de 2  $\mu\text{m}$  tendían a sedimentar por acción de la gravedad mientras que las nanopartículas eran capaces de difundir rápidamente y se localizaban en el interior de los tejidos oculares<sup>14, 47</sup>. Además, también se ha observado que las micropartículas pueden sufrir agregación. Como consecuencia de este fenómeno se forma un depósito capaz de ceder la sustancia activa durante más tiempo al disminuir su superficie específica. Si se recurre a una administración periocular se ha visto que tanto las nano- como las micropartículas (350 nm y 3,6  $\mu\text{m}$ , respectivamente) administradas mediante inyección subconjuntival permanecen en el espacio periocular permitiendo la difusión del fármaco hasta retina y vítreo<sup>18</sup>.

Varios estudios preclínicos han demostrado la eficacia de las micro- y nanopartículas como sistemas de liberación controlada de fármacos en el tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior del ojo administradas tanto por vía intravítrea como periocular<sup>29, 48-53</sup>.

Dentro de los sistemas microparticulares destacan los elaborados con fármacos como adriamicina<sup>48</sup>, 5-fluorouracilo<sup>54</sup> o ácido retinoico<sup>55</sup> para el tratamiento de vitreoretinopatía proliferativa (PVR), dexametasona<sup>49</sup> y ciclosporina<sup>56</sup> en el tratamiento de uveítis, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)<sup>57</sup> para la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), budesonida<sup>18</sup> y celecoxib<sup>52</sup> en el tratamiento de la retinopatía diabética, acetónido de triamcinolona<sup>58</sup> para tratar el edema macular, aciclovir<sup>59</sup> en el tratamiento de herpes o ganciclovir<sup>29</sup> para el tratamiento de retinitis causada por citomegalovirus.

Se han desarrollado también formulaciones nanoparticulares para el tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior del ojo. Entre ellas

se encuentran las nanopartículas de PLGA cargadas con dexametasona para el tratamiento de la neovascularización coroidea<sup>51</sup> o las nanopartículas cargadas con tamoxifeno para el tratamiento de uveoretinitis<sup>53</sup>.

Dada la utilidad de los sistemas nano- y microparticulares en la liberación controlada de fármacos se hace evidente la necesidad de este tipo de formulaciones en el tratamiento de patologías crónicas que afectan al segmento posterior del ojo. Para esto, es necesario conseguir una adecuada eficacia de encapsulación, controlar el tamaño de partícula y la velocidad de liberación del fármaco, mantener la bioactividad de las moléculas activas durante el proceso de elaboración, conseguir una fabricación a gran escala y preparar formulaciones estériles<sup>7</sup>.

Uno de los factores críticos en los sistemas de liberación controlada de fármacos por vía intraocular o periocular es la esterilización. Siempre se prefiere un proceso de esterilización final del producto a la preparación de la formulación en condiciones asépticas<sup>31</sup>. Dentro de los métodos finales de esterilización, los que más frecuentemente se usan son: óxido de etileno, calor seco y húmedo y radiaciones ionizantes. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas no pueden emplearse con polímeros termolábiles como el PLGA, siendo la esterilización por radiación gamma el método de elección. Entre sus ventajas destacan, su alto poder de penetración, baja reactividad química, bajos niveles de residuos, ligero cambio en la temperatura de la muestra y las pocas variables a controlar durante el proceso<sup>60-62</sup>. Además, hay estudios que demuestran que si la exposición a radiación gamma se realiza a baja temperatura (protegiendo las muestras con hielo seco), la alteración del polímero es menor<sup>63</sup>.

### **1.3.3. *Implantes.***

Los implantes son sistemas diseñados con el objetivo de alcanzar concentraciones eficaces del fármaco en el lugar de acción durante un periodo prolongado de tiempo, que puede abarcar desde meses hasta años, por lo que

resultan muy útiles en el tratamiento de pacientes con enfermedades oculares crónicas.

La liberación de la sustancia activa a partir del implante puede llevarse a cabo por difusión a través de una membrana permeable o a través del entramado polimérico si se trata de un sistema matricial. En este último caso si el polímero es biodegradable su degradación contribuirá también a la liberación del agente terapéutico.

En general, la implantación subconjuntival de estos dispositivos se emplea en el tratamiento de patologías que afectan al segmento anterior del ojo, mientras que los implantes intravítreos y supracoroideos son útiles en patologías del segmento posterior<sup>6, 9, 40</sup>.

Los implantes poseen una serie de ventajas derivadas de su inserción en una zona cercana al lugar de acción. Entre ellas cabe destacar, la liberación constante de fármaco en el lugar de acción, la eliminación de efectos secundarios asociados a la administración sistémica y a las inyecciones intravítreas repetidas y la menor cantidad de fármaco necesaria durante el tratamiento. Sin embargo, su uso está limitado debido a que se trata de una técnica invasiva que requiere incisión quirúrgica para su implantación y en algunos casos también para su retirada<sup>6, 10, 64</sup>.

Los implantes intraoculares se pueden clasificar en dos grupos en función de la naturaleza del polímero empleado para su elaboración: biodegradables y no biodegradables.

Los **implantes no biodegradables** proporcionan una mayor precisión en la velocidad de liberación del fármaco y tienen una liberación más prolongada en el tiempo que los implantes biodegradables. Sin embargo, debido a la naturaleza no biodegradable de los polímeros, no son metabolizados ni erosionados *in vivo*, por lo que es necesario eliminarlos o reemplazarlos una vez que han liberado la sustancia activa, lo que supone la principal desventaja de estos dispositivos. Los efectos adversos que pueden asociarse a ellos son el

desprendimiento de retina, la hemorragia intravítrea, endoftalmitis, fibrosis y edema macular cistoide<sup>4, 10, 65</sup>.

En la actualidad la mayoría de los implantes intravítreos que están comercializados son no biodegradables. Los polímeros más comunes empleados en su elaboración son la silicona, el alcohol polivinílico (PVA) y el acetato de etilvinilo (EVA)<sup>6, 64-66</sup>. La preparación de estos dispositivos se basa en el recubrimiento de la sustancia activa con mezclas de polímeros, dando lugar a una serie de capas y formando así un sistema reservorio. De este modo, controlando la composición de cada una de las capas se puede modular la velocidad de cesión del fármaco.

Este tipo de implantes se han investigado para la liberación controlada de una gran variedad de fármacos en el tratamiento de distintas patologías oftálmicas, entre ellos se encuentran:

- Vitrasert®: Es un implante de ganciclovir, aprobado por la FDA en 1996 para el tratamiento de la retinitis causada por citomegalovirus<sup>67, 68</sup>.
- Retisert®: Fue aprobado por la FDA en 2005 para el tratamiento de uveítis crónica no infecciosa. Contiene acetónido de fluocinolona<sup>67, 68</sup>.
- Iluvien®/Medidur®: Este implante debido a su pequeño tamaño puede ser insertado mediante un sistema inyector acoplado a una aguja de calibre 25G sin necesidad de cirugía. Está compuesto por acetónido de fluocinolona y actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase III para el tratamiento de edema macular diabético<sup>6, 68</sup>.
- I-Vation<sup>TM</sup>: Es un implante intravítreo que contiene acetónido de triamcinolona. Actualmente, está en ensayos clínicos de fase I para el tratamiento de edema macular diabético<sup>7, 14</sup>.
- NT 501: Es un implante intraocular que encapsula células humanas del epitelio pigmentario de la retina (ARPE-19), modificadas genéticamente para secretar el Factor Neurotrófico Derivado del Nervio Ciliar (CNTF). En la actualidad se encuentra en ensayos clínicos de fase II para tratar DMAE y retinosis pigmentaria<sup>7, 66, 69</sup>.

Los ***implantes biodegradables*** resultan especialmente interesantes debido a que desaparecen del lugar de acción progresivamente, evitando así los riesgos asociados a la retirada quirúrgica de los dispositivos no biodegradables. Este tipo de sistemas han sido desarrollados tanto en forma sólida como en sistemas de consistencia semisólida o viscosa, facilitando su implantación, ya que requieren una incisión más pequeña que en el caso de los no biodegradables o incluso se pueden administrar como una inyección convencional<sup>6, 14, 64</sup>.

Los implantes biodegradables pueden fabricarse tanto con polímeros hidrofílicos como hidrofóbicos.

Dentro de los *polímeros hidrofílicos* empleados para la elaboración de estos dispositivos destacan la gelatina, albúmina, colágeno, quitosano, dextrano y almidón. Estas macromoléculas hidrofílicas se entrecruzan para formar una estructura tridimensional que permite albergar el fármaco. La velocidad de liberación del principio activo depende principalmente de la cantidad de uniones fármaco-matriz, la densidad de entrecruzamiento del polímero, el volumen total de la matriz y la actividad enzimática del tejido donde se implanta<sup>4, 65</sup>.

Los *polímeros hidrofóbicos* comúnmente empleados en el desarrollo de implantes biodegradables son el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros, ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA). La velocidad de liberación del fármaco a partir de estos sistemas se puede controlar empleando polímeros de diferentes pesos moleculares o modificando las proporciones de PLA o PGA que se incluyen en el copolímero<sup>4, 65, 69, 70</sup>. Los implantes desarrollados con polímeros hidrofóbicos han demostrado ser eficaces en la liberación de diferentes tipos de fármacos: antivirales, antifúngicos, esteroides o inmunosupresores<sup>71-74</sup>.

El primer implante biodegradable de administración intravítrea aprobado por la FDA ha sido el implante Ozurdex®. En 2009 se aprobó su uso en el tratamiento del edema macular causado por oclusión venosa retiniana y en 2010 para el tratamiento de uveítis no infecciosa. Actualmente, también está aprobado su

uso por la EMA. Ozurdex® es un implante matricial elaborado con PLGA que contiene dexametasona (antiinflamatorio esteroideo). Debido a su pequeño tamaño puede ser inyectado mediante un aplicador que tiene incorporada una aguja de calibre 22 G<sup>68, 69, 75</sup>.

Dentro de la misma línea, actualmente se está evaluando la eficacia del implante intravítreo basado en el sistema Novadur™, elaborado con PLGA y brimonidina en el tratamiento de DMAE, retinopatía óptica glaucomatosa y retinosis pigmentaria (ensayos clínicos de fase II). La brimonidina es un agonista  $\alpha$ -2 adrenoreceptor que induce la liberación de varias neurotrofinas como BDNF (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro), CNTF (Factor Neurotrófico del Nervio Ciliar) y el factor de crecimiento fibroblástico (b-FGF)<sup>68-70</sup>.

Entre otros, algunos de los implantes biodegradables de administración intraocular que se están investigando son: (1) Implante de PLGA con vancomicina, ampicilina y dexametasona para el tratamiento de infecciones intraoculares<sup>76</sup>, (2) Implante elaborado con PLGA que contiene ganciclovir y foscarnet, que podría ser una alternativa en el tratamiento de retinitis causada por citomegalovirus<sup>77</sup> o (3) Implante de metotrexato para el tratamiento de linfoma vítreoretiniano primario<sup>78</sup>.

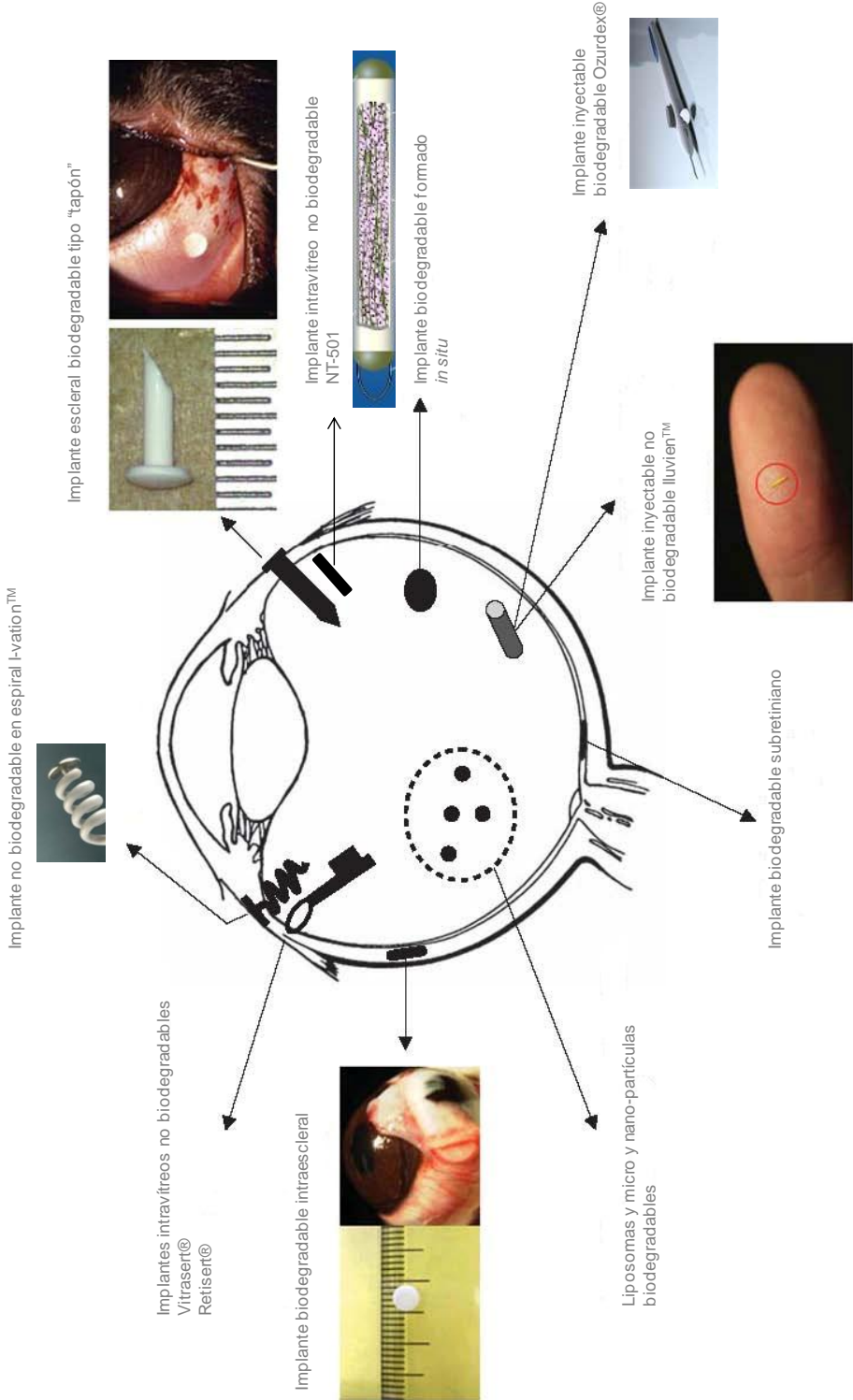


Figura 8 Ejemplos de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos en el segmento posterior del ojo

### 1.4. Patologías degenerativas que afectan al segmento posterior del ojo

Como ya se ha señalado anteriormente, las enfermedades que afectan al segmento posterior del ojo son responsables de la mayoría de disfunciones visuales y ceguera en la población mundial. Las patologías de mayor prevalencia que causan discapacidad visual irreversible en los países desarrollados son: la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), el glaucoma y la retinopatía diabética. Además, existen otras patologías relevantes como las degeneraciones retinianas u otras degeneraciones del nervio óptico aparte del glaucoma, entre las que se encuentra la retinosis pigmentaria o la neuropatía óptica de Leber.

#### 1.4.1. *Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)*

Al aumentar la esperanza de vida en los países desarrollados, la DMAE cobra especial importancia puesto que es una causa común de ceguera en mayores de 65 años. Esta patología se caracteriza por una pérdida de visión central y está directamente ligada con el envejecimiento. Aunque la degeneración de las células fotorreceptoras no es la única causa, es una de las más importantes. El tabaco, niveles elevados de colesterol en sangre, alteraciones genéticas, sexo femenino, raza blanca o antecedentes familiares de DMAE son factores de riesgo que influyen en el desarrollo de esta enfermedad<sup>79, 80</sup>.



**Figura 9** Visión de un paciente con DMAE.

La DMAE se clasifica en dos tipos: degeneración macular no exudativa (seca o atrófica) y degeneración macular exudativa (húmeda).

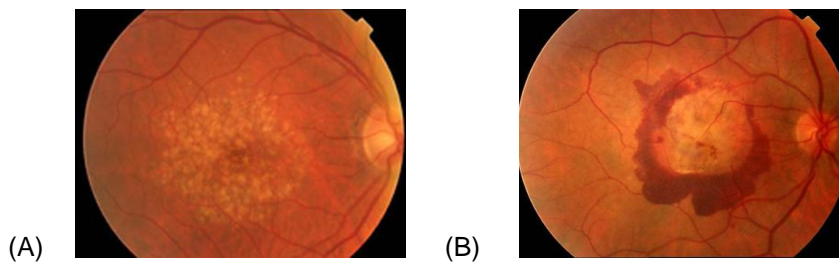
La *DMAE no exudativa* es la forma más frecuente de la DMAE (80% de los casos). Se caracteriza por la muerte de fotorreceptores y de las células del EPR subyacentes, así como atrofia capilar. Los hallazgos clínicos pueden variar desde los primeros cambios pigmentarios en la mácula hasta la presencia de drusas (depósitos amarillos compuestos de material extracelular en las capas más profundas de la retina). La evolución de la enfermedad es lentamente progresiva llevando a una fase final de atrofia macular y pérdida de visión central en ambos ojos, que se puede alcanzar 5-10 años después del inicio de la patología.

No existe ningún tratamiento eficaz para la DMAE no exudativa, tan sólo puede frenarse su evolución para evitar la pérdida completa de la visión. En la actualidad, el tratamiento de esta patología se limita a la administración de antioxidantes, modificaciones en la dieta o en el estilo de vida para evitar que la DMAE seca se convierta en húmeda. Un estudio reciente realizado en pacientes con este tipo de degeneración macular ha demostrado que la administración de factores neurotróficos, en concreto el CNTF encapsulado en el implante NT-501, ayuda a retrasar la pérdida de visión<sup>81</sup>.

La *DMAE exudativa* aunque es menos común, es la forma más agresiva. Se caracteriza por la formación de vasos sanguíneos anormales en la vasculatura coroidea, membrana de Bruch y epitelio pigmentario de la retina, originando una débil membrana neovascular subretiniana a través de la cual se pueden producir pérdidas de líquido y hemorragias en el espacio subretiniano que ocasionan distorsión en la retina y por tanto, pérdida visual. Una de las posibles causas de esta forma de la enfermedad es la falta de oxígeno en la retina, que desencadena un proceso de angiogénesis<sup>82</sup>.

El tratamiento de la DMAE exudativa se ha llevado a cabo mediante cirugía láser, terapia fotodinámica y terapias farmacológicas con agentes antiangiogénicos (anti-VEGF). Este tipo de fármacos, inyectados directamente en la cavidad vítrea pueden actuar uniéndose al factor de crecimiento vascular

endotelial (VEGF) como son el bevacizumab y ranibizumab o bloqueando la transmisión de la señal del receptor (pegaptanib), inhibiendo así el proceso de angiogénesis. Actualmente, se cree que el tratamiento ideal sería una terapia combinada que reduzca la neovascularización y a su vez evite la muerte neuronal, incluyendo agentes neuroprotectores o antiinflamatorios<sup>83, 84</sup>



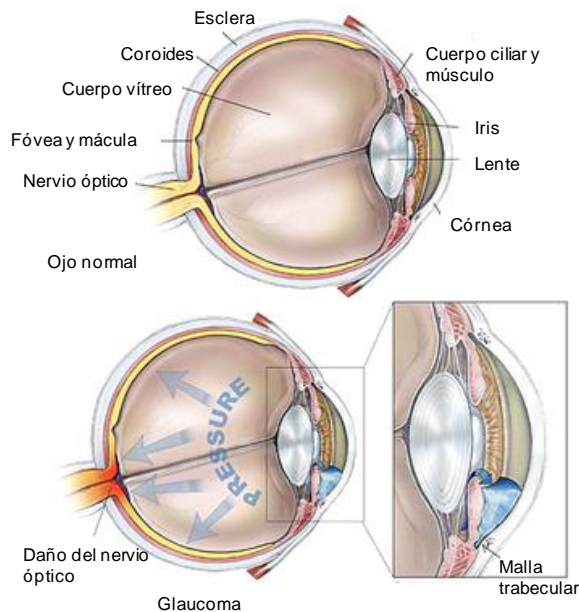
**Figura 10** Retina de un paciente con DMAE no exudativa (A). Retina de un paciente con DMAE exudativa (B).

### **1.4.2. Glaucoma**

El glaucoma es una neuropatía óptica crónica y multifactorial caracterizada por una pérdida progresiva de células ganglionares de la retina (CGR), ocasionada por un daño originado en los axones del nervio óptico<sup>85</sup>. Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida gradual de visión periférica que puede desencadenar en ceguera si no se llega a tratar a tiempo. La prevalencia del glaucoma es del 1,5-2% en individuos mayores de 40 años y esta cifra aumenta a partir de los 60 años. Se considera la segunda causa de ceguera irreversible en el mundo y en 2020, se espera que alrededor de 80 millones de personas padezcan esta enfermedad<sup>86</sup>. Aunque aún no existe cura, la progresión del glaucoma se puede ralentizar o detener si el tratamiento adecuado es empleado a tiempo<sup>87</sup>.

En la mayoría de los casos, el aumento de la presión intraocular (PIO) es el principal factor de riesgo en el desarrollo de glaucoma. La PIO depende del balance entre la velocidad de producción del humor acuoso y su velocidad de eliminación. El humor acuoso tiene un volumen aproximado de 250  $\mu$ l y su velocidad de producción, que presenta variaciones diurnas, es alrededor de 2.5

$\mu\text{l}/\text{min}$ . Tal y como queda recogido en el apartado de anatomofisiología ocular (Pág. 2-3), el humor acuoso se produce en los procesos ciliares y fluye desde la cámara posterior hacia la cámara anterior a través de la pupila. Cuando alcanza la cámara anterior, es drenado a través de la vía trabecular o de la vía uveoescleral. La vía trabecular o convencional representa el drenaje a través de la red trabecular y es mayoritaria (80%). Por esta vía, el humor acuoso llega al conducto de Schlemm y de ahí, a través de los conductos eferentes, se dirige al sistema venoso. El resto de humor acuoso es eliminado utilizando la vía uveoescleral o no convencional. El drenaje por dicha vía se produce a través del cuerpo ciliar hacia el espacio supracoroideo, para ser posteriormente drenado por la circulación venosa. De forma adicional, cierto volumen de humor acuoso se drena por el iris. No existe un punto de corte definido para determinar cuándo una PIO está anormalmente elevada aunque, en general, 21mmHg es la PIO a partir de la cual se considera que existe riesgo de padecer lesiones glaucomatosas<sup>88</sup>.



**Figura 11** Representación de un ojo normal y un ojo glaucomatoso.

El aumento de la PIO desencadena que el suministro sanguíneo que llega a la retina se vea comprometido por el exceso de presión, viéndose afectado el

tejido neuronal. Además, al aumentar la presión sobre el tejido conectivo de la lámina cribosa, se interrumpe el flujo axo-plasmático a nivel de la fibra óptica, evitando que los factores neurotróficos endógenos accedan al cuerpo neuronal de las células ganglionares de la retina (CGR) desde sus axones<sup>89</sup>. Ante tales carencias, estas células desencadenan un proceso natural de degeneración celular (apoptosis)<sup>90</sup>.

Aunque el aumento de la PIO ha sido clásicamente considerado como la causa principal del glaucoma, hay pacientes con valores de PIO normales que padecen esta enfermedad. Además, es importante destacar que ni todos los pacientes con PIO elevada desencadenan glaucoma, ni la disminución de esta PIO es garantía que asegure la protección contra el mismo<sup>91</sup>.

En la última década se está estudiando la existencia de otros factores importantes en la génesis y en el proceso de esta degeneración neuronal. Así, se está analizando el papel que tiene el aporte sanguíneo insuficiente a la cabeza del nervio óptico y las células retinianas adyacentes en ausencia de PIO elevada. Otros factores de riesgo que se están evaluando actualmente son: hipotensión sanguínea, hipotensión ortostática, hipotensión nocturna, migrañas, apnea del sueño o diabetes.

En la actualidad el tratamiento del glaucoma se basa en mantener la función y el campo visual del paciente mediante la protección de las estructuras oculares afectadas por la enfermedad. Con este objetivo se emplean distintas estrategias:

1. Reducción de la PIO por debajo o hasta el valor considerado como seguro. Este valor se establece en función del estado del nervio óptico y la actividad y esperanza de vida del paciente. La administración tópica de agentes hipotensores es el tratamiento de inicio en la mayoría de las ocasiones, reservando la trabeculoplastia láser o la cirugía filtrante para aquellos pacientes en los que no se obtenga una PIO que permita controlar la enfermedad.

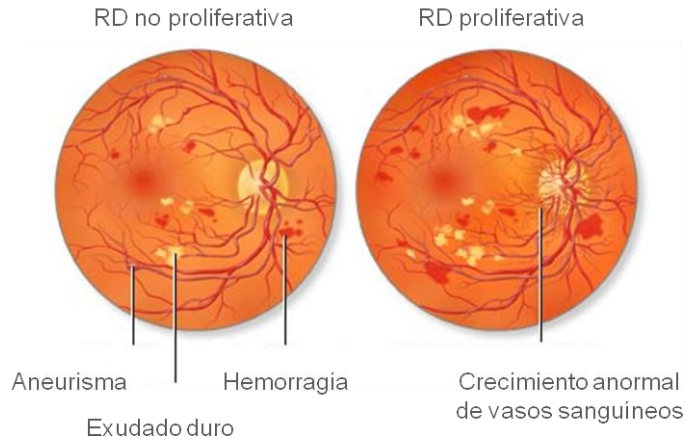
2. Mantenimiento o incremento de la presión de perfusión ocular (PPO) del nervio óptico y la retina. La PPO se define como la diferencia entre la presión de las arterias que irrigan el ojo y la PIO. La alteración en la PPO afecta al flujo sanguíneo ocular ocasionando alteraciones en la perfusión de la retina y el nervio óptico. Al incrementar la PIO, la PPO disminuye de forma proporcional. Por tanto, la reducción de la PIO es el tratamiento más directo para aumentar la PPO.
  
3. Protección de la cabeza del nervio óptico y las células ganglionares de la retina de los mediadores químicos y otros agentes tóxicos que surgen como resultado de daños neuronales debidos a PIO elevadas, infartos vasculares u otros factores desconocidos. En este caso la administración de agentes neuroprotectores o agentes antioxidantes es el tratamiento indicado.

#### **1.4.3. Retinopatía diabética (RD)**

La retinopatía diabética (RD) constituye una de las cuatro causas más frecuentes de ceguera, siendo la principal en pacientes de edades comprendidas entre 20 y 64 años. Aproximadamente el 25% de la población diabética presenta alguna forma de retinopatía. La prevalencia y la incidencia de la RD están relacionadas con el tipo, duración y tratamiento de la diabetes, con determinados factores sistémicos, como la hipertensión arterial, y con el control de la glucemia en los primeros estadios de la enfermedad.

La RD es una alteración vascular y parenquimatosa, secundaria a la microangiopatía que afecta al lecho vascular retiniano. La patogenia de esta enfermedad se desconoce en la actualidad. Hay evidencias de la existencia de una serie de alteraciones anatomopatológicas, hemorreológicas y bioquímicas, pero es difícil establecer una secuencia de los mecanismos implicados<sup>92-94</sup>.

La RD se puede clasificar en dos tipos: la retinopatía diabética no proliferativa y la retinopatía diabética proliferativa.



**Figura 12** Representación de una retina con RD no proliferativa y proliferativa.

La *RD no proliferativa* se caracteriza por la formación de microaneurismas, dilataciones capilares inicialmente asintomáticas. A medida que se incrementa la severidad de la enfermedad es frecuente encontrar otros síntomas como exudados duros o céreos compuestos por proteínas séricas, hemorragias retinianas, alteraciones venosas, oclusiones vasculares que pueden originar isquemia vascular o edema macular<sup>92</sup>.

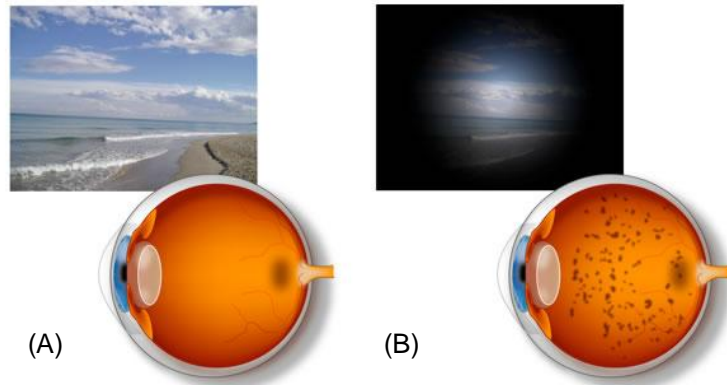
La *RD proliferativa* ocurre principalmente como consecuencia de la hipoperfusión de los vasos sanguíneos de la retina, impidiendo la llegada de un flujo suficiente de sangre. En un intento por suministrar sangre a la zona donde los vasos originales se han obstruido, la retina responde produciendo factores vasoproliferativos que dan lugar a nuevos vasos sanguíneos. Este proceso es conocido como neovascularización. Sin embargo, los nuevos vasos sanguíneos formados también son anormales y no proporcionan a la retina el flujo sanguíneo adecuado. A menudo, van acompañados por tejidos fibrosos que pueden originar hemorragias vítreas y desprendimiento de retina. Además, la complicación más grave de la RD proliferativa es el glaucoma hemorrágico o neovascular, producido por la neovascularización a nivel de los vasos del iris, que se extiende hasta la cámara anterior obstruyendo la salida del humor acuoso<sup>92</sup>.

El tratamiento de la RD incluye la realización de un control estricto de los niveles de glucosa en sangre y la actuación farmacológica para disminuir los valores de hipertensión arterial e hiperlipemia. Además, se emplean otros recursos terapéuticos como la fotocoagulación laser, crioterapia y vitrectomía que se aplican con frecuencia en esta patología. Actualmente, la inyección intravítrea de agentes anti-VEGF (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial) ha demostrado tener buenos resultados frente a la RD<sup>92, 95, 96</sup>.

#### **1.4.4. Retinosis pigmentaria (RP)**

La retinosis pigmentaria (RP) es un conjunto de enfermedades oculares crónicas de origen genético y carácter degenerativo que afecta aproximadamente a 1 de cada 3700 personas. Es la primera causa de ceguera de origen genético en la población adulta comprendida entre los 20-60 años. Su prevalencia es mayor en hombres que en mujeres.

La RP se caracteriza por producir una degeneración progresiva de la retina. La alteración inicial afecta principalmente a los conos y bastones situados en el ecuador del ojo, posteriormente el epitelio pigmentario de la retina empieza a mostrar cambios degenerativos y proliferativos. La RP produce una pérdida gradual de la visión nocturna y del campo visual periférico con una conservación relativa del campo visual central. Entre las principales manifestaciones clínicas de esta enfermedad se encuentran: agregaciones pigmentarias, alteraciones circulatorias de la coroides, agudeza visual deteriorada, degeneración del EPR, atrofia coriocapilar, opacificaciones corneales o estrechamiento de los vasos retinianos<sup>97</sup>.



**Figura 13** Representación de la visión y fondo de ojo de un sujeto sano (A) y un sujeto afectado por RP (B).

Aunque se está avanzando continuamente en el conocimiento de esta enfermedad, las alteraciones genéticas que la causan y los mecanismos biológicos por los que se origina, no se ha conseguido hasta el momento actual ningún tratamiento eficaz que permita restablecer la visión o detener el curso natural de su evolución. Las estrategias terapéuticas se encaminan hacia la ralentización del proceso degenerativo, el tratamiento de las complicaciones oculares y la ayuda psicológica a los pacientes afectados.

Actualmente, existen diferentes enfoques terapéuticos en función del estado de la enfermedad:

1. En las fases tempranas, donde aún existe supervivencia de fotorreceptores, se trata de detener la degeneración de los mismos corrigiendo la alteración bioquímica del ciclo visual, para ello se emplea terapia génica<sup>98</sup> o tratamientos farmacológicos basados en la administración de vitaminas, especialmente la Vitamina A<sup>99</sup>.
2. En etapas más avanzadas en las que es necesario hacer frente a la muerte de fotorreceptores, se administran factores neurotróficos<sup>100</sup> y antiapoptóticos<sup>101</sup>, que limitan la producción de moléculas tóxicas en la retina y reducen el daño oxidativo.

3. Por último, cuándo no existen o quedan muy pocos fotorreceptores activos es necesario realizar un trasplante de retina<sup>102</sup>.

#### **1.4.5. Neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL)**

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL) es una degeneración de las CGR y sus axones, que conlleva una pérdida aguda o subaguda de visión central. Esta patología afecta fundamentalmente a varones adultos jóvenes. Sin embargo, se transmite únicamente a través de mujeres (de la madre a todos sus hijos). La NOHL se debe habitualmente a mutaciones puntuales patogénicas en el ADN mitocondrial<sup>103</sup>.

El inicio de la enfermedad de Leber suele ser repentino, generalmente sin dolor, provocando una pérdida visual central, que afecta a ambos ojos y es simétrica en la mayoría de los casos. En la fase aguda, es frecuente observar una apariencia edematosa en la capa de fibras nerviosas de la retina y vasos peripapilares inflamados (microangiopatía). Además, se observan alteraciones en la vasculatura retiniana<sup>104</sup>. Este comienzo agudo evoluciona a una atrofia óptica severa y una disminución permanente de la agudeza visual debido a la rápida pérdida axonal<sup>103</sup>. Entre los síntomas que acompañan a esta patología se encuentra la sensación de niebla en los ojos, trastornos en la visión de los colores, cansancio rápido al leer, oscilación de la visión, cefalea o dolor orbitario<sup>97</sup>.

En la actualidad, las opciones para tratar la NOHL o cualquier otra neuropatía óptica inherente están muy limitadas<sup>105</sup>. Sin embargo, se pueden seguir ciertas pautas para mejorar la calidad de vida del paciente y minimizar el empeoramiento de la enfermedad a largo plazo. No es recomendable para estos pacientes el consumo de tabaco y alcohol, ya que ambos están ligados a un incremento de la pérdida visual<sup>103</sup>. Los suplementos multivitamínicos, coenzima Q10 y sus derivados y secuestradores de radicales libres podrían ser útiles en el tratamiento de la NOHL, aunque su efectividad aún no ha sido demostrada. La brimonidina (agonista  $\alpha$ -2 adrenérgico), también ha sido empleada tópicamente, pero hasta el momento no ha demostrado tener efectos beneficiosos<sup>106</sup>. La terapia génica y la administración de fármacos

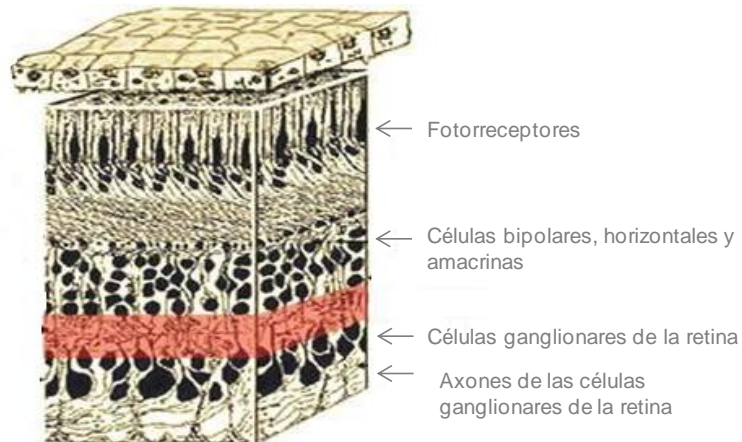
neuroprotectores se contemplan como las futuras estrategias para el tratamiento de esta patología<sup>103</sup>.

### 1.5. Neuroprotección ocular

El concepto de neuroprotección tiene su origen en la investigación pionera que desarrolló Rita Levi-Montalcini en la década de los 50. Su trabajo en las células nerviosas de embriones de pollo le llevó a descubrir el factor de crecimiento neuronal (NGF), lo que supuso un gran avance en el campo de la neurobiología. El NGF está englobado dentro de la categoría de moléculas neurotróficas, que son aquellas que intervienen en el desarrollo de las células del sistema nervioso y son capaces de regular la conexión entre las células diana y las neuronas que las inervan<sup>107</sup>.

La **neuroprotección** se define como la terapia basada en prevenir, limitar y en algunos casos revertir la degeneración o muerte de las células neuronales mediante el bloqueo de los mecanismos que la desencadenan, independientemente de cuál haya sido el daño primario. A nivel ocular, las células ganglionares de la retina y el nervio óptico forman parte del sistema nervioso central y por tanto son susceptibles de sufrir ambos procesos<sup>108, 109</sup>.

Investigaciones llevadas a cabo en el campo de la fisiología celular han demostrado que el proceso de **neurodegeneración** puede describirse, cronológicamente hablando, en tres pasos: (1) daño axonal primario; (2) muerte de la neurona dañada, y (3) daño y posterior muerte de neuronas adyacentes, en lo que se denomina “degeneración secundaria”. Esta degeneración secundaria ocurre pues, en neuronas inicialmente no dañadas pero que acaban muriendo por exposición a agentes citotóxicos liberados por la muerte de las neuronas con daño axonal primario. Basándose en estos hechos, la neuroprotección se centra en la protección de estas neuronas susceptibles de sufrir “degeneración secundaria” y resulta útil incluso cuando se desconoce la causa inicial de la enfermedad<sup>110</sup>.



**Figura 14** Estructura de las distintas capas de la retina, dónde se encuentran las CGR.

Diversos estudios han demostrado que la apoptosis es el mecanismo fundamental en la muerte de CGR. El término apoptosis fue descrito por Kerr en 1972 y consiste en una muerte celular programada que se activa cuando una célula deja de ser necesaria o ha sido lesionada de forma severa<sup>111</sup>. Este proceso de muerte celular puede ocurrir tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La apoptosis fisiológica tiene dos funciones principales, por un lado la regulación del número de células durante el desarrollo, de esta forma, por ejemplo, las células ganglionares que no son capaces de llevar a cabo la sinapsis con los núcleos del ganglio geniculado lateral se eliminan mediante este vía, y por otro lado el mecanismo de homeostasis del adulto, que regula el recambio celular normal. En cuanto a la apoptosis en condiciones patológicas, ésta se ve activada de forma inapropiada en enfermedades neurodegenerativas<sup>112, 113</sup>.

El proceso apoptótico en las CGR puede desencadenarse por varios factores, basándonos en los diversos mecanismos inductores de la apoptosis podemos establecer diferentes líneas de tratamiento:

### **1.5.1. Prevención de la excitotoxicidad inducida por glutamato:**

El glutamato es un aminoácido esencial que juega un papel importante como principal neurotransmisor excitador en la retina. Su función se basa en mediar la transmisión de señales desde los fotorreceptores a las células bipolares y CGR. Sin embargo, cuando sus niveles se encuentran muy elevados resulta tóxico y provoca la muerte neuronal. Este fenómeno es conocido como excitotoxicidad. Altas concentraciones de glutamato hiperestimulan los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), que a su vez abren los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  presentes en las células, aumentando la concentración de ambas iones a nivel intracelular. Este exceso intracelular de cationes provoca la formación de radicales libres, incluido el óxido nítrico (NO), y la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, que conlleva la liberación de citocromo C y la posterior activación de caspasas involucradas en la apoptosis<sup>108, 109, 114-116</sup>.

La excitotoxicidad inducida por glutamato puede prevenirse mediante la administración de antagonistas de los receptores NMDA, entre los que destacan la *memantina* y el *MK801*.

La **memantina** (1-amino-3,5-dimetiladamantano), es un derivado de la amantadina cuya estructura se compone de tres anillos, un grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) y dos grupos metilo ( $-\text{CH}_3$ ) que son responsables de prolongar el tiempo de residencia y la afinidad de la memantina por su receptor<sup>115</sup>.

La memantina es un antagonista no competitivo. Tiene un sitio específico de unión en los receptores NMDA, pero no puede acceder a él a menos que el glutamato se haya unido previamente y haya inducido la apertura del canal (de ahí que se denomine bloqueante de los canales abiertos). Sólo actúa en condiciones patológicas, cuando las concentraciones de glutamato en el espacio sináptico son elevadas, situación frecuente en enfermedades neurodegenerativas, dando lugar a una gran proporción de canales abiertos que posibilitan el acceso de la memantina a su lugar de acción, siendo inefectiva en el caso de actividad neurológica normal<sup>115, 117</sup>.

La memantina está aprobada por la FDA para el tratamiento del Alzheimer y también ha demostrado ser eficaz en la enfermedad de Parkinson. Se trata del único agente neuroprotector que ha llegado a completar la fase III de ensayos clínicos en pacientes con glaucoma. Sin embargo, aunque la progresión de la enfermedad fue menor en pacientes que recibían altas dosis de memantina respecto a los que recibían dosis menores, la memantina no demostró un efecto beneficioso frente al placebo, debido probablemente a que este fármaco actúa sólo en un número determinado de CGR con una determinada densidad de receptores NMDA, mientras que la apoptosis podría producirse en otras células ganglionares por diferentes mecanismos<sup>108, 116, 118</sup>.

**MK801** también conocido como maleato de 5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d] cicloheptan-5,10-imina, es otro antagonista no competitivo de los receptores NMDA que ha demostrado su efecto neuroprotector *in vitro* protegiendo las CGR<sup>119</sup> e *in vivo* en modelos experimentales de daño del nervio óptico<sup>120</sup> e hipertensión ocular<sup>121</sup>. Sin embargo, MK801 no puede ser utilizado en la práctica clínica debido a sus efectos neurotóxicos. Su elevada afinidad por los receptores y el prolongado tiempo de permanencia en los mismos provoca la acumulación de MK801 en los canales bloqueando las funciones normales<sup>108, 109</sup>.

### **1.5.2. Prevención de la disfunción mitocondrial:**

Las mitocondrias están presentes en la mayoría de células eucariotas y son las responsables de producir la energía química que las células necesitan para realizar sus funciones vitales, su proliferación y diferenciación. La disminución en el potencial de membrana mitocondrial y el incremento en la permeabilidad de la membrana son factores que están implicados en la apoptosis de las CGR. Diversos estudios han demostrado que la hipoxia, el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y el estrés oxidativo pueden llevar a una disfunción mitocondrial mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), originando niveles neurotóxicos que provocan la muerte celular<sup>108, 109, 116, 122</sup>.

Existen varios compuestos que han demostrado prevenir la apoptosis actuando a nivel mitocondrial: ácido lipóico, eritropoyetina, creatina, FK506, etc. Entre todos ellos, destaca la **Coenzima Q10 (CoQ<sub>10</sub>)** o ubiquinona, que juega un papel crucial en el metabolismo energético y tiene una gran potencial como neuroprotector.

La CoQ<sub>10</sub> es un co-factor que actúa en la cadena respiratoria y es responsable del transporte de electrones desde el Complejo I y II hasta el Complejo III, facilitando la producción de ATP. Ha demostrado ser efectiva en diferentes modelos animales de patologías neurodegenerativas, como el Parkinson, Alzheimer, enfermedad de Huntington o ataxia de Friedreich<sup>123</sup>. A nivel ocular, también ha puesto de manifiesto su efecto neuroprotector en CGR *in vivo* e *in vitro*<sup>124</sup>. Se han postulado tres mecanismos por los cuales la CoQ<sub>10</sub> podría ejercer sus efectos neuroprotectores: 1) Provocando el incremento del Complejo I en la cadena de transporte electrónico, 2) Inhibiendo la acción del factor nuclear B, un factor de transcripción involucrado en la inflamación, enfermedades autoinmunes, infecciones virales y que además está ligado al cáncer y 3) Inhibiendo la apertura del poro de transición en la permeabilidad mitocondrial. Además, es necesario señalar su efecto antioxidante y su participación en la regulación de la expresión genética<sup>108, 109</sup>.

### **1.5.3. Administración de agentes antioxidantes:**

El término “estrés oxidativo” se refiere a la situación en la cual la producción de ROS alcanza niveles patológicos y la capacidad antioxidante de la célula es insuficiente para protegerse frente al daño oxidativo. Situaciones de isquemia, producidas generalmente por una disfunción a nivel vascular que altera la autoregulación del flujo sanguíneo ocular y origina fluctuaciones en la perfusión de la cabeza del nervio óptico, pueden inducir estrés oxidativo, activando los mecanismos de muerte celular en las CGR y dañando la malla trabecular, la cabeza del nervio óptico y la retina<sup>108, 109, 116, 122</sup>.

Puesto que el estrés oxidativo está involucrado en todos los procesos de muerte celular, incluida la muerte de CGR, la administración de agentes

antioxidantes es una estrategia a seguir en el tratamiento de enfermedades degenerativas que afectan a la retina y al nervio óptico.

El **EGb761** es un extracto procedente de las hojas de Ginkgo Biloba constituido mayoritariamente por flavonoides (24%) y terpenoides (6%). Es un excelente antioxidante que inhibe la apoptosis inducida químicamente, posee propiedades antiinflamatorias y es antioxidante plaquetario. Además, tiene efecto vasomodulador sobre los vasos sanguíneos, incrementando la velocidad del flujo sanguíneo a nivel ocular<sup>108</sup>. El EGb761 ha demostrado tener efecto neuroprotector sobre las CGR en un modelo experimental de rata con glaucoma crónico<sup>125</sup>. Aunque su mecanismo de acción está todavía sin definir, se cree que sus efectos son atribuibles a las diversas actividades que ejercen los flavonoides, incluyendo la capacidad de secuestrar radicales libres y de modular la transducción de señales en distintas vías apoptóticas (reduce la transducción de señales dependientes de  $Ca^{2+}$  e inhibe la actividad de la proteína quinasa C)<sup>126</sup>.

La **melatonina** es un potente antioxidante y secuestrador de radicales libres que desempeña un papel relevante en la circulación del humor acuoso y tiene actividad neuroprotectora. Entre sus funciones destaca la protección en la ruptura de las cadenas de ADN, la reducción de la apoptosis inducida por NO, la protección de neuronas frente al daño inducido por el ácido kaínico (potente excitotoxina) y la inhibición en la liberación de Citocromo C a través del poro de transición mitocondrial<sup>108, 127</sup>. La melatonina ha demostrado su potencial como neuroprotector incrementado la supervivencia de las CGR en un modelo experimental de ratón con sección del nervio óptico<sup>128</sup>.

La **vitamina E** es el mayor antioxidante lipídico presente en las células y actúa como secuestrador de radicales libres. Algunos estudios sugieren que en pacientes glaucomatosos que reciben vitamina E se produce un incremento en el campo visual, sin embargo, no se han realizado aún estudios a largo plazo<sup>109</sup>. Puesto que la vitamina E es uno de los componentes que forma parte de la formulación desarrollada en este trabajo de investigación, su estructura y actividad serán descritas detalladamente posteriormente.

### **1.5.4 Prevención de la agregación proteica:**

La formación de agregados proteicos es una causa común en el desarrollo de las patologías neurodegenerativas. Las proteínas implicadas se auto-ensamblan dando lugar a estructuras fibrilares que alteran su funcionalidad, provocan toxicidad y muerte celular. Existen dos mecanismos por los cuales estos agregados pueden producir citotoxicidad: Por un lado, las proteínas alteradas se agregan y no pueden desarrollar sus funciones normales, por otro lado, se piensa que estos agregados se hacen tóxicos al interferir en los procesos celulares normales y atrapar otras proteínas. En concreto, la proteína amiloide  $\beta$  es el componente mayoritario de los agregados encontrados en diversas neuropatologías, como el Parkinson o el Alzheimer. Además, recientes estudios han demostrado la alteración de esta proteína en diversas patologías retinianas, como DMAE o glaucoma<sup>108, 109, 129</sup>.

Por otro lado, las proteínas de choque térmico (HSP), un grupo de chaperonas que se expresan normalmente en pequeñas cantidades, también están involucradas en procesos neurodegenerativos. Sus niveles se encuentran elevados en pacientes glaucomatosos como mecanismo de respuesta celular frente a situaciones de estrés<sup>129, 130</sup>.

Para evitar la agregación proteica típica en estas patologías neurodegenerativas es necesaria la administración de fármacos que actúen sobre las proteínas involucradas ( $\beta$ -amiloide y HSP). En este sentido, se ha estudiado la administración de **inhibidores  $\beta$  amiloides** (Rojo congo o anticuerpos anti- $\beta$  amiloide) e **inhibidores de la enzima  $\beta$  secretasa** (Z-VLL-CHO), que han demostrado tener actividad neuroprotectora, disminuyendo la apoptosis de las CGR tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, se ha observado que la triple terapia combinando un inhibidor de la enzima  $\beta$  secretasa, rojo congo y un anticuerpo anti- $\beta$  amiloide, posee un efecto neuroprotector superior en un modelo de rata con hipertensión ocular comparado con el tratamiento de estos compuestos por separado<sup>129</sup>.

Por otro lado, la administración sistémica del agente antiulceroso **geranil-geranil-acetona** ha producido un incremento en la expresión de la chaperona HSP-72 con una marcada reducción en la pérdida de CGR en un modelo de rata glaucomatosa<sup>131</sup>.

### **1.5.5 Administración de agentes antiinflamatorios:**

Los mecanismos inmunes pueden jugar un papel importante en la muerte de las CGR en glaucoma así como en otras neuropatías ópticas. Recientes trabajos sugieren que la activación de la microglía en respuesta a un daño, enfermedad, edad u otras causas, desencadena una cascada de eventos que se relacionan con procesos inflamatorios<sup>132-134</sup>. Dentro de los agentes antiinflamatorios se encuentra el **copolímero 1 (Cop-1)**, es un oligopéptido con actividad antiinflamatoria formado por residuos de tirosina, glutamato, lisina y alanina, que ha sido aprobado por la FDA en el tratamiento de esclerosis múltiple. Es un análogo sintético de baja afinidad de la proteína básica de mielina, que activa una respuesta neuroprotectora autoinmune mediante su unión al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) y la activación de células T. El Cop-1 ha demostrado tener actividad neuroprotectora sobre las CGR en un modelo de rata con aplastamiento de nervio óptico, en modelos animales con elevada PIO y frente a la excitotoxicidad inducida por glutamato<sup>135-137</sup>.

Por otra parte, el TNF es una potente citoquina proinflamatoria que promueve los mecanismos de muerte celular mediante su unión al receptor 1, formando el complejo TNF-R1 que activa la muerte a nivel mitocondrial. TNF-R1 está implicado en procesos neurodegenerativos como el glaucoma o la isquemia retiniana<sup>108</sup>. Por tanto, la administración de fármacos que modifiquen la liberación de TNF puede ser efectiva en el tratamiento neuroprotector de estas patologías. Es el caso del **GLC756**, un fármaco antiglaucomatoso y dopaminérgico que ha demostrado inhibir la producción de TNF en mastocitos activados de rata<sup>138</sup>.

### **1.5.6 Administración de factores neurotróficos exógenos:**

Los factores neurotróficos o neurotrofinas son proteínas segregadas encargadas de modular el crecimiento, la diferenciación, la reparación y la supervivencia de las neuronas. La categoría de factores neurotróficos engloba una amplia variedad de compuestos. Entre ellos, se encuentran la neurotrofina 3, 4 y 5 (NT-3 y NT4/5), el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF), el Factor Neurotrófico Derivado de la Glia (GDNF), así como el Factor Neurotrófico Derivado de Nervio Ciliar (CNTF)<sup>108, 109, 112</sup>.

Los factores neurotróficos ejercen su función uniéndose a dos tipos de receptores específicos, la familia de los receptores tirosina quinasa (TRK) y el receptor P75NTR, desencadenando una cascada de eventos que afectan a múltiples funciones vitales en el metabolismo de las células. Una vez producida la unión a los receptores se activan los mecanismos de supervivencia celular<sup>116, 139, 140</sup>.

Aunque en la retina se sintetizan los factores neurotróficos y sus receptores a nivel local<sup>141, 142</sup>, la principal fuente de aporte es el cerebro. Su transporte retrógrado es llevado a cabo mediante señalización endosómica. Tras la unión de las neurotrofinas, los receptores TRK situados en el extremo del axón son activados. El complejo formado se internaliza por endocitosis y es transportado de forma retrógrada desde el axón hasta el cuerpo celular. En condiciones de elevada PIO el aporte sanguíneo que llega a la retina se ve comprometido por el exceso de presión, viéndose afectado el tejido neuronal. Además, al aumentar la presión sobre el tejido conectivo de la cabeza del nervio óptico (lámina cribosa), se interrumpe el flujo axo-plasmático, bloqueando la llegada de factores neurotróficos endógenos al cuerpo neuronal. Ante estas carencias, las células pueden desencadenar un proceso natural de apoptosis<sup>89, 108, 116, 139, 140</sup>. Minckler *y col.* demostraron que existía una obstrucción en el transporte axonal a nivel de la cabeza del nervio óptico en primates con elevada presión intraocular (PIO)<sup>143</sup>. Además, Quigley *y col.* observaron que cuando se produce una elevación aguda de la PIO en ratas, el transporte retrógrado de BDNF está bloqueado<sup>144</sup>.

En base al hecho de que la obstrucción del transporte retrógrado en la cabeza del nervio óptico da lugar a la privación de factores neurotróficos en las CGR originando muerte celular, la administración exógena de los mismos es uno de los posibles tratamientos para prolongar la supervivencia de estas células dañadas. Actualmente, se está estudiando la administración de distintos factores neurotróficos, entre los que se encuentran el GDNF, el BDNF o el CNTF.

El **CNTF** (Factor Neurotrófico del Nervio Ciliar) es una proteína citosólica expresada después del nacimiento en astrocitos y células de Schwann. Estudios realizados con este agente neuroprotector indican que el CNTF promueve la supervivencia de determinadas neuronas a nivel del sistema nervioso periférico y puede provocar cambios fenotípicos en el sistema nervioso central<sup>145</sup>.

El CNTF interviene en la supervivencia de neuronas en diferentes estados de su desarrollo, además de participar en los procesos de diferenciación durante el desarrollo del nervio óptico. Al contrario que el NGF y otros factores neurotróficos, el CNTF no ha demostrado ser transportado de forma retrógrada. Mediante su unión al receptor (CNTFR $\alpha$ ) y a dos subunidades de transmembrana (gp 130 y LIFR) activa la quinasa Janus y el activador de transcripción (JAK-STAT), vía a través de la cuál promueve la supervivencia de neuronas en el sistema nervioso central<sup>146</sup>.

El efecto neuroprotector del CNTF sobre las CGR ha sido estudiado por Ji y *col.* en un modelo experimental de glaucoma (ratas con elevada PIO inducida mediante laser). En el modelo animal, una única administración de 2  $\mu$ g de CNTF ha demostrado ser eficaz en la protección de estas células 4 semanas después de recibir el tratamiento<sup>146</sup>.

El **BDNF** (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro) es la neurotrofina más estudiada hasta el momento a nivel ocular. Su administración exógena ha demostrado prolongar la supervivencia de CGR *in vitro* y su inyección

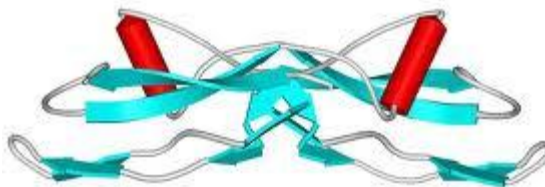
intravítrea en distintos modelos animales, como los de aplastamiento y sección del nervio óptico, también ha sido eficaz en la protección de estas células<sup>147-150</sup>.

El **GDNF** (Factor Neurotrófico Derivado de la Glía) es otro de los agentes neurotróficos administrados con el objetivo de evitar la pérdida de CGR. Su efecto neuroprotector se ha estudiado en diferentes patologías neurodegenerativas<sup>151, 152</sup>.

Dado que los agentes neuroprotectores GDNF y BDNF formarán parte de las formulaciones desarrolladas en esta memoria, su estructura, actividad y mecanismos de acción serán detallados a continuación.

### 1.6. Factores neurotróficos: GDNF Y BDNF

El **Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (GDNF)** es un homodímero peptídico glicosilado con una masa comprendida entre 15 - 20 kDa para cada monómero. Los monómeros son polipéptidos de 134 aminoácidos que llegan a la forma activa como dímeros a través de uniones disulfato. En cada subunidad aparecen siete residuos de cisteína que dan lugar a tres uniones intramonoméricas (Cys<sup>41</sup>-Cys<sup>102</sup>, Cys<sup>68</sup>-Cys<sup>131</sup> y Cys<sup>72</sup>-Cys<sup>133</sup>). A su vez, ambos monómeros se dimerizan entre las Cys<sup>101</sup> a través de un único puente disulfuro<sup>153, 154</sup>.



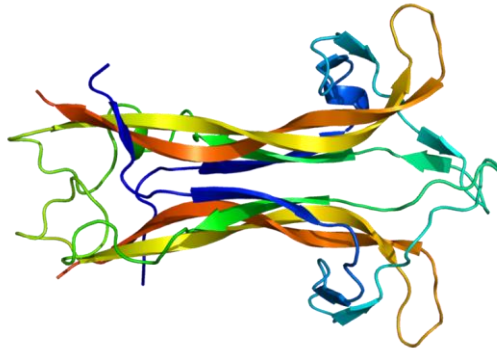
**Figura 15** Estructura cuaternaria del GDNF.

El GDNF es un potente factor trófico que actúa fundamentalmente en el sistema nervioso, aunque también se han encontrado evidencias sobre una

posible regulación no neuronal. Así, la primera implicación que se demostró fue en la enfermedad de Parkinson, incrementando la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas y las motoneuronas. Otras aplicaciones en trastornos neurodegenerativos fueron en neuronas motoras de la médula espinal y neuronas noradrenérgicas centrales. Además, este agente neurotrófico ha demostrado estar implicado en otros procesos como la regulación de la inervación entérica, la modulación de la espermatogénesis o la formación de los riñones<sup>155, 156</sup>.

Esta proteína actúa directamente a través de un receptor de superficie GFR  $\alpha$  e indirectamente a través del receptor de transmembrana Ret (Receptor tirosina Kinasa, TRK)<sup>156</sup>. En el ojo, tanto el GDNF como sus receptores son producidos por la retina, células de la lámina cribosa y los astrocitos que forman la cabeza del nervio óptico, aportando efectos neurotróficos endógenos<sup>155, 157</sup>. Se ha demostrado que la administración de este factor de forma exógena es eficaz en la terapia neuroprotectora retrasando la muerte de los fotorreceptores e incrementando la supervivencia de CGR dañadas<sup>50, 151, 158, 159</sup>. Además, este agente neurotrófico aumenta la expresión de opsina en fotorreceptores y ayuda a mantener la funcionalidad mitocondrial de estas células disminuyendo su muerte por apoptosis<sup>160</sup>. Aparte de sus efectos neuroprotectores, el GDNF desempeña un papel crítico en la regulación de la permeabilidad vascular en la retina. Aunque su mecanismo de acción no está bien establecido, existen evidencias que relacionan a esta proteína con la limitación de la permeabilidad vascular a través de las "tight junctions", en las células capilares endoteliales que se encuentran en la barrera hematorretiniana, de forma que, podría interferir disminuyendo la hiperpermeabilidad que se origina en algunas patologías retinianas (RD, DMAE, etc.)<sup>96</sup>.

El **Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF)**, al igual que el GDNF y otras neurotrofinas (NGF, NT-3/4/5), tiene una estructura de homodímero peptídico que presenta 3 uniones disulfuro intramonoméricas y una intermonomérica que dan lugar a la forma activa. Cada monómero posee una masa de 13.6 kDa y está formado de aproximadamente 120 aminoácidos<sup>161, 162</sup>.



**Figura 16** Estructura cuaternaria del BDNF.

Este factor neuroprotector se une con alta afinidad y especificidad al receptor tirosina kinasa TRKB. Además, la glicoproteína P75NTR actúa como un receptor de baja afinidad. Existen altos niveles de expresión de BDNF en el hipocampo, cerebelo, tejido ocular fetal y placenta. Además, se han detectado niveles inferiores en la glándula pituitaria, médula espinal, corazón, pulmón y músculo esquelético<sup>161, 163, 164</sup>.

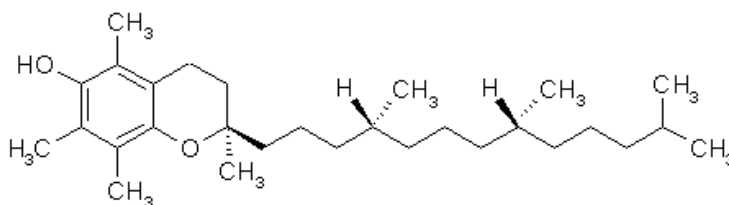
El BDNF desempeña un papel fundamental en la formación del sistema nervioso central y periférico de los vertebrados durante el desarrollo embrionario, regulando la muerte neuronal normal. Por tanto, tiene un gran potencial en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, actuando sobre poblaciones específicas de neuronas que se ven afectadas en este tipo de patologías. El BDNF ha demostrado aumentar la supervivencia y prevenir la degeneración de motoneuronas (esclerosis lateral amiotrófica), neuronas sensoriales (neuropatías sensitivas), neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (enfermedad de Parkinson) o neuronas colinérgicas del prosencéfalo (enfermedad de Alzheimer)<sup>165</sup>.

En el ojo, el BDNF se expresa en varias células de la retina, incluidas las células gliales de Müller y las CGR<sup>166</sup>. Sus receptores están ubicados en la capa nuclear interna, en la capa de CGR y en los axones del nervio óptico<sup>144, 167</sup>. Este agente neuroprotector ha demostrado incrementar la supervivencia de los fotorreceptores en degeneraciones retinianas congénitas, toxicidad lumínica o desprendimiento de retina. Además, el BDNF parece tener un importante

papel como protector del sistema nervioso central, en casos de excitotoxicidad inducida por glutamato y estrés oxidativo<sup>144, 148, 168</sup>.

### 1.7. Vitamina E

La vitamina E pertenece al grupo de las vitaminas liposolubles y forma parte de una familia de compuestos poliprenoides. En su estado natural, la vitamina E tiene ocho formas diferentes de isómeros, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Todos los isómeros tienen un anillo aromático, llamado cromano, con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide saturada. Existen formas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ) y delta ( $\delta$ ) para ambas familias de compuestos, que se determinan por el número de grupos metílicos en el anillo aromático. Cada una de las formas tiene su propia actividad biológica, siendo la más eficaz el  $\alpha$ -tocoferol.



**Figura 17** Estructura química del  $\alpha$ -tocoferol.

La Vitamina E ha demostrado poseer efectos beneficiosos derivados fundamentalmente de su capacidad antioxidante. El estrés oxidativo es uno de los factores de riesgo implicados en la patogénesis de diversas enfermedades oftálmicas. El daño tisular debido a la oxidación se produce mediante una reacción en cadena, que fundamentalmente se inicia por la producción de radicales libres de oxígeno. Estas especies reactivas interfieren en los mecanismos de regulación y de transducción de señales a nivel intracelular provocando alteraciones en el DNA y en macromoléculas como las proteínas y los lípidos<sup>169</sup>.

Los radicales libres que se generan como consecuencia del estrés oxidativo son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado y que son muy reactivos puesto que tienden a robar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. En este sentido, los agentes antioxidantes, como la vitamina E, actúan cediendo estos electrones que serán captados por los radicales libres desencadenando una reacción de oxido-reducción. La vitamina E, al liberar un electrón se oxida dando lugar a una estructura intermedia que posteriormente se convertirá en  $\alpha$ -tocoferilquinona. Tanto el ascorbato como los carotenoides pueden interferir en este proceso, reciclando el producto intermedio de la vitamina E generado<sup>170</sup>.

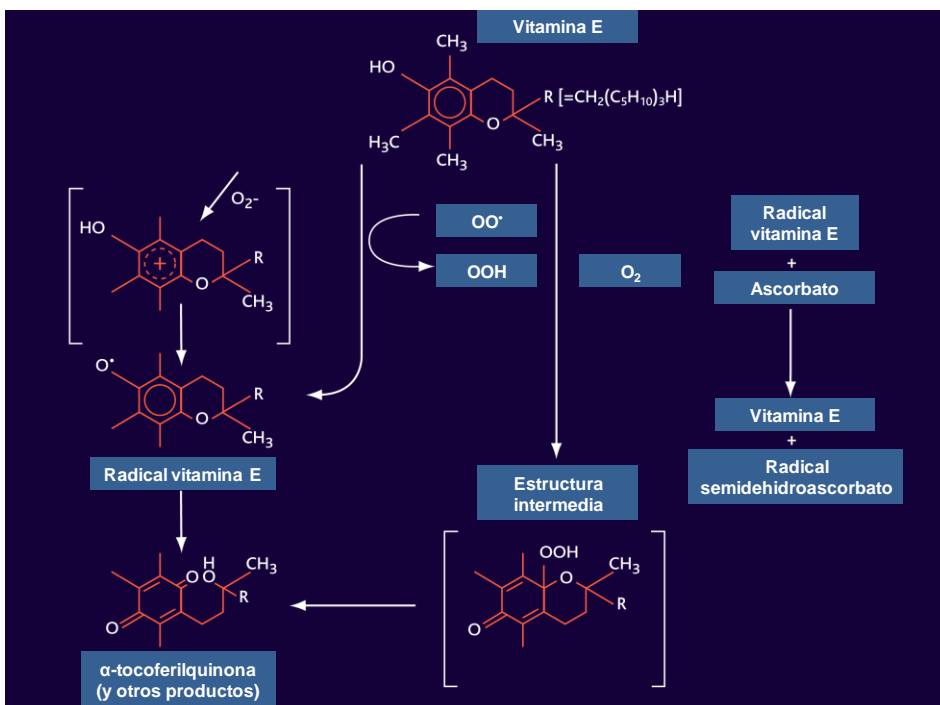


Figura 18 Mecanismo antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol.

La retina es particularmente susceptible de sufrir oxidación debido a diversas razones:

1. La coroides es un capa altamente vascularizada que aporta una elevada concentración de oxígeno a la retina. En los primeros estadios de la vida, este elevado aporte de oxígeno junto con un flujo sanguíneo mal regulado (debido a un exceso de vasodilatadores y un defecto de vasoconstrictores) y una baja cantidad de antioxidantes en el organismo favorece la peroxidación.
2. En la fovea existe una elevada densidad celular y por tanto, un incremento en la actividad metabólica, por lo que es más probable la aparición de estrés oxidativo.
3. Los fotorreceptores y las CGR son ricos en ácidos grasos poliinsaturados, por tanto, altamente susceptibles de sufrir peroxidación lipídica. Además, los procesos metabólicos, la degradación de oxígeno y la síntesis de ATP están aumentados en estas células, mientras que la velocidad de regeneración celular está disminuída.
4. En la retina existen compuestos fotosensibilizadores que estimulan la generación de radicales libres.

Debido a estas condiciones, la retina posee un ambiente pro-oxidativo y como consecuencia, tanto la retina como el epitelio pigmentario de la retina tienen su propio sistema antioxidante para protegerse, compuesto fundamentalmente por vitaminas (Vitaminas C y E) y carotenoides (Luteína y Zeaxantina)<sup>170</sup>.

Dado que la formación de radicales libres y el estrés oxidativo están claramente relacionados con la patogenia de diversas enfermedades oculares, la administración de vitaminas antioxidantes y carotenoides ayudaría a retrasar el daño oxidativo que se produce en la retina. Estudios previos en animales de experimentación así lo han demostrado<sup>171-173</sup>. En concreto, los efectos terapéuticos y preventivos de la vitamina E ya han sido estudiados en varias patologías oftálmicas como el glaucoma<sup>174</sup>, la retinosis pigmentaria<sup>102, 175</sup>, la DMAE<sup>176</sup>, la retinopatía diabética<sup>177</sup>, la uveítis anterior<sup>178</sup> o la neuropatía óptica de Leber<sup>179</sup>.

Además de su acción antioxidante, la vitamina E tiene actividad antiproliferativa lo que proporciona una protección añadida a la hora de realizar inyecciones intraoculares repetidas, evitando o disminuyendo el desprendimiento de retina traccional, uno de los riesgos inherentes a este tipo de inyecciones, siendo la proliferación de fibroblastos uno de los agentes desencadenantes<sup>180</sup>.

### **1.8. Técnicas de microencapsulación de fármacos**

Teniendo en cuenta los diversos sistemas de liberación controlada de sustancias activas anteriormente mencionados, las micropartículas han sido seleccionadas para el desarrollo de esta tesis doctoral puesto que presentan un notable interés como vehículos transportadores de fármacos en el segmento posterior del ojo. Las micropartículas presentan una gran versatilidad, permiten la incorporación de numerosos fármacos, son lo suficientemente pequeñas para ser administradas mediante una inyección convencional y lo suficientemente grandes para liberar los principios activos durante un periodo de tiempo que oscila entre semanas e incluso meses. Además se pueden fabricar con relativa facilidad y presentan buena reproducibilidad en su obtención.

En la actualidad, existe un gran número de técnicas de microencapsulación patentadas y es previsible su continuo crecimiento a medida que aparecen nuevos materiales que pueden ser empleados en microencapsulación y principios activos novedosos que se pretendan encapsular. En cualquier caso, a la hora de seleccionar una determinada técnica de microencapsulación es necesario tener en cuenta tanto la naturaleza del material de recubrimiento o polímero como las características fisicoquímicas del principio activo que se va a encapsular.

A continuación, se enumeran las técnicas de microencapsulación de fármacos más empleadas en función del método de elaboración de las micropartículas. La técnica de extracción- evaporación del disolvente, utilizada en la elaboración de la formulación que se ha desarrollado en este trabajo experimental, será descrita detalladamente.

1. *Métodos químicos:*

- Técnica de policondensación interfacial

2. *Métodos mecánicos:*

- Técnica de atomización
- Técnica de atomización-congelación
- Técnica de suspensión en aire o recubrimiento en lecho fluido

3. *Métodos físicos:*

- Técnica de coacervación o separación de fases
  - En medio acuoso:
    - Coacervación simple
    - Coacervación compleja
  - En medio no acuoso (fase orgánica)
- Técnica de extracción- evaporación del disolvente

La técnica de extracción- evaporación del disolvente incluye todos aquellos métodos en los que inicialmente se forma una emulsión y posteriormente se produce la eliminación del disolvente que compone la fase interna en la que está disuelto el polímero.

El protocolo general en el que está basado este método es el siguiente:

1. Disolución o dispersión de la sustancia activa que se quiere encapsular en la solución polimérica.
2. Emulsificación de la mezcla formada con una fase inmiscible que contiene un agente tensoactivo y constituirá, a su vez, la fase continua de la emulsión.
3. Formación de las micropartículas sólidas tras la eliminación del disolvente volátil en el que inicialmente se disolvió el polímero.

4. Aislamiento y lavado de las microesferas, mediante filtración o centrifugación.
5. Deseccación de las mismas con el objeto de obtener un polvo fino.

La técnica de extracción- evaporación del disolvente presenta distintas variantes en función del tipo de emulsión que se forme, así se puede clasificar en:

- Emulsión O/A: Beck y *col.* fueron los primeros en proponer este procedimiento a finales de los años 70 para la encapsulación de progesterona en microesferas de PLGA<sup>181</sup>. Este método es especialmente interesante para la encapsulación de fármacos insolubles o poco solubles en agua que no son susceptibles de degradarse en presencia del disolvente orgánico empleado. Sin embargo, el principio activo puede encontrarse también disperso en la solución orgánica polimérica, por lo que se pueden encapsular tanto fármacos de carácter hidrofílico como lipofílico. Normalmente, el disolvente empleado con más frecuencia para formar la fase interna de la emulsión es el diclorometano, debido a su limitada solubilidad en agua (2%) y a su bajo punto de ebullición a presión atmosférica (39,8°C), que favorece su rápida eliminación<sup>182, 183</sup>. Empleando este método el fármaco se incluye disuelto o al estado sólido en la fase interna de la emulsión para posteriormente emulsionarse con la fase externa acuosa que contiene el agente tensioactivo.

- Emulsión A/O: Esta técnica se emplea fundamentalmente para encapsular compuestos muy solubles en agua. Sin embargo su uso no está muy extendido. La sustancia activa es incorporada al estado molecular en la fase interna acuosa que posteriormente se emulsionará con la fase externa oleosa.

- Emulsión O/O: Es útil en la encapsulación de fármacos hidrosolubles. Estos compuestos pueden tener cierta afinidad por el disolvente orgánico que forma parte de la fase interna de la emulsión mientras que esta afinidad debe estar limitada en el aceite que constituye la fase externa. Generalmente, los disolventes que se emplean son de naturaleza polar y que presentan una solubilidad limitada en aceites (acetona, metanol o acetonitrilo)<sup>54, 62</sup>. La sustancia activa es disuelta o dispersada en la solución polimérica que

constituye la fase interna para después dar lugar a una emulsión de fase externa oleosa.

- Emulsión A/O/A: Esta técnica es válida únicamente para compuestos muy solubles en agua. La sustancia activa es incorporada en la fase interna de la primera emulsión A/O. A su vez, esta emulsión se incorpora a la fase externa acuosa que contiene el agente tensoactivo<sup>184, 185</sup>.

### **1.8.1 Encapsulación de proteínas**

En el campo de la tecnología farmacéutica, la encapsulación de proteínas supone un reto importante debido a las características específicas de estos agentes terapéuticos. Su alto peso molecular, compleja estructura, fácil degradación e inestabilidad hacen que la correcta microencapsulación de estos compuestos se vea dificultada. Por tanto, es esencial seleccionar un método de microencapsulación adecuado, que garantice la integridad de la proteína y mantenga su actividad biológica<sup>186, 187</sup>.

Actualmente, se utilizan diferentes técnicas para la elaboración de micropartículas biodegradables cargadas con proteínas, entre las que destacan, la atomización, la extrusión en caliente, la separación de fases o la extracción- evaporación del disolvente<sup>188-192</sup>. Entre todas ellas, ésta última y en concreto el método basado en la formación de micropartículas a partir de una emulsión A/O/A, es el más comúnmente empleado<sup>190, 193, 194</sup>.

La técnica de extracción evaporación del disolvente a partir de una emulsión A/O/A implica el uso de proteínas al estado molecular. La proteína es previamente disuelta en una solución acuosa que después se añade a una fase orgánica para formar la emulsión primaria A<sub>1</sub>/O. Posteriormente, esta emulsión primaria será a su vez emulsificada con la fase externa acuosa, formando una doble emulsión A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>. A pesar de que este procedimiento es relativamente sencillo y emplea condiciones poco agresivas durante su desarrollo, posee algunos inconvenientes que pueden comprometer la estructura de la proteína. En primer lugar, el uso de proteínas en estado molecular hace que éstas sean

más susceptibles a la degradación. En esta situación, la interfaz agua/disolvente orgánico que se forma empleando este método puede originar absorción interfacial de la proteína y como consecuencia su desplegamiento y agregación. Adicionalmente, la energía necesaria para formar la emulsión, generalmente aplicada mediante sonicación, puede ocasionar estrés y alteración de la proteína debido a las altas temperaturas que se alcanzan durante el proceso<sup>195-197</sup>.

Por el contrario, el uso de proteínas al estado sólido evita la mayoría de los riesgos anteriormente mencionados. La encapsulación de proteínas sólidas reduce considerablemente la movilidad de las mismas, consiguiendo que éstas sean encapsuladas en su conformación inicial y minimizando los posibles cambios estructurales. El método S/O/O (sólido-oleo-oleoso) incorpora la proteína, al estado sólido (generalmente liofilizada), en una solución orgánica polimérica que posteriormente se emulsiona con la fase externa oleosa. La principal ventaja que aporta esta técnica es el bajo grado de desplegamiento que sufre la proteína debido a la ausencia de agua durante todo el proceso de fabricación<sup>198-200</sup>. Sin embargo, los elevados volúmenes de líquidos oleosos y orgánicos requeridos pueden originar problemas tóxicos y/o ambientales<sup>201</sup>. Con el objetivo de evitar este inconveniente, se emplea el método S/O/A (sólido-oleo-acuoso), donde la proteína sólida es suspendida en una solución polimérica para después emulsificarse con una fase externa acuosa<sup>202, 203</sup>. En ambas técnicas, tanto S/O/O como S/O/A, el punto crítico está en conseguir un tamaño de partícula de la proteína sólida durante la primera suspensión S/O que resulte óptimo para incrementar la eficacia de encapsulación y reducir el *burst* inicial<sup>196, 204, 205</sup>.

Además de todos estos problemas asociados a las diferentes técnicas de microencapsulación de proteínas, hay que tener en cuenta que el paso final para la formación de micropartículas, incluye la liofilización de las mismas, proceso que también puede ocasionar degradación de la sustancia activa. Este hecho no ocurre cuando la proteína se incorpora al estado sólido en la elaboración de las microesferas. Además, la naturaleza hidrofóbica del PLGA, polímero empleado en el desarrollo de nuestra formulación, puede dar lugar a

interacciones proteína-polímero que a su vez provoquen cambios estructurales en el agente terapéutico<sup>206</sup>.

Durante el proceso de liberación de la proteína a partir del sistema biodegradable, también es frecuente encontrar condiciones desfavorables que disminuyen su estabilidad. Uno de los objetivos de los sistemas de liberación controlada de sustancias activas es incrementar el tiempo de residencia de las mismas en el organismo, ya que se van liberando de forma controlada. Sin embargo, esta situación no es natural y las proteínas no están diseñadas para sobrevivir en condiciones fisiológicas durante periodos prolongados de tiempo. Durante la liberación, tanto *in vivo* como en condiciones simuladas *in vitro*, la proteína no está sólo expuesta a temperaturas de 37°C, humedad o contacto con superficies hidrofóbicas de la matriz polimérica, sino también a un ambiente que podría resultar adverso debido a la presencia de productos de degradación de la matriz que originan una disminución del pH, fluido intersticial, enzimas proteolíticas, células y productos de degradación celular como las especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>206, 207</sup>. Además, otros problemas relacionados con la liberación de la proteína, pueden ser una incompleta liberación de la misma, debida a interacciones polímero-proteína, degradación química de la sustancia activa o agregación, o bien, una disminución de la actividad biológica de la proteína encapsulada, indicando que parte de la macromolécula liberada está degradada o estructuralmente alterada<sup>195</sup>.

También es importante destacar que la presencia de agregados proteicos en la formulación se considera un factor de riesgo a la hora de originar problemas de inmunogenicidad, pudiendo ocasionar una respuesta inmune inesperada en pacientes tratados con estos sistemas de liberación controlada de fármacos<sup>206, 208</sup>.

Por último, incluso a la hora de manipular la formulación es necesario tomar precauciones para no alterar la proteína. La extracción de la misma de la estructura polimérica, generalmente realizada mediante el empleo de disolventes orgánicos que permiten la ruptura de las partículas por disolución

del polímero, puede originar alteraciones estructurales de la proteína, agregación o aceleración de su degradación química<sup>206</sup>.

Desde el punto de vista tecnológico, la adición de sustancias oleosas a las formulaciones elaboradas a partir de sistemas microparticulares ha demostrado ser útil en la modulación de la liberación de las sustancias activas, consiguiéndose incluso en algunos casos, disminuir la cantidad de microesferas a administrar para conseguir concentraciones potencialmente terapéuticas<sup>59, 62, 209, 210</sup>. Este recurso tecnológico ha sido utilizado en el desarrollo de las microesferas descritas en esta Tesis Doctoral.

# HIPÓTESIS DE TRABAJO



## 2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

El desarrollo de sistemas microparticulares biodegradables que permitan la liberación de pequeñas cantidades del agente neuroprotector GDNF mantenidas después de un largo periodo de tiempo (del orden de picogramos), pueden resultar eficaces en el tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares crónicas como es el glaucoma. Al tratarse de una enfermedad de etiología multifactorial, la terapia combinada empleando distintos agentes terapéuticos (GDNF y vitamina E) que actúen sobre varios mecanismos implicados en la patogénesis resultaría de gran interés.

Debido a que la formulación desarrollada está destinada a la administración intraocular debe cumplir los requisitos de esterilidad. El método de esterilización empleado debe preservar la actividad biológica del producto biotecnológico durante el proceso.

Aparte de los beneficios que presenta la administración exógena de factores neurotróficos en dosis bajas con una liberación mantenida durante meses, el efecto neuroprotector de estos agentes hace que los sistemas desarrollados puedan ser útiles, como coadyuvantes, en la terapia antiangiogénica (anti-VEGF) de otras patologías oftálmicas como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y la retinopatía diabética (RD). Si los agentes neurotróficos, GDNF y BDNF, presentaran propiedades antiangiogénicas, haría de estos sistemas microparticulares de cesión controlada de agentes neuroprotectores una plataforma interesante en el tratamiento de patologías oculares crónicas en las que está implicada la neovascularización.



# OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO



### 3 OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

Las nuevas tendencias en el tratamiento de patologías neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo, en las que se produce una pérdida de visión debido a daños ocasionados en el nervio óptico y a la muerte progresiva de células ganglionares de la retina (CGR), están basadas en la neuroprotección. Al tratarse de patologías crónicas, la administración de factores neurotróficos en sistemas de cesión controlada resulta una de las estrategias más prometedoras.

Desde el punto de vista terapéutico es importante destacar que desde hace algunos años se han llevado a cabo distintos estudios experimentales con el objeto de demostrar la utilidad de la terapia neuroprotectora mediante una única inyección intravítrea del agente neuroprotector (dosis de 1-5 µg) en animales de experimentación, con resultados más o menos satisfactorios en el rescate de CGR a corto plazo (14 días)<sup>148, 151</sup>. Sin embargo, el empleo de estas cantidades en administraciones repetidas con el objeto de simular tratamientos a largo plazo ha demostrado presentar un efecto limitado<sup>167, 211, 212</sup>. Además, se ha descrito que dosis elevadas de agentes neuroprotectores como las empleadas en los estudios iniciales podrían resultar ineficaces, como consecuencia de una disminución en la producción de receptores TRK, e incluso tóxicas debido a un exceso en la producción de radicales libres (óxido nítrico) o a la activación de segundos mensajeros que podrían interferir en los mecanismos de supervivencia de las CGR<sup>167, 211</sup>. Actualmente, las investigaciones en este campo se orientan hacia la administración de dosis relativamente bajas de estos agentes, que manteniendo una concentración en el vítreo a lo largo del tiempo, resulten eficaces sin los efectos adversos que produce el empleo de cantidades elevadas.

Como se ha señalado anteriormente, al tratarse todas ellas de patologías crónicas, la aplicabilidad de estas terapias neuroprotectoras requiere el desarrollo de sistemas biodegradables de liberación controlada como son las microsferas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), que administrados por

vía intravítrea, aporten ventajas respecto a las inyecciones repetidas. Estos sistemas son capaces de proporcionar concentraciones terapéuticas del fármaco en su lugar de acción durante periodos prolongados de tiempo, no necesitan cirugía puesto que se pueden administrar en forma de suspensión de la misma forma que una inyección convencional y desaparecen del lugar de acción una vez ejercido su efecto. Además, evitan los efectos secundarios sistémicos puesto que se depositan directamente en la cavidad vítrea.

Debido a que este tipo de enfermedades presentan una etiología multifactorial, el tratamiento combinado con distintos agentes terapéuticos (agentes neuroprotectores y antioxidantes) que actúen sobre los diferentes mecanismos implicados en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas oculares podría resultar de gran interés<sup>167, 211</sup>.

Puesto que son formulaciones destinadas a su inyección intraocular deben cumplir los requisitos de esterilidad. Este hecho resulta de especial relevancia para los sistemas de cesión controlada de productos biotecnológicos ya que sus componentes (polímero y agente activo) son especialmente sensibles a los métodos de esterilización convencionales.

Por último, las propiedades antiangiogénicas que ha demostrado poseer el factor neurotrófico PEDF (Factor derivado del epitelio pigmentario)<sup>83, 213, 214</sup>, nos lleva a evaluar la posibilidad de que otros agentes neurotróficos, como el GDNF y BDNF, puedan presentar estas propiedades. Estos productos biotecnológicos incluidos en un sistema de dosificación adecuado que evite las inyecciones sucesivas, podrían ser efectivos en el tratamiento de otras patologías oftálmicas crónicas como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o la retinopatía diabética (RD) en las que se produce neovascularización.

En base a estos hechos, los objetivos de esta tesis doctoral han sido los siguientes:

1. Desarrollo de una nueva formulación de terapia combinada (microesferas biodegradables cargadas con agentes neuroprotectores y vitamina E) para el tratamiento de patologías neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo. Desde el punto de vista terapéutico la vitamina E actúa como antioxidante mientras que desde el punto de vista tecnológico aumenta la eficacia de encapsulación de la proteína y modula su cesión.
2. Estudio de diferentes estrategias tecnológicas para mantener la actividad biológica de las proteínas tras su microencapsulación y esterilización mediante radiación gamma.
3. Estudio de la actividad antiangiogénica de nuevas formulaciones microparticulares cargadas con factores neurotróficos (GDNF y BDNF) y vitamina E.

Además, el desarrollo de una formulación como la propuesta en esta tesis, necesita el concurso de distintos procedimientos como son la validación del método de cuantificación de los productos biotecnológicos, la puesta a punto del método de microencapsulación y la optimización de la formulación, considerando como parámetros críticos la eficacia de encapsulación y el tamaño de partícula, ya que estos sistemas están destinados a su administración intravítrea mediante una inyección convencional. Parte de estos estudios preliminares se recogen en un artículo corto (*note*).

Por último, el origen de esta Tesis Doctoral partió de un trabajo en colaboración con el Dr. Michael J. Young del Schepens Eye Research Institute (Harvard Medical School) basado en la microencapsulación de proteínas en microesferas biodegradables de administración intraocular. Este estudio se recoge en un quinto trabajo ya publicado en la revista *Biomaterials*. Este primer trabajo dio pie a plantearse la microencapsulación de otras proteínas de interés farmacológico en el tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior del ojo y al desarrollo de otros métodos de encapsulación que permitieran mejores eficacias de encapsulación y cesiones más prolongadas.

**3.1 Microesferas de PLGA cargadas con GDNF y Vit E elaboradas mediante un nuevo sistema de microencapsulación, incrementan la supervivencia de células ganglionares de la retina en un modelo experimental de glaucoma.**

***Retinal ganglion cells survival in a glaucoma model by GDNF/Vit E PLGA microspheres prepared according to a novel microencapsulation procedure.***

***Journal of Controlled Release 2011;156(1):92-100.***

La encapsulación de proteínas es un desafío importante en el ámbito de la Tecnología Farmacéutica debido a las características que presentan estos agentes terapéuticos (alto peso molecular, fácil degradación, estructura compleja, etc.). Es necesario, por tanto, seleccionar un método de microencapsulación adecuado que garantice la integridad de la proteína y preserve su actividad biológica durante la elaboración de las micropartículas, su almacenamiento y uso<sup>186, 187, 215</sup>. El GDNF, agente neuroprotector empleado en este trabajo, ha demostrado ser efectivo a nivel ocular incrementando la supervivencia de las CGR tras su inyección intravítrea en dosis bajas<sup>28, 50, 151, 159</sup>. A su vez, la vitamina E posee propiedades farmacológicas que pueden resultar útiles en el tratamiento de patologías neurodegenerativas como el glaucoma ya que se trata de un agente antioxidante<sup>59, 169, 216</sup>.

Basándonos en estos hechos, el planteamiento de este trabajo fue el siguiente:

1. Desarrollo de un nuevo sistema de microencapsulación para la elaboración de sistemas microparticulares biodegradables cargados con dos sustancias activas, GDNF y vitamina E. Desde el punto de vista tecnológico, la vitamina E ha permitido la incorporación del factor neuroprotector al estado sólido, en forma de suspensión, ya que se trata de un aceite.
2. Caracterización *in vitro* de la formulación desarrollada mediante el estudio de la morfología, tamaño, distribución de los componentes en las

microesferas, eficacia de encapsulación y perfil de liberación del agente neuroprotector.

3. Evaluación *in vitro* de la actividad biológica del factor neuroprotector microencapsulado y posteriormente liberado en sus células diana (fotorreceptores y células ganglionares de la retina).
4. Estudio *in vivo* de la eficacia de la formulación desarrollada administrada por vía intraocular en un modelo experimental de glaucoma (rata).

### **3.2 Estrategias tecnológicas para mantener la actividad biológica de las proteínas tras su encapsulación y esterilización mediante radiación gamma.**

***Preservation of biological activity of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) after microencapsulation and sterilization by gamma irradiation.***

***Enviado a International Journal of Pharmaceutics.***

La radiación gamma es un procedimiento habitualmente empleado para la esterilización de microesferas destinadas a su administración parenteral<sup>60, 61, 217</sup>. Las ventajas de este tipo de esterilización (alto poder de penetración, baja reactividad química, bajos niveles de residuos y pocas variables a controlar) hacen que sea un método de elección frente a otros procesos de esterilización. La protección de los sistemas durante el proceso de esterilización con hielo seco (-78°C) ha demostrado ser un recurso tecnológico eficaz para mantener la integridad de los componentes de la formulación. Sin embargo, cuando las microesferas están cargadas con proteínas, hay que poner especial atención en asegurar que la actividad biológica del factor encapsulado no se vea afectada por este proceso<sup>218-222</sup>. Este hecho unido a la dificultad que representa la encapsulación de proteínas, hace que sea conveniente el estudio de diferentes estrategias tecnológicas para la elaboración de micropartículas, que permitan mantener la bioactividad de la proteína incluso después de su esterilización.

El estado en el que se encuentre la proteína en las microesferas influirá en su estabilidad. Dicho estado dependerá, en gran medida, de las manipulaciones que se hayan realizado durante el proceso de microencapsulación. Las proteínas pueden incluirse inicialmente en las microesferas disueltas (emulsión A/O/A) o al estado sólido (emulsión S/O/A). La inclusión de una u otra forma condicionará su comportamiento una vez administrado. La adición de antioxidantes es un recurso tecnológico que puede ser empleado para proteger a los productos biotecnológicos de las especies generadas por la formación de radicales libres durante la radiación gamma<sup>223, 224</sup>. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el efecto de la inclusión de antioxidantes en la propia formulación (microesferas).

Teniendo en cuenta estos hechos, el planteamiento del trabajo fue el siguiente:

1. Encapsulación del agente neuroprotector GDNF empleando tres métodos diferentes basados en la técnica de extracción- evaporación del disolvente: A/O/A, S/O/A 1 y S/O/A 2 (incluyendo vitamina E). La formulación S/O/A 1 incorpora el factor neuroprotector al estado sólido en la solución polimérica. La formulación S/O/A 2 consiste en la preparación de una suspensión del agente neuroprotector en un aceite (vitamina E) que se incorpora posteriormente a la solución de polímero.
2. Esterilización de las formulaciones desarrolladas mediante radiación gamma (dosis de 25 kGy), con y sin protección frente al aumento de temperatura. La protección se realiza manteniendo las muestras a baja temperatura (-78°C) durante la esterilización.
3. Caracterización *in vitro* de las formulaciones desarrolladas antes y después de esterilizar, mediante el estudio de la morfología, tamaño, eficacia de encapsulación, perfil de liberación y peso molecular del polímero.
4. Evaluación *in vitro* de la integridad estructural (electroforesis) y la actividad biológica (supervivencia en células de la retina) del GDNF encapsulado en

las distintas formulaciones antes y después de la esterilización, mediante cultivos primarios de células retinianas.

### **3.3 Actividad antiangiogénica de la combinación de un agente neuroprotector y un antioxidante (GDNF-Vitamina E) encapsulados en un nuevo sistema de cesión en forma de microesferas.**

***Anti-angiogenic effect of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)-vitamin E combination encapsulated in a novel microsphere delivery system.***

***Enviado a Investigative Ophthalmology & Visual Science.***

A pesar de los avances desarrollados en la terapia de las enfermedades retinianas que cursan con neovascularización (DMAE exudativa o RD proliferativa), hasta el momento no existe un tratamiento efectivo que frene completamente su evolución. Actualmente, se emplean terapias crónicas basadas en inyecciones intravítreas repetidas de anticuerpos monoclonales anti-VEGF<sup>225-227</sup>. Sin embargo, aunque estos tratamientos son capaces de reducir la velocidad a la que se produce la neovascularización, su uso continuado puede ocasionar daños a nivel neuronal<sup>228, 229</sup>. Por esta razón, se ha postulado la posibilidad de administrar factores neuroprotectores junto con los agentes anti-VEGF. En este sentido, la administración de agentes neurotróficos como terapia coadyuvante podría resultar de gran interés<sup>83, 214</sup>.

Otra estrategia para intentar solucionar los efectos adversos asociados a la terapia anti-VEGF sería la administración de sustancias activas capaces de disminuir la angiogénesis y proteger, al mismo tiempo, las neuronas de la retina. De hecho, se sabe que uno de los factores neuroprotectores endógenos (PEDF) tiene actividad antiangiogénica y neuroprotectora. Sin embargo, no se ha descrito hasta el momento, actividad antiangiogénica para el GDNF o el BDNF, ni en la terapia combinada de estos agentes con vitamina E. Además, la asociación de dos agentes neurotróficos (GDNF y BDNF) puede ser de utilidad, puesto que ya se ha demostrado que la administración conjunta de estos factores incrementa la actividad neuroprotectora<sup>212, 230</sup>.

Por último, el hecho de que se trate de patologías degenerativas que requieren un tratamiento crónico pone de manifiesto la necesidad de desarrollar sistemas de cesión controlada que permitan la liberación de cantidades de las sustancias activas que den lugar a concentraciones terapéuticas en su lugar de acción durante periodos prolongados de tiempo.

En base a estos hechos, el planteamiento del trabajo fue el siguiente:

1. Desarrollo de nuevas formulaciones microparticulares cargadas con agentes neuroprotectores (GDNF y BDNF) y vitamina E.
2. Esterilización de las formulaciones desarrolladas mediante radiación gamma en las mismas condiciones descritas en el segundo trabajo.
3. Caracterización *in vitro* de las formulaciones esterilizadas mediante el estudio de su morfología, tamaño, eficacia de encapsulación y perfil de liberación.
4. Determinación de la tolerancia *in vitro* de las formulaciones elaboradas en células endoteliales de cordón umbilical (*HUVEC*) y células del epitelio pigmentario de la retina (*ARPE-19*).
5. Evaluación *in vitro* de la posible actividad antiangiogénica de las nuevas formulaciones en células endoteliales de cordón umbilical (*HUVEC*).

### **3.4 Ensayos preliminares de encapsulación de GDNF en microesferas de PLGA. Efecto de la vitamina E como coadyuvante en la microencapsulación de proteínas para administración intravítrea.**

***Vitamin E effect as coadjuvant in protein microencapsulation for intravitreal administration. (Note)***

***Enviado a European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.***

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la adición de un aceite (vitamina E) en la eficacia de encapsulación del producto biotecnológico (GDNF), en la

modulación de la cesión y en la distribución de ambos componentes (proteína y aditivo oleoso) en las microesferas.

Con este fin, se elaboraron varias formulaciones de microesferas utilizando distintas cantidades del factor neurotrófico y del agente oleoso siguiendo el método (S/O/A) desarrollado en esta Tesis Doctoral, que consiste en la preparación de una suspensión inicial de la proteína en el aceite y su posterior incorporación en la disolución polimérica.

De esta forma, el planteamiento del trabajo fue el siguiente:

1. Desarrollo de microesferas de PLGA con distintas cantidades iniciales de GDNF y vitamina E.
2. Caracterización *in vitro* de la formulación desarrollada mediante el estudio de la morfología, tamaño, eficacia de encapsulación y perfil de liberación del agente neuroprotector.
3. Determinación de la distribución de la proteína y el aditivo oleoso en la matriz polimérica mediante microscopía confocal.

### **3.5 Integración celular permanente a partir del trasplante conjunto de microesferas biodegradables de PLGA cargadas con MMP2 y células progenitoras de la retina.**

***Robust cell integration from co-transplantation of biodegradable MMP2-PLGA microspheres with retinal progenitor cells.***

***Biomaterials 2011;32(4):1041-50.***

El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de la administración conjunta de células progenitoras de la retina con microesferas biodegradables cargadas con MMP2. Se sabe que esta proteína promueve la ruptura de la barrera formada por la matriz extracelular inhibitoria y las moléculas de adhesión celular, favoreciendo la integración efectiva de las células implantadas.

En base a estos hechos los objetivos del estudio fueron:

1. Desarrollo de microesferas de PLGA con distintos pesos moleculares cargadas con metaloproteinasa 2 (MMP2), de un tamaño adecuado para su administración intraocular.
2. Caracterización *in vitro* de las formulaciones desarrolladas mediante el estudio de la morfología, tamaño, eficacia de encapsulación y perfil de liberación de la proteína.
3. Administración conjunta de las microesferas biodegradables desarrolladas junto con células progenitoras de la retina (CPR) en un modelo animal de degeneración retiniana (ratón) y evaluación de su efecto en la integración celular.

# PARTE EXPERIMENTAL



**4.1 Retinal ganglion cells survival in a glaucoma model by GDNF/Vit E PLGA microspheres prepared according to a novel microencapsulation procedure.**

Patricia Checa-Casalengua, Caihui Jiang, Irene Bravo-Osuna, Budd A. Tucker, Irene T. Molina-Martínez, Michael J. Young, Rocío Herrero-Vanrell.

Journal of Controlled Release 2011;156(1):92-100.



## ABSTRACT

The present experimental work describes the use of a novel protein encapsulation method to achieve protection of the biological factor during the microencapsulation procedure. With this aim, the protein is included in Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres without any preliminary manipulation, in contrast to the traditional S/O/W (solid-in-oil-in-water) method where the bioactive substance is first dissolved and then freeze dried in presence of lyoprotectors. Furthermore, the presented technique involves the use of an oily additive, vitamin E (Vit E), useful from a technological point of view, by promoting additional protein protection and also from a pharmacological point of view, because of its antioxidant and anti-proliferative properties.

Application of this microencapsulation technique has been performed for GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) designed for the treatment of optic nerve degenerative diseases, such as glaucoma, the second leading cause of blindness in the western world. The protein was released *in vitro* in its bioactive form for more than three months, demonstrated by the survival of their potential target cells (photoreceptors and retinal ganglion cells (RGC)). Moreover, the intravitreal injection of GDNF/Vit E PLGA microspheres in an experimental animal model of glaucoma significantly increased RGC survival compared with GDNF, Vit E or blank microspheres ( $p < 0.01$ ). This effect was present for at least eleven weeks, which suggests that the formulation prepared may be clinically useful as a neuroprotective tool in the treatment of glaucomatous optic neuropathy.

**KEYWORDS:** Drug delivery, microencapsulation, protein, growth factors, retinal ganglion cells survival.

## INTRODUCTION

The encapsulation of proteins has been one of the most interesting challenges in the field of pharmaceutical technology over the past decades. Despite their obvious attractiveness as therapeutic agents, they have some serious restrictions. The most limiting of these is their high molecular weight and structural complexity, which must be retained in order to maintain their biological activity. The encapsulation preparation method should guarantee the maintenance of the biological activity of the encapsulated protein throughout microparticle elaboration, storage, and use [1-3]. Different techniques can be used to encapsulate proteins in biodegradable polymeric microparticles, e.g. emulsion solvent extraction-evaporation methods, phase separation, spray drying or hot-melt extrusion. Each technique possesses their own advantages and disadvantages.

The emulsion solvent extraction-evaporation methods are the most widely employed. Among them, the formation of double emulsion W/O/W (water-in-oil-in-water), in which the active protein is first dissolved in the aqueous inner phase, has attracted attention for protein microencapsulation, resulting relatively successful. However, this method involves the use of proteins in solution, which requires the evaluation of the specific circumstances surrounding each protein nature and intended use, in order to avoid the associated potential important risks that might compromise its stability [4,5]. Garbayo and co-workers [6,7] proposed a novel protein microencapsulation method to overcome several critical points of the microencapsulation of proteins via this W/O/W emulsion, such as the shear stress applied or the presence of water/organic interface that might compromise protein stability. These authors proposed also the use of protein stabilizers, human serum albumin (HSA) and polyethylene glycol (PEG). Although this procedure reduced the degradation protein risk, the protein was always in its molecular state, since it was used in an aqueous solution, making it more susceptible to destabilization. In contrast, the use of proteins in their solid state avoids the majority of those risks regardless of the protein encapsulated. It has been reported that protein in its solid state is kinetically

trapped in the initial conformation, thus conformational changes could be largely prohibited [8,9]. To this end, several laboratories are working on protein microencapsulation following S/O/O (solid-in-oil-in-oil) methods. Solid protein is then suspended in the inner organic phase. Once formed, protein unfolding is extremely slow under these preparation conditions [4]. However, problems may rise concerning residue of oily phases that may lead to immunity and regulatory problems [10]. The S/O/W techniques might reduce these problems. Whatever S/O/O or S/O/W techniques are employed, it is essential to employ a protein powder with small particle size in the first S/O (solid-in-oil) suspension step [11]. In this method, lyophilisation of a water solution protein with additives is widely employed [12,13]. In a recent publication, Yuan and co-workers prepared dextran-BSA microparticles that were subsequently encapsulated via S/O/W emulsion in PLGA microspheres, demonstrating that this strategy reduced the protein agglomeration in comparison to the W/O/W emulsion method [14]. However, the effect of lyophilisation on protein integrity has been investigated thoroughly, and denaturation and aggregation are common phenomena during freezing and subsequent dehydration, even in the presence of lyo-protectors [4]. The problem remains thus far unresolved and there are many research groups focused on the development of a protein microencapsulation method able to ensure the stability of any protein, both in encapsulation and release [10,14,15,16].

The strategy proposed in this work is the encapsulation of a combination of several active substances using a method based on the S/O/W emulsion solvent extraction-evaporation. The novelty of the technique developed in this work is the fact that the protein is not pre-treated before encapsulation and always remains in its solid state. Next, a less aggressive dispersion method is proposed, based on the sonication of the powder protein at low power and temperature with a very short contact time. In this case, the cavitation stress of the protein in its particulate state is very low and unfolding is improbable at these conditions [4]. Furthermore, an oily additive is also included in the internal phase, promoting additional protein protection, release modulation and thus pharmacological activity itself [17-20]. In this particular case glial-cell-line-neurotrophic-factor (GDNF) was used as active proteic substance. It is known

that GDNF can enhance the survival of dopaminergic and motor neurons [21], being useful, for example, in the treatment of Parkinson's disease [22]. Furthermore, at the retina it can improve the damaged retinal ganglion cells (RGC) survival following intravitreal injection [23-26]. Vitamin E (Vit E) was included in the formulation as oily additive. This compound presents antiproliferative properties, protecting tissues against potential side effects derived from repeated intravitreal injections. In addition, Vit E has antioxidative properties that could be also useful in neural protection. In this work, the structural and biological integrity of the protein after the microencapsulation and release process was evaluated by ELISA and extensive bioactivity assays using cultured RGC and photoreceptors. For *in vivo* analysis, rats with chronic elevation of intraocular pressure (IOP), generated via episcleral vein injection of hypertonic saline [27,28], were used as implant recipients. This model allowed us to investigate the neuroprotective activity of GDNF/Vit E PLGA biodegradable microspheres on the survival of RGC and their axons.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **MATERIALS**

Recombinant Human GDNF and the ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kit for GDNF quantification were supplied by R&D Systems (Minneapolis, MN USA). Poly-(D,L-lactide-co-glycolide) PLGA ratio 50:50 (Resomer<sup>®</sup>503, Mw 35,000 g/mol (GPC)) was obtained from Boehringer Ingelheim (Pharma Co., Germany). Polyvinyl alcohol 72,000 g/mol (PVA) was supplied by Merck KGaA (Darmstadt, Germany).  $\alpha$ -tocopherol acetate (Vit E), bovine serum albumin (BSA) and albumin bovine-fluorescein isothiocyanate (BSA-FITC) were purchased from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). N-(tetramethylrhodamine-6-thiocarbonyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (TRITC-DHPE) was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). All other chemicals were reagent grade and used as received.

## METHODS

### Microspheres elaboration

GDNF/Vit E loaded PLGA microspheres were prepared using a novel S/O/W emulsion-solvent evaporation technique. Briefly, 20 µg of recombinant human GDNF was suspended in 20 µl of Vit E via gentle sonication at low temperature (Sonicator XL, Head Systems, Iowa, USA) for 30 sec in order to reduce the risk of protein alteration [3]. This suspension was mixed with 1 ml of PLGA solution in methylene chloride (20% w/v). The so-prepared organic phase was emulsified with 5 ml of PVA MilliQ® water solution (2% w/v). Emulsification was performed in a homogenizer (Polytron® RECO, Kinematica GmbH PT 3000, Lucerna, Switzerland) at 5,000 rpm for 1 min. This emulsion was subsequently poured onto 100 ml of an aqueous PVA solution (0.1%) and stirred constantly for 3 hours, to allow organic solvent evaporation. Once formed, microspheres were washed with MilliQ® water to eliminate the PVA and separated according to their particle size by filtration under vacuum conditions. Particles were rapidly frozen (methanol/ice mixture) and freeze-dried to obtain a free flowing microspheres powder. Microspheres were kept at -20 °C under dry conditions until use. Microspheres were performed in aseptic conditions and all the liquids were filtered through sterilising membranes (0.22µm). After filtration the aqueous solvents were autoclaved.

Among the polymers employed for microencapsulation of active substances. PLGA 50:50 (Mw 35,000 g/mol) was chosen to prepare the microspheres because it has shown high biocompatibility after intraocular injection [29].

### Microspheres characterization

The **production yield percentage (PY%)** of each batch was calculated.

**Mean particle size and particle size distribution** were measured by light scattering in a Beckman Coulter LS series instrumented with fluid module

(Coulter Corporation, Miami, Florida, USA). Samples were prepared by suspending the microspheres in distilled water.

**Morphological evaluation.** The morphology of the microspheres was evaluated by scanning electron microscopy (SEM; Jeol, JSM-6335F, Tokyo, Japan). Samples were gold sputter-coated prior to observation.

**Protein and additive distribution:** The protein and additive distribution into microspheres was achieved by confocal microscopy. Briefly, a model labelled-protein (BSA-FITC) was encapsulated (20 µg) in the same conditions described for GDNF. A second formulation of microspheres was prepared including in the O-phase a combination of the additive (Vit E, 20 µl) with a small proportion (8 µl) of fluorescently labelled phospholipids (TRITC-DHPE, 2 mg/ml). Subsequently, a third formulation was prepared incorporating the two mentioned fluorescent species. A fourth formulation of PLGA microspheres was elaborated according to the previously described method by physically mixing the organic phase with 20 µl of Nile red (4 mg/ml). This fluorescent marker has been already used to label PLGA [30,31]. Once prepared, the different formulations were observed by confocal microscopy (Nikon Eclipse TE300, MRC-1024 BioRad).

**Encapsulation efficiency:** 5 mg of microspheres were dissolved in 0.7 ml of methylene chloride. Then, 0.7 ml of the diluent reactive provided in the ELISA kit (PBS 7.4 and BSA 1%) was added. After vigorous mixing, the heterogeneous system was centrifuged (7,880 g, 15 min), and the aqueous phase extracted. The so-performed liquid/liquid extraction was repeated four times, in order to recover all of the encapsulated protein. Assays were performed in triplicate. GDNF content in the aqueous medium was quantified by immunoassay.

**In vitro release studies:** Replicates of 5 mg of microspheres of each batch were suspended in 1.5 ml of PBS pH 7.4 isotonic with NaCl. "Low binding" Eppendorf® vials were used in all cases. Samples were placed in a shaker with a constant agitation speed of 100 rpm (Clifton Shaking Bath NE5, Nickel Electro

Ltd Avon United Kingdom) at 37°C. At pre-set times (1h, 24h and once a week until the end of the assay) the microspheres suspensions were gently centrifuged (490 g for 3 min) and the supernatant was recovered (approximately 1.5 ml) and replaced with the same volume of fresh medium, for continuation of the release test. Aliquots from supernatant were diluted with the diluent reactive provided in the ELISA kit (DY995 R&D System) to obtain a protein concentration in the suitable range (15-1,000 pg/ml) to be quantified by the ELISA technique. A first set of experiments was carried out to establish the most adequate *in vitro* release conditions. In this context, the inclusion in the release media of a protein carrier (BSA) was analyzed.

### **In vitro bioassays**

#### ***Photoreceptor sheet isolation, explantation and survival assay:***

Photoreceptor sheets were isolated from 30-60 day old adult B6 mice. Retina were carefully dissected and flattened by making 4 radial cuts. Flattened retinas were placed, photoreceptor side down, on a 20% gelatin block that had previously been secured to a vibratome chuck. Gelatin solution was flushed under the retina with a flame polished pasture pipette and aspirated immediately. The gelatin was allowed to dry for at least 2 minutes to allow the retina to adhere to the underlying base, and the vibratome bath was subsequently filled with ice-cold CO<sub>2</sub> independent media (Invitrogen). The vibratome chamber was kept at 4°C to prevent the gelatin from melting and the retina from detaching. Starting at the vitreal surface, sequential 20-50 µm sections were cut until the photoreceptor layer was reached (approximately 120 µm in depth; the appropriate retinal layer was determined by microscopic analysis of each section and remaining tissue). After the photoreceptor layer was reached, a 200 µm thick section was taken and the photoreceptor layer and attached gelatin sheet were collected. Isolated photoreceptor sheets were released from the underlying cutting surface, explanted in permeable transwell inserts and placed in media containing either control PLGA microspheres (0µg GDNF/20 µl Vit E) or GDNF secreting microspheres (20 µg GDNF/20 µl Vit E) for 24-48 hrs. Photoreceptor sheet explants were subsequently harvested, fixed

and analyzed via tunnel labelling to determine the percentage of cell death in each condition.

**Retinal ganglion cell isolation and survival assay:** RGC were isolated as described previously [32]. Briefly, retinas from 30-60 day old adult B6 mice were dissected in  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ -free Hanks' balanced salt solution (HBSS) and dissociated by incubating for 10 minutes at 37°C in HBSS containing 1% papain and 5 U/mL DNase. Retinal cells were then transferred to a solution with the papain inhibitor ovomucoid (1%, Worthington Biochemicals) and triturated. Dissociated cells were treated for 15 minutes at 4°C with rabbit anti-Thy1.2 antibody conjugated to the micrometal beads in elution buffer. The cell suspensions were loaded onto a metal column and separated with the elution buffer in the presence and absence of a magnetic field. Selected cells were released from the magnetic column, rinsed and subsequently plated in conditioned media released from GDNF-loaded microspheres (1hr, 4 weeks and 7 weeks of the release assay). At 24-48 hrs-post plating, cultures were fixed and analyzed via tunnel labelling to determine the percentage of cell death in each condition.

## **In vivo assays**

### **Animals:**

Adult male Brown Norway rats (350-450g, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) were housed with a 12 h light/dark cycle and with water and food provided *ad libitum*. All animals were acclimatized to the environment and to IOP measurements for at least two weeks before the experiment. All experiments were performed in compliance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, and all experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of the Schepens Eye Research Institute.

**Intraocular pressure elevation and measurement:** Unilateral elevation of IOP was produced in adult male Brown Norway rats as previously described by

Morrison [27,28]. In brief, anesthesia was induced by intraperitoneal injection consisting of ketamine (75 mg/kg), xylazine (10 mg/kg), and acepromazine (2 mg/kg; all from Phoenix Pharmaceutical Inc., St. Joseph, MO). Hypertonic saline (1.9 M) was injected into the episcleral vein of the left eye through a glass microneedle (generated in a pipette puller) while the right eye served as a normal control. A syringe pump (Harvard apparatus, Holliston, MA) was used to standardize the injection pressure, volume, and duration. Two weeks later, the injection procedure was repeated on a second episcleral vein on the opposite side of the same eye in all treated animals. IOP was measured using a TonoPen XL tonometer (Medtronic Ophthalmics, Jacksonville, FL). Baseline IOP was obtained before the first hypertonic saline injection and twice per week thereafter. All IOP measurements were performed in conscious rats using only topical corneal anesthesia (0.5% Proparacaine Hydrochloride, Akorn Inc. Buffalo Grove, IL). Fifteen consecutive readings were taken, and the average served as the measured IOP. In addition, all IOP measurements were performed around 2:00 PM to minimize fluctuations due to diurnal variability [33-34].

***Intravitreal injection:*** One week after the first hypertonic saline injection, eyes were randomly chosen to receive intravitreal injections of either blank microspheres, microspheres loaded with GDNF/Vit E, or GDNF or Vit E alone. Intravitreal injection was performed under general anesthesia as previously described [24]. 0.5% of (w/v) suspensions of microspheres were prepared in PBS and briefly vortexed immediately before each injection to ensure a uniform dispersion of microspheres in the injected fluid. A 30-gauge hypodermic needle was used to perforate the sclera 1.5 mm behind the limbus. Five microliters of test sample was then injected by way of this opening into the vitreous using a 50  $\mu$ l Hamilton Syringe (Hamilton Co, Reno, NV). Care was taken not to damage the lens. Following intraocular injections, the needle was held in place for one min and withdrawn slowly. In addition, paracentesis was simultaneously performed to relieve pressure and thereby prevent reflux. Animals with retinal bleeding or lens injury following the injection procedure were excluded from the study.

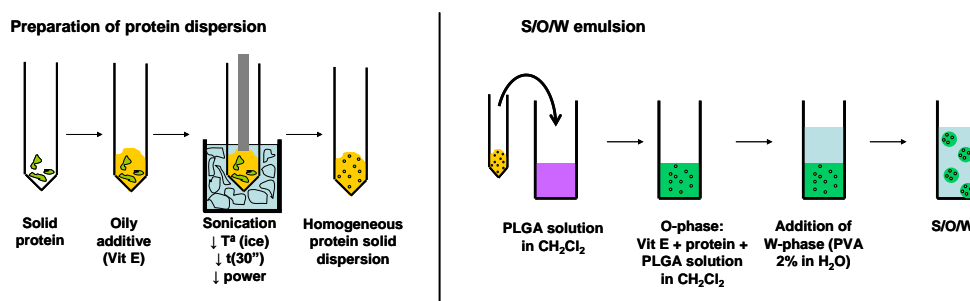
**Tissue preparation and histopathology:** Tissue preparation and histopathology were performed as previously described [24]. In brief, rats were killed by CO<sub>2</sub> inhalation ten weeks after the second hypertonic saline injection. Enucleated eyes were immediately fixed in 4% paraformaldehyde (PFA). Optic nerve specimens were taken 1 mm posterior to the globe and placed into a fixative consisting of 2.5% glutaraldehyde and 2% formaldehyde in PBS. The eyes, together with an additional subset of optic nerve (ON) segments were fixed in 4% PFA overnight, cryoprotected in serial sucrose solution, frozen in optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek, Miles Diagnostic Division, Elkhart, IN), sectioned in their entirety at 10 µm, mounted on Superfrost Plus slides (VWR Scientific, West Chester, PA), and stored at -80 °C for further study. ON segments were washed in 0.1 M cacodylate buffer and post-fixed in 2% aqueous osmium oxide. The segments were then dehydrated in graded alcohols and embedded in epon. One micrometer section was cut and stained with 1% toluidine blue in 1% borate buffer. Optic axons were counted in nine fields per ON cross section viewed at 1000X magnification. Axon survival percentage was calculated based on the number of ON axons in elevated IOP eyes divided by the number of axons in untreated contralateral eyes. For immunohistochemical analysis, mouse anti-Neuronal Nuclei (1:100, Chemicon, Temecula, CA) was used as the primary antibody, and FITC-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG (1:200) was used as the secondary antibody. Negative controls for immunostaining consisted of substituting normal serum in place of the primary antibodies. Anti-NeuN positive cells in the RGC layer were counted from the superior aspect of an average of five vertical sections through the optic disc for each eye. A grid was placed over the retinal section and the mean number of NeuN+ cells in the equivalent area of RGC layer from each eye was calculated.

**Statistical Analysis:** The data were expressed as means ± SD. Data between groups was compared using Student's t-test. The significance of RGC and axon rescue was assessed by one-way ANOVA. Statistical significance was declared at p<0.05.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Microspheres elaboration

The microspheres elaboration method proposed in this work is described in Scheme 1. Protein is sonicated in its solid state, in an oily medium (Vit E), under very mild conditions (low power, low temperature and short time). At these parameters proteins are protected from cavitation stress due to both its solid state and to the presence of the oily additive.

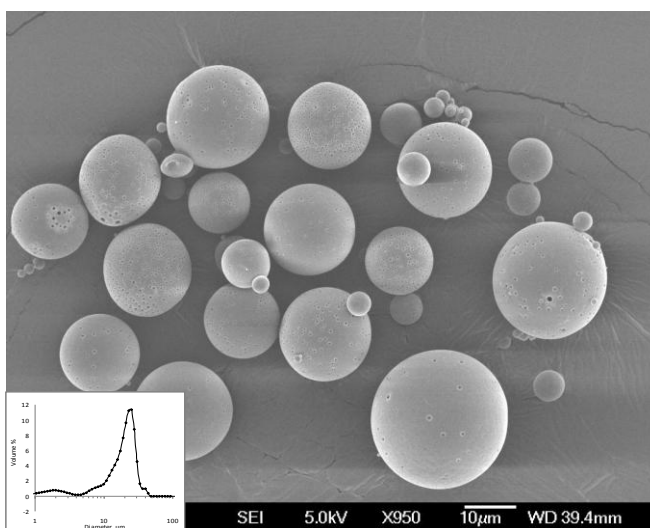


**Scheme 1:** Preparation of protein dispersion and S/O/W emulsion.

### Microspheres characterization

The microencapsulation method utilized in this work leads to a high production yield of  $76.3 \pm 8.4\%$ . As shown to Fig. 1, these particles were spherical and showed a high amount of small pores in addition to some large pores on their surfaces. The presence of large pores in the formulation is generally correlated with rapid removal of organic solvents that could cause a local reaction inside the polymer droplets leading to the formation of a porous structure [3]. The additional appearance of many small pores on the surface was related to the presence of Vit E in the organic phase. The fatty additive potentially slows the diffusion of the organic solvent out of the drop, leading to a golf-ball-like morphology [35]. A bimodal distribution of particle size, with a small population of microspheres in the 1-2  $\mu\text{m}$  range, and a second larger population, in the 10-

30  $\mu\text{m}$  range, was observed (Fig. 1). The mean particle size was  $19.1 \pm 9.4 \mu\text{m}$ . As the objective of the formulation prepared in this work is the sustained release of GDNF for extended periods of time, relatively large particles are preferred [36]. However, as microspheres are intended for intravitreal injection through standard needles (27-34G) [37] as an aqueous suspension, there is an upper limit of size that has to be respected. In this work, experimental conditions were established to obtain particle size suitable to balance those two essential aspects.



**Fig. 1:** SEM images of GDNF-loaded microspheres. The particle size distribution has been included.

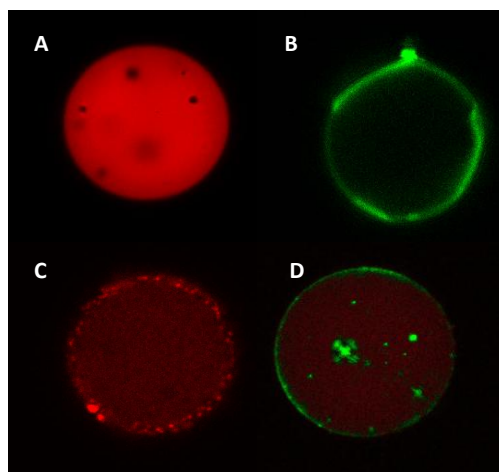
### **PLGA microsphere internal structure**

To allow for examination of the internal microsphere matrix, PLGA MSs were prepared including Nile red [30]. This dye has been previously employed to determine the localization of PLGA in microcapsules [31] and to monitor the behaviour of particles on the ocular surface of rabbits [38]. In this work the combination of PLGA with this dye, and the posterior evaluation by confocal microscopy was performed as an attempt to determine the inner matrix structure, by the assumption that the absence of dye (totally dissolved in the

organic internal phase during the microparticles preparation) might be related with the presence of pores on the matrix structure. According to that, as shown in Fig. 2A, some of the surface pores observed in SEM images continued into and through some of the larger microspheres.

### Protein and additive distribution

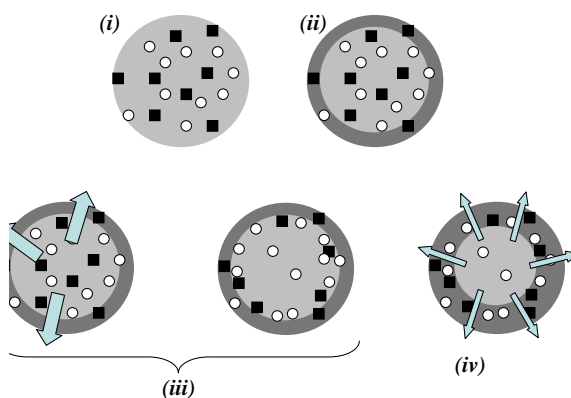
To identify protein distribution the labeled protein BSA was used. Fluorescently marked BSA was chosen as a model protein for confocal studies, as it is commercially available. Although GDNF and BSA differ in molecular weight and structure, a similar behaviour for both proteins might be expected as both are in their solid state and undergo the same microencapsulation procedure. As shown in Fig. 2B, the labeled protein (BSA-FITC) remained close to the spheres' surface, showing a non-homogeneous distribution. Concerning Vit E distribution, although spots of lipid were distributed throughout the entire microsphere matrix, high levels of fluorescence were noted close to the spheres' surface (Fig. 2C), indicative of the presence of the oil at this level. Finally, both BSA-FITC and TRITC-DHPE were included in the formulation (Fig. 2D). Results demonstrated an intimate contact between both elements, mainly located closed to the microsphere surface.



**Fig. 2:** Confocal microscopy images of Nile red labeled PLGA microspheres. (A) MS elaborated with PLGA and Nile red. The absence of dye might be related

with a inner porous structure. (B) MS elaborated with PLGA, vit E and BSA-FITC. Protein was mainly located near to MS surfaces. (C) MS elaborated with PLGA, Vit E and TRITC-DHPE as lipid dye. The oily lipids (vit E and dye) were distributed in all the MS, but were mainly located close to the MS surface. (D) MS elaborated with PLGA, Vit E, TRITC-DHPE, and BSA-FITC. A heterogeneous distribution was observed with higher quantities of protein and oily additive close to the MS surface.

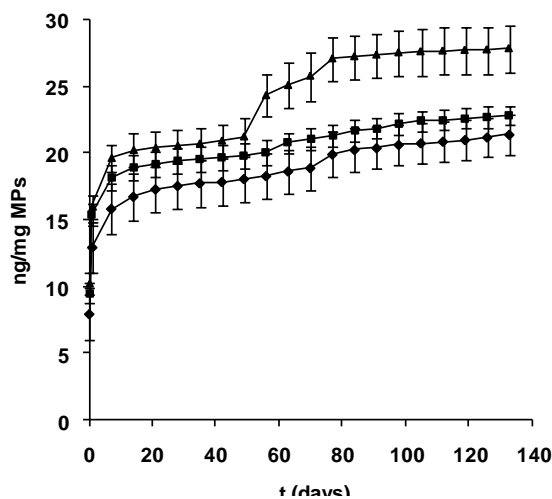
According to the observations made by this technique, a microsphere formation mechanism can be suggested (Scheme 2). Initially, a homogeneous drop of O-phase suspension is placed in the aqueous media (i). Rapidly, organic solvent from the drop surface begins to diffuse into water creating a hardened shell. Some amounts of vitamin and protein are entrapped at this level (ii). As the GDNF is first suspended in the Vit E, both components migrate together through the microsphere (iii). Finally, due to the presence of Vit E on this concentrated layer close to the surface, the remaining organic solvent tends to evacuate slowly, diffusing through this layer, forming the small pores on the microsphere surface (iv).



**Scheme 2:** Microspheres formation hypothesis (■ = protein; ○ = fatty additive; arrows = solvent movement).

### Stabilization of GDNF during *in vitro* release

Although several authors described pH 5.5 as the most appropriate level for GDNF stability [39], the release studies of this work have been performed at pH 7.4, because it is the physiological pH of most body fluids, including the vitreous [40]. Once released, proteins can adhere to the container surface, reducing their recovery. To overcome this issue, “low-binding” Eppendorf® tubes were used. Furthermore, protein molecules in the release media can also adsorb to PLGA surfaces, promoting the unfolding and aggregation phenomena. Albumins, such as BSA, have been extensively used as protective agents at this level. They are thought to occupy the interfaces and shield the therapeutic proteins from contact with hydrophobic surfaces, so they act with competitive adsorption to PLGA. In addition, they act as a proton scavenger during release of some proteins and also have a moderate buffering effect [1,2,4]. Although a BSA concentration of 0.1% is generally incorporated in most protein release studies [6,39,41], the BSA concentration that offers full protection has not been established. For this reason, release assays of GDNF were performed in PBS buffer alone and with different concentrations of BSA (0.1 and 1%). The cumulative release of GDNF from PLGA microspheres during the 19 weeks of *in vitro* release in the different release media employed is presented in Fig. 3.

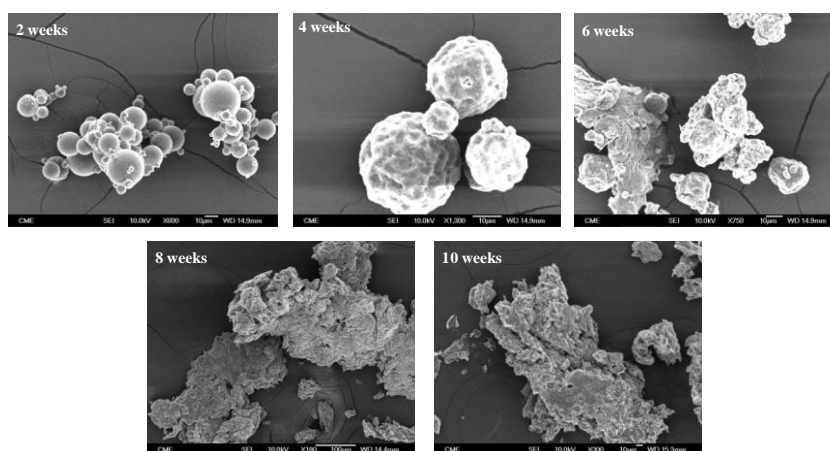


**Fig. 3:** Cumulative GDNF release profile, release media: PBS (pH 7.4) with different BSA content: (0.0% ◆; 0.1% ■; 1.0% ▲).

Low GDNF released was quantified when BSA-free media was used. Although 0.1% BSA showed a benefit in the recovery of released GDNF, better results were observed for release media containing 1% BSA. After the 19 weeks of the release assay no GDNF was found, indicating that no release or release lower than 15 pg/ml (low detection limit) occurred. At this point the resting material was collected and the remaining GDNF quantified. In all cases lower than 1% of encapsulated protein was recovered. When 1% BSA was included in the release media, the total cumulative release value of GDNF at the end of the study was in good agreement with those obtained after encapsulation efficiency assays. The loading data initially obtained was  $25.4 \pm 2.9$  ng GDNF/mg MS (encapsulation efficiency  $27.8 \pm 3.1\%$ ) while  $27.8 \pm 1.8$  ng GDNF/mg MS was recovered at the end of the release study. A typical three-phases profile was observed for the formulation analyzed. According to Morita and co-workers [12] this behavior can be explained as follows: first, water penetration into the matrix and diffusion of protein through the channels. Once water channels or aqueous pores are formed through the polymer, protein may be continuously released according to its own diffusivity. Furthermore, the degradation rate of the polymer would influence the later phase of protein release [12]. We noted that BSA protection was more evident at this time of the release assay, which might be related with a high GDNF-PLGA hydrophobic interaction, improving GDNF recovery. The GDNF release profile had an initial burst of  $16.0 \pm 0.9$  ng GDNF/mg MS in the first 24 h. After that, the progressive surface erosion of the microspheres provoked a sustained protein release, observed for the following 41 days, with a release rate of  $117.3 \pm 11.1$  pg GDNF/mg MS/day. From day 42 to day 77 the release rate was  $175.2 \pm 14.3$  pg GDNF/mg MS/day. From day 77, residual amounts of GDNF were released until the end of the assay (day 133) at a release rate of  $13.5 \pm 3.6$  pg GDNF/mg MS/day.

### Microsphere behaviour in release media

Microspheres were incubated in release media and recovered by centrifugation at established sampling times and evaluated by SEM (Fig. 4). The particles kept their spherical and smooth surface up to 2 weeks of incubation. However, surface erosion was evident at 4 weeks when rough surfaces were observed. The spheres maintained their spherical shape and remained as individual entities. After 6 weeks of the release assay the erosion was more evident and particles began to aggregate losing their initial shape. The aggregation of microspheres was completed for samples after 8 weeks of the assay.

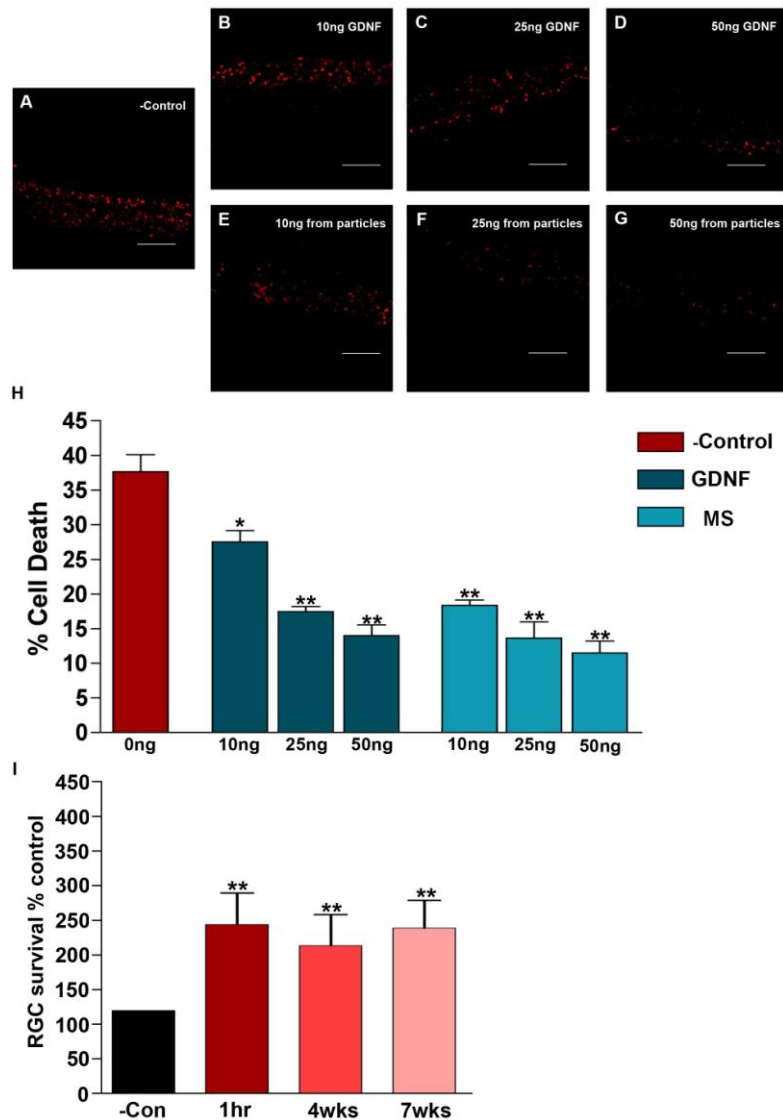


**Fig. 4:** SEM images of PLGA microspheres incubated in PBS at different release time points.

### In vitro bioassays

The therapeutical efficacy (and hence the three-dimensional integrity) of a protein should be assessed by monitoring the biological activity both at the end of the microencapsulation process and once released. For this reason, bioassays were assessed to demonstrate the biological activity of released GDNF with their potential target cells (photoreceptors and retinal ganglion cells). As shown in Fig. 5, when compared to the negative controls ( $0\mu\text{g}$  GDNF/ $20\mu\text{l}$  Vit E), significantly less photoreceptor cell death was observed at

48hrs post-plating when photoreceptor sheets were cultured in the presence of either 10 ng, 25 ng or 50 ng of GDNF delivered exogenously (Fig. 5 B-D & H) or from microspheres (Fig. 5 E-G & H). Results of additional negative controls (0µg GDNF/20µl Vit E microspheres and blank) were not found to be different from the one presented in the Fig. 5 (data not shown). Although no significant difference in photoreceptor cell survival was detected between exogenous GDNF and microparticle released GDNF at either of the tested concentrations (Fig. 5 B,E,H 10 ng; C,F,H 25 ng; D,G,H 50 ng), a trend toward increased photoreceptor cell survival, with less cell death in the microspheres condition as compared to the exogenous GDNF condition, was detected at the lower 10 ng concentration. To further identify whether GDNF released from microspheres was maintained in an active state, the ability of conditioned media (collected post-microsphere degradation) to induce retinal ganglion cell survival was studied. The release media “1h point” was evaluated as a representative point of the initial burst. Subsequently, the “4-weeks point” was chosen as a representative point in which the GDNF has diffused from the polymeric matrix. Additionally, the “7-weeks time point” was also evaluated as *in vitro* studies showed a change in the profile shape at this point. As shown in Fig. 5I, a significant increase in retinal ganglion cell survival was detected in cultures treated with GDNF release media collected at 1hr, 4 weeks and 7 weeks of the *in vitro* study, in comparison to fresh release media. Collectively, this data suggest that GDNF encapsulated and released from microspheres is maintained in its functional form following microsphere fabrication and degradation.



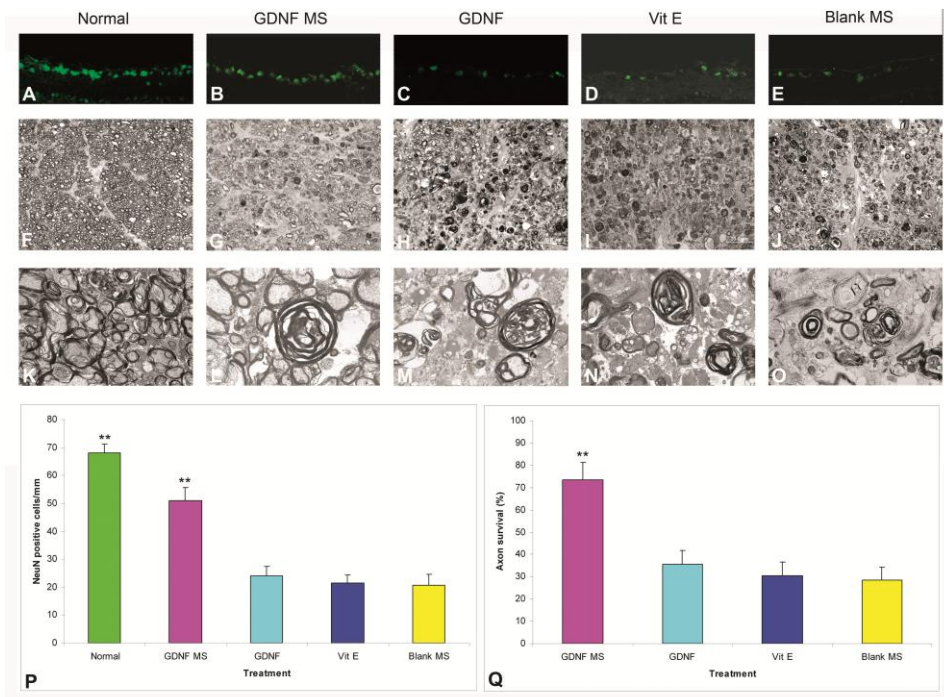
**Fig. 5:** Analysis of GDNF function post microsphere fabrication and degradation. A-G: Tunnel assay performed on photoreceptor sheets cultured in the presence (B-G) or absence of GDNF (A), delivered either exogenously (B-D) or via microsphere degradation (E-G). H: percent photoreceptor survival at 48 hrs post-plating I: percent retinal ganglion cell survival at 48 hrs post plating from the release media at 1 hr, 4 weeks and 7 weeks of the release assay. Scale bar = 100  $\mu$ m. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ . MS = microspheres.

### **In vivo intravitreal implantation**

Effective neuroprotection in glaucoma will likely require the sustained availability of the active agent for prolonged periods of time. Neurotrophic factors present in the vitreous humor are rapidly degraded by free extracellular proteases including any released as a consequence of RGC degeneration. Additionally, neurotrophic factors may be taken up and degraded in the retina by resident microglia. Repeated injections of unprotected neurotrophic factors might not be sufficient to confer a significant effect and may be expected to result in an unacceptable rate of serious complications such as retinal detachment and endophthalmitis.

As shown in Fig. 6, ten weeks of IOP elevation resulted in substantial loss of RGC as labeled with the anti-neuronal nuclear antibody NeuN (Fig. 6B-E) when compared to eyes without IOP elevation (Fig. 6A). The effects of GDNF/Vit E microspheres on RGC survival were quantified by counting anti-NeuN positive cells in the ganglion cell layer (GCL) (Fig. 6P). In normal eyes without IOP elevation, the average number of anti-NeuN positive cells in the GCL was  $67.4 \pm 4.2/\text{mm}$ . Ten weeks of IOP elevation resulted in a significant loss of the RGC:  $20.8 \pm 2.1/\text{mm}$  with blank microspheres treatment and  $21.9 \pm 2.4/\text{mm}$  with Vit E treatment. GDNF/Vit E microspheres treatment resulted in preservation of RGCs:  $51.6 \pm 3.2/\text{mm}$  with 0.5% GDNF/Vit E microspheres (0.64 ng/eye) compared with  $22.8 \pm 3.2/\text{mm}$  using an equivalent amount of GDNF in a single dose. Chronic IOP elevation resulted in significant loss of RGC compared to uninjected control eyes without IOP elevation ( $p < 0.01$ ). 0.5% of GDNF/Vit E microspheres significantly increased RGC survival compared with GDNF, Vit E or blank microspheres ( $p < 0.01$ ). GDNF/Vit E microspheres implantation was also found to have a positive effect on optic nerve axonal survival. As shown in Fig. 6, after ten weeks of IOP elevation, there was evidence of substantial axon degeneration (Fig. 6F-J) compared with untreated normal controls (Fig. 6E). Axonal degeneration can be identified by the appearance of swollen axons that lack apparent axoplasm as well as axons that appear dark due to the collapse of the myelin sheath. The effects of GDNF/Vit E microspheres on axon survival were quantified by counting intact axonal profiles (Fig. 6Q). The percentage of

axon survival was calculated from the number of axons in elevated IOP eyes compared to the number of axons in the contralateral eye without IOP elevation. The survival percentage was 72.68% with GDNF/Vit E microspheres compared to 36.58% with GDNF, 30.65% with Vit E, and 28.96% with blank microspheres ( $p < 0.01$ ). There were no significant differences among GDNF, Vit E, and blank microspheres alone ( $p > 0.05$ ).



**Fig. 6:** GDNF/Vit E microspheres increased retinal ganglion cell survival and axonal integrity. A-E: Effects of GDNF/Vit E microspheres (MS) treatment on the survival of RGC (anti-NeuN positive cells) due to chronic IOP elevation (magnification 200X): Normal retina without IOP elevation (A). GDNF/Vit E MS treatment (B) resulted in the preservation of RGCs compared with GDNF (C) Vit E (D) and Blank MS (E). F-O: Effects of GDNF/Vit E MS treatment on axon survival due to chronic IOP elevation: Normal ON axons without IOP elevation (F). GDNF/Vit E MS treatment (G) resulted in a preservation of axons compare with GDNF (H), Vit E (I) and blank MS (J). Corresponding representative EM photos (K-O). F-J: magnification 1000X; K-O: magnification 7100X. Quantitative

analysis of GDNF/Vit E MS treatment on the survival of RGC (P). Chronic IOP elevation resulted in a significant loss of the RGC ( $p < 0.01$ ). GDNF/Vit E MS treatment significantly increased the RGC survival compared GDNF, Vit E and blank MS treatment ( $p < 0.01$ ). Quantitative analysis of GDNF MS treatment on the ON axon survival (Q). GDNF/Vit E MS treatment increased the survival percentage compared with GDNF, Vit E, and blank MS treatment ( $p < 0.01$ ). MS = microspheres.

It has been reported that GDNF selectively enhances the survival and development of dopaminergic neurons with an  $ED_{50}$  of 40  $\mu\text{g/ml}$  *in vitro*. However, there is no available data concerning the therapeutic concentration and half-life of exogenous GDNF in the vitreous in order to calculate the optimal GDNF release from the microspheres. Koeberle and Ball [23] determined that 1  $\mu\text{g}$  of exogenous intravitreally administered GDNF was able to promote RGCs survival following optic nerve transection in rats for 14 days, but no GDNF quantification was performed. Yan and co-workers [42] administered 1  $\mu\text{g}$  and 5  $\mu\text{g}$  of GDNF into axotomized rat eyes and they observed that the GDNF treatment resqued the neurons, achieving a 43.8% RGC survival with 1  $\mu\text{g}$  of GDNF and 47.8% with 5  $\mu\text{g}$  of GDNF, two weeks after nerve damage. In our study we have used a glaucoma model less aggressive (by increasing the IOP) and closer to a real situation. The total amount of GDNF administered in the vitreous was 0.64 ng (25.4 ng/mg MSs). This low amount released from the microspheres was able to protect RGC at least for 77 days. Furthermore, considering the reduced half-life of GDNF into the vitreous and the low release rate observed for example during the 3-7 weeks of contact, it seems that even extremely low amounts of GDNF achieved (0.8  $\text{pg/day}$ ) have a therapeutic effect on the retina, protecting RGC in the glaucoma model used. According to Ward and co-workers [25], such a slow release delivery systems of GDNF in the vitreous might then not only reduce the number of intravitreal injections but also could make the system more economically feasible.

## CONCLUSIONS

The method described in this work allowed for the encapsulation and controlled release of proteins ensuring their bioactivity, for prolonged periods of time (at least three months). The neurotrophic factor (GDNF) in combination with Vit E released from the microspheres was demonstrated to be effective for at least eleven weeks after a single intravitreal injection in an animal model of glaucoma. This approach may be a useful tool in the future treatment of retinal degenerative diseases.

Significantly, we found the regimen of intravitreal PLGA administration to be safe and effective, with no obvious side effects on the retinal integrity noted. We submit that future work involving intraocular delivery of proteins should make use of the many advantages presented here to maintain activity of the protein, and deliver sustained release of the chosen molecule(s).

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank the Spanish Ministry of Education and Ministry of Science and Innovation for financial support BIOAVAN-PROFIT SINGULAR PSE-300-100, MAT-2010-18242 and UCM 920415 GR 35/10-A. Patricia Checa thanks CAM (Spain) by the fellowship granted. Authors are grateful to the technical SEM and confocal microscopy assistance of the Centro de Microscopía Electrónica Luis Bru (CAI, UCM).

## REFERENCES

- [1] V.R. Sinha, A. Trehan, Biodegradable microspheres for protein delivery, *J. Control. Release* 90 (2003) 261-280.
- [2] U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59 (2005) 375-388.

- [3] L. Al Haushey, M.A. Bolzinger, C. Bordes, J.Y. Gauvrit, S. Briançon, Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design, *Int. J. Pharm.* 344 (2007) 16-25.
- [4] M. Van de Weert, W.E. Hennink, W. Jiskoot. Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1159-1167.
- [5] D. Blanco, M.J. Alonso, Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactant. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (1998) 285-294.
- [6] E. Garbayo, E. Ansorena, J.L. Lanciaego, M.S. Aymerich, M.J. Blanco-Prieto, Sustained release of bioactive glycosylated glial cell-line derived neurotrophic factor from biodegradable polymeric microspheres, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 844-851.
- [7] E. Garbayo, C.N. Montero-Menei, E. Ansorena, J.L. Lanciego, M.S. Aymerich, M.J. Blanco-Prieto, Effective GDNF brain delivery using microspheres--a promising strategy for Parkinson's disease, *J. Control Release.* 135:2 (2009) 119-126.
- [8] M. Tobío, J. Nolley, Y. Guo, J. McIver, M.J. Alonso, A novel system based on a poloxamer PLGA blend as a tetanus toxoid delivery vehicle, *Pharm. Res.* 16 (1999) 682-688.
- [9] W.T. Leach, D.T. Simpson, T.N. Val, E.C. Anuta, Z.S. Yu, R.O. Williams, K.P. Johnston, Uniform encapsulation of stable protein nanoparticles produced by spray freezing for the reduction of burst release, *J. Pharm. Sci.* 94 (2005) 56-69.
- [10] W. Yuan, F. Wu, M. Guo, T. Jin, Development of protein delivery microsphere system by a novel S/O/O/W multi-emulsion, *Eur. J. Pharm. Sci.* 36 (2009) 212-218.
- [11] Y. Han, H. Tian, P. He, X. Chen, X. Jing, Insulin nanoparticles preparation and encapsulation into poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres by using an anhydrous system, *Int. J. Pharm.* 378 (2009) 159-166.
- [12] T. Morita, Y. Sakamura, Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino, Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant, *J. Control. Release* 69 (2000) 435-444.

- [13] S. Koennings, A. Sapin, T. Blunk, P. Menei, A. Goepferich, Towards controlled release of BDNF- Manufacturing strategies for protein-loaded lipid implants and biocompatibility evaluation in the brain, *J. Control. Release* 119 (2007) 163-172.
- [14] W. Yuan, T. Ren, F. Wu, H. Zhao, T. Jin, A novel preparation method for microspheres by glycerol modified solid-in-oil-in-water multi-emulsion. *Polym. Adv. Technol.* 21 (2010) 371-376.
- [15] A. Schoubben, P. Blasi, S. Giovagnoli, L. Perioli, C. Rossi, M. Ricci, Novel composite microparticles for protein stabilization and delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 36 (2009) 226-234.
- [16] Y. Kakizawa, R. Nishio, T. Hirano, Y. Koshi, M. Nukiwa, M. Koiwa, J. Michizoe, N. Ida, Controlled release of protein drug from newly developed amphiphilic polymer-based microparticles composed of nanoparticles, *J. Control. Release* 142 (2010) 8-13.
- [17] P. Checa-Casalengua, B.A. Tucker, I.T. Molina-Martínez, M.J Young, I. Bravo-Osuna, R. Herrero-Vanrell. Release rate of GDNF from PLGA microspheres for the treatment of neural degenerative diseases. Influence of vitamin E addition. *ARVO* (2010) 51:4514.
- [18] C. Martínez-Sancho, R. Herrero-Vanrell, S. Negro, Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of aciclovir: influence of fatty and non-fatty additives, *J. Microencapsul.* 20 (2003) 799-810.
- [19] K.N. Engin. Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant, *Mol. Vis* 15 (2009) 855-860.
- [20] K. Yuki, D. Murat, I. Kimura, Y. Ohtake, K. Tsubota, Reduced-serum vitamin C and increased uric acid levels in normal-tension glaucoma, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 248 (2010) 243-248.
- [21] C.Y. Wang, F. Yang, X.P. He, H.S. Je, J.Z. Zhou, K. Eckermann, D. Kawamura, L. Feng, L. Shen, B. Lu, Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurin, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 10614-106025.
- [22] Z.Y. Chen, Z.Y. He, C. He, C.L. Lu, X.F. Wu, Human glial cell line-derived neurotrophic factor: A structure-function analysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268 (2000) 692-696.

- [23] P.D. Koeberle, A.K. Ball, Effects of GDNF on the retinal ganglion cell survival following axotomy, *Vis. Res.* 38 (1998) 1505-1515.
- [24] C. Jiang, M.J. Moore, X. Zhang, H. Klassen, R. Langer, M. Young, Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma, *Mol. Vis.* 13 (2007) 1783-1792.
- [25] M.S. Ward, A. Khoobeji, E.B. Lavik, R. Langer, M.J. Young, Neuroprotection of retinal ganglion cells in DBA/2J mice with GDNF-loaded biodegradable microspheres, *J. Pharm. Sci.* 96:3 (2007) 558-568.
- [26] C. Andrieu-Soler, A. Aubert-Pouëssel, M. Doat, S. Picaud, M. Halhal, M. Simonutti, M.C. Venier-Julienne, J.P. Benoit, F. Behar-Cohen, Intravitreal injection of PLGA microspheres encapsulating GDNF promotes the survival of photoreceptors in the rd1/rd1 mouse, *Mol. Vis.* 11 (2005) 1002-1011.
- [27] J.C. Morrison, C.G. Moore, L.M. Deppmeier, B.G. Gold, C.K. Meshul, E.C. Johnson, A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage, *Exp. Eye Res.* 64 (1997) 85-96.
- [28] J.C. Morrison, E.C. Johnson, W. Cepurna, L. Jia, Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage, *Prog. Retin. Eye Res.* 24 (2005) 217-240.
- [29] A.A. Jr. Veloso, Q. Zhu, R. Herrero-Vanrell, M.F. Refojo, Ganciclovir-loaded polymer microspheres in rabbit eyes inoculated with human cytomegalovirus. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 38:3 (1997) 665-675.
- [30] P. Xu, E. Gullotti, L. Tong, C.B. Highley, D.R. Errabelli, T. Hasan, J.X. Cheng, D.S. Kohane, Y. Yeo, Intracellular Drug Delivery by Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles, revisited, *Mol. Pharm.* 6 (2009) 190-201.
- [31] C. Berkland, E. Pollauf, N. Varde, D. W. Pack, K. Kim, Monodisperse Liquid-filled Biodegradable Microcapsules, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1007-1013.
- [32] X. Huang, D.Y. Wu, G. Chen, H. Manji, D.F. Chen, Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 44 (2003) 347-354.
- [33] C.G. Moore, S.T. Milne, J.C. Morrison, Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34 (1993) 363-369.
- [34] L. Jia, W.O. Cepurna, E.C. Johnson, J.C. Morrison, Effect of general anesthetics on IOP in rats with experimental aqueous outflow obstruction,

- Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41 (2000) 3415-3419.
- [35] A. Fernández-Carballido, P. Puebla, R. Herrero-Vanrell, P. Pastoriza, Radiosterilisation of indomethacin PLGA/PEG-derivative microspheres: protective effects of low temperature during gamma-irradiation, *Int. J. Pharm.* 313 (2006) 129-135.
- [36] U.B. Kompella, N. Bandi, S.P. Ayalasomayajula, Subconjunctival nano- and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:3 (2003) 1192-1201.
- [37] R. Herrero-Vanrell, M.F. Refojo, Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery, *Adv. Drug. Del. Rev.* 52 (2001) 5-16.
- [38] Y. Bin Choy, J. Park, M. R. Prausnitz, Mucoadhesive Microparticles Engineered for Ophthalmic Drug Delivery, *J Phys Chem Solids*, 69:5-6 (2008) 1533-1536.
- [39] A. Clavreul, L. Sindji, A. Aubert-Pouëssel, J.P. Benoit, P. Menei, C.N. Montero-Menei, Effect of GDNF-releasing biodegradable microspheres on the function and the survival of intrastriatal fetal ventral mesencephalic cell grafts, *Eur. J. Pharm. Biopharm* 63 (2006) 221-228.
- [40] A. Giteau, M.C. Venier-Julienne, A. Aubert-Pouëssel, J.P. Benoît, How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *Int. J. Pharm.* 350 (2008) 14-26.
- [41] A. Aubert-Pouëssel, D.C. Bibby, M.C. Venier-Julienne, F. Hindré, J.P. Benoît, A novel in vitro delivery system for assessing the biological integrity of protein upon release from PLGA microspheres, *Pharm. Res.* 19 (2002) 1046-1051.
- [42] Q. Yan, J. Wang, C.R. Matheson, J.L. Urich, Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF), *J. Neurobiol.* 38:3 (1999) 382-390.



**4.2 Preservation of biological activity of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) after microencapsulation and sterilization by gamma irradiation.**

P. Checa-Casalengua, C. Jiang, I. Bravo-Osuna, B. A. Tucker, I.T. Molina-Martínez, M.J. Young, R. Herrero-Vanrell.

Enviado a International Journal of Pharmaceutics.



## ABSTRACT

A main issue in controlled delivery of biotechnological products from injectable biodegradable microspheres is to preserve their integrity and functional activity after the microencapsulation process and final sterilization. The present experimental work tested different technological approaches to maintain the biological activity of an encapsulated biotechnological product within PLGA [poly (lactic-co-glycolic acid)] microspheres (MS) after their sterilization by gamma irradiation. GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), useful in the treatment of several neurodegenerative diseases, was chosen as a labile model protein. In the particular case of optic nerve degeneration, GDNF has been demonstrated to improve the damaged retinal ganglion cells (RGC) survival.

GDNF was encapsulated in its molecular state by the water-in-oil-in-water (W/O/W) technique or as solid according to the solid-in-oil-in-water (S/O/W) method. Based on the S/O/W technique, GDNF was included in the PLGA microspheres alone (S/O/W 1) or in combination with an antioxidant (vitamin E, Vit E) (S/O/W 2). Microspheres were sterilized by gamma-irradiation (dose of 25 kGy) at room and low (-78°C) temperatures. Functional activity of GDNF released from the different microspheres was evaluated both before and after sterilization in their potential target cells (retinal cells).

Although none of the systems proposed achieved with the goal of totally retain the structural stability of the GDNF-dimer, the protein released from the S/O/W 2 microspheres was clearly the most biologically active, showing significantly less retinal cell death than that released from either W/O/W or S/O/W 1 particles, even in low amounts of the neurotrophic factor.

According to the results presented in this work, the biological activity of biotechnological products after microencapsulation and sterilization can be further preserved by the inclusion of the active molecule in its solid state in

combination with antioxidants and using low temperature (-78°C) during gamma irradiation exposure.

**KEYWORDS:** Poly (lactic-co-glycolic acid), microencapsulation, polymeric drug delivery systems, protein delivery, gamma irradiation, neuroprotection, GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), biological activity, sterilization.

## INTRODUCTION

Encapsulation of biotechnological products within biodegradable polymers has been intended to avoid frequent administrations in the treatment of chronic diseases. Drug delivery systems such as biodegradable microspheres are promising therapeutic tools to provide sustained delivery of the active agent for long term avoiding successive administrations. To date, however, there are still problems associated to protein stability after microencapsulation and sterilization that remain unresolved. The microencapsulation of biological products in polymeric matrix is compromised by the high molecular weight, structural complexity, easy degradation and instability of these active molecules<sup>1-5</sup>. The choice of an appropriate method to microencapsulate macromolecules is critical, not only because it influences the physical or technological properties of microspheres, but also because the selected method should ensure the integrity of the biotechnological product during the preparation and storage of the systems<sup>1,6</sup>. Furthermore, it is necessary to select an appropriate process to guarantee that the final sterilization of the microspheres will not negatively affect biological activity of the encapsulated biotechnological compounds.

Among the different sterilization procedures available, gamma irradiation has been extensively used for microspheres prepared with biodegradable polyester polymers such as PLGA<sup>7-13</sup>. However, it is well known that  $\gamma$ -radiation can induce structural changes in both the polymer and on the encapsulated drug, especially if the active molecule is a protein<sup>8, 14</sup>. Irradiation can produce denaturation and degradation that affect the integrity and bioactivity of the therapeutic agent<sup>14</sup>. Several groups have reported the effects of gamma irradiation on PLGA microspheres entrapping peptides and proteins<sup>15-21</sup>. One of the most frequent problems is the formation of free radicals and reactive oxygen species (ROS) from both PLGA chains and proteins due to ionization phenomena, which might promote non-desired events. Among them, oxidation of side-chain groups, protein scission, backbone fragmentation and conformational changes of the loaded macromolecule are the most common. It

is generally accepted that large proteins are more prone to the alterations induced by gamma irradiation than peptides<sup>21</sup>.

Several strategies have been proposed to overcome the risk associated to ionizing radiation of microparticulate formulations. The use of low temperatures (dry ice) during the sterilization of microspheres loaded with low molecular weight drugs (i.e. aciclovir, ganciclovir, ibuprofen and indomethacin) has demonstrated to undergo no changes in the properties of the formulation after gamma irradiation exposure<sup>11, 12, 22, 23</sup>. However, this is not the case of microspheres loaded with biological products in which the use of low temperatures during irradiation does not provide the complete protection against undesirable reactions (i.e. protein carbonylation and hydroperoxide generation)<sup>24</sup>. These findings indicate that the use of low temperatures as an isolated procedure is not enough to assure preservation of biotechnological products exposed to irradiation.

The removal of free radical intermediates or inhibition of other oxidation reactions produced by ionizing radiation, which can be achieved by antioxidants<sup>11, 21, 24</sup>, could also offer protection of the encapsulated compounds. In this sense, the use of antioxidants as additives in the microspheres loaded with biological products results very attractive.

Furthermore, the inclusion of the active agent in its solid form has been proposed as another strategy that could promote the drug stability during sterilization, maintaining the initial conformation and minimizing the structural changes, compared with the use of the biomacromolecule in its molecular state<sup>17</sup>.

To the best of our knowledge, the effects of gamma-irradiation in proteins microencapsulated in its solid state combined with antioxidants have not yet been reported in the literature.

The objective of the present study was the evaluation of three technological approaches targeted at retaining protein biological activity after

microencapsulation and sterilization. GDNF, a dimer protein of 15-20 KDa/monomer, was chosen as a labile model protein. GDNF has been proposed as a therapeutic agent in neuroprotection because of its both neuroprotective and neurorestorative properties<sup>25-30</sup>. In the particular case of optic nerve degeneration, GDNF has been demonstrated to improve the damaged retinal ganglion cells (RGC) survival after its intravitreal injection emerging as a good candidate for the treatment of glaucomatous optic neuropathy<sup>29, 30</sup>.

The biotechnological product (GDNF) was encapsulated in PLGA microspheres in its solid or in its molecular state. To this, GDNF was included in its molecular state using the solvent evaporation technique from a water-in-oil-in-water emulsion (W/O/W) and as solid employing the solid-in-oil-in-water emulsion (S/O/W). Based on the S/O/W technique, the protein was included in the presence (S/O/W 2) or absence of vitamin E (S/O/W 1). The inclusion of vitamin E in the microspheres (S/O/W 2) was tested as an approach to prevent radical induced degradation. Microspheres obtained from the different techniques were sterilized by gamma-irradiation (25 kGy) at room and low (-78°C) temperatures. Loading efficiency, morphology, mean particle size and particle size distribution, scanning electron microscopy (SEM), gel permeation chromatography (GPC) and *in vitro* release assays for 133 days were performed to evaluate the sterilization effect on microsphere characteristics. Functional activity of GDNF released from the different microspheres was evaluated both before and after sterilization in their potential target cells (retinal cells).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **MATERIALS**

Recombinant Human GDNF and the ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) kit for GDNF quantification were supplied by R&D Systems (Minneapolis, MN USA). Poly-(D,L-lactide-co-glycolide acid) PLGA ratio 50:50 Mw 35000 Da (Resomer<sup>®</sup>503) was purchased from Boehringer Ingelheim (Pharma Co., Germany). Polyvinyl alcohol 72000 g/mol (PVA) was supplied by

Merck KGaA (Darmstadt, Germany).  $\alpha$ -tocopherol acetate (Vit E) and Bovine Serum Albumin (BSA) were obtained from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). Primary antibody anti-GDNF and secondary antibody anti-goat for WB was purchased from R&D Systems and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), respectively. ECL Western Blotting Detection Kit was supplied by GE Healthcare (Little Chalfont, UK). C57BL6 mice were provided by Charles River Laboratories, Wilmington, MA. All experiments were performed in compliance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, and all experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of the Schepens Eye Research Institute.

## **METHODS**

### **Microspheres elaboration**

GDNF-loaded PLGA microspheres were prepared using three different emulsion-solvent extraction evaporation methods, W/O/W, S/O/W 1 and S/O/W 2 (including Vit E in the inner phase). In the first method (W/O/W), 50  $\mu$ l of the internal aqueous phase (PBS pH 7.4) containing 20  $\mu$ g of recombinant human GDNF was emulsified, via sonication at low temperature (Sonicator XL, Head Systems, Iowa, USA), with an organic solution composed of 1 ml of PLGA in methylene chloride ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) (20% w/v). This first W/O emulsion was emulsified with 5 ml of PVA MilliQ<sup>®</sup> water solution (2% w/v) to form the final W/O/W double emulsion. The S/O/W 1 method was performed by suspending 20  $\mu$ g of recombinant human GDNF in 100  $\mu$ l of methylene chloride using sonication in the same conditions mentioned above. The suspension obtained was added to 0.9 ml of PLGA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  solution (22% w/v), mixed and subsequently emulsified with 5 ml of PVA solution in MilliQ<sup>®</sup> water (2% w/v). In the third method (S/O/W 2), 20  $\mu$ g of recombinant human GDNF were suspended in 20  $\mu$ l of Vit E throughout gentle sonication at low temperature. This suspension was mixed with 1 ml of PLGA solution in methylene chloride (20% w/v)<sup>31</sup>. After that, the prepared organic phase was emulsified with 5 ml of PVA MilliQ<sup>®</sup> water solution (2% w/v) to create the S/O/W emulsion.

In all cases, the final emulsification was performed in a homogenizer (Polytron® RECO, Kinematica GmbH PT 3000, Lucerna, Switzerland) at 5000 rpm for 1 min. The formed emulsions were subsequently poured onto 100 ml of an aqueous PVA solution (0.1% w/v) and were kept under constant stirring for 3 hours, to allow organic solvent evaporation. Once formed, microspheres were washed with MilliQ® water to eliminate the PVA and separated according to their particle size by filtration under vacuum conditions using 20 µm and 40 µm sieves. Particles were rapidly frozen (methanol/ice mixture) and freeze-dried to obtain a free flowing powder. Microspheres were kept at -20 °C under dry conditions until use.

### **Microspheres characterization**

The **Production yield percentage (PY%)** of each batch was calculated.

**Morphological evaluation.** The morphology of microspheres was evaluated by scanning electron microscopy (SEM; Jeol, JSM-6335F, Tokyo, Japan). Samples were gold sputter-coated prior to observation.

**Mean particle size and particle size distribution** were measured by light scattering in a Microtrac® S3500 Series Particle Size Analyzer (Montgomeryville, PA, USA). Samples were prepared by suspending the microspheres in MilliQ® water. The data were presented as mean volume diameter ± SD of three independent measurements.

**Encapsulation efficiency of GDNF:** 5 mg of microspheres were placed in 0.7 ml of methylene chloride. Once the polymer was dissolved, the same volume of the diluent reactive provided in the ELISA kit composed by PBS 7.4 and BSA 1% (w/v) was added. After strong mixing, both immiscible phases were separated by centrifugation (7880 g, 15 min). After separation, the aqueous phase was recovered. The so-performed liquid/liquid extraction was repeated four times, in order to recuperate the encapsulated protein. Assays were performed in triplicate. GDNF content in the aqueous medium was quantified by immunoassay.

***In vitro release studies:*** 5 mg of microspheres were suspended in 1.5 ml of PBS pH 7.4 with BSA 1% (w/v) and sodium azide 0.02% (w/v). “Low binding” Eppendorf® vials were used in all cases. Samples were placed in a shaker with constant agitation at 100 rpm (Clifton Shaking Bath NE5, Nikel Electro Ltd Avon United Kingdom) at 37°C.

At pre-set times (1h, 24h and once a week until the end of the assay) the microsphere suspensions were gently centrifuged (490 g for 3 min), the supernatant was recovered (aprox. 1.5ml) and replaced by the same volume of fresh medium to continue the release test. Aliquots from the supernatant were diluted with the diluent reactive provided in the ELISA kit (DY995 R&D System) in order to obtain a protein concentration in the suitable range (15-1000 pg/ml) to be analysed by the ELISA technique.

***Polymer integrity:***

***High-performance Gel Permeation Chromatography (GPC):*** The molar mass of the polymer (PLGA) was evaluated by GPC at different times during the release assay (1 hour, 4, 7, 12 and 19 weeks). Two columns PLgel 3µm MIXED-E and PLgel 5µm MIXED-D, both of 7.8mm×300mm preceded by a PLgel 5 µm guard column 50mm×7.5mm (Varian, Polymer Laboratories, Church Stretton, Shropshire, UK), were connected consecutively to increase the accuracy of the procedure. The apparatus included a Waters 1525 binary HPLC pump and a Waters 2414 Refractive Index Detector (Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France). The temperature of column was maintained at 33°C using a Waters heating column system. THF was filtered (Sartolon Polyamid, 0.45 µm, Göttingen, Germany) and degassed before use. Flow rate was 1 ml/min of THF. Before injection, samples were filtered using a PTFE membrane (0.2mm×13 mm, Teknokroma). 20 µL was injected via a 100 µL Hamilton syringe (Hamilton Company, Nevada, US). The column was calibrated using polystyrene standards of different molar masses: 381, 1100, 2950, 6520, 18600, 43700 g/mol, purchased from Waters (Mainz, Germany), 10100, 24600, 72450 g/mol, supplied by Varian (Polymer Laboratories) (Church Stretton, Shropshire, UK).

Solutions of standard polystyrene were prepared by the dissolution of the polymers in THF at a concentration ranging from 0.4 to 1.6 mg/ml depending on the molar mass. Experimental samples were dissolved in THF at concentrations ranging from 1 to 2 mg/ml.

### ***Sterilization process***

Microspheres elaborated by the three microencapsulation methods were sealed in glass vials. All samples were irradiated using  $^{60}\text{Co}$  in the Gamma Sterilization Unit of Aragogamma S.A. (Barcelona, Spain). Following the USP recommendations, a dose of 25 kGy was applied to ensure an effective sterilization<sup>22</sup>. Microspheres were sterilized both at room temperature and in presence of dry ice (-78°C), in order to determine the effect of the temperature during the irradiation process. The sterilized formulations were characterized as described above.

### ***Protein integrity***

#### ***Western blot analysis***

GDNF samples were obtained by extraction from microspheres following the same protocol used to determine the encapsulation efficiency. Non-reducing and reducing SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) was performed onto 15% polyacrylamide gels. After separation, protein samples were transferred onto nitrocellulose membranes. Western blot was performed by sitting the membrane with the blocking solution: 5% non-fat dry milk in TBST (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) for 1 h, followed by the incubation with anti-GDNF antibody 1:100 (R&D Systems) in blocking buffer overnight at 4 °C. After washing with TBST, the blot was incubated in blocking solution with the secondary antibody anti-goat 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology). Detection was achieved using the ECL Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare). Unless specified, all incubations were performed at room temperature.

### ***In vitro bioassays***

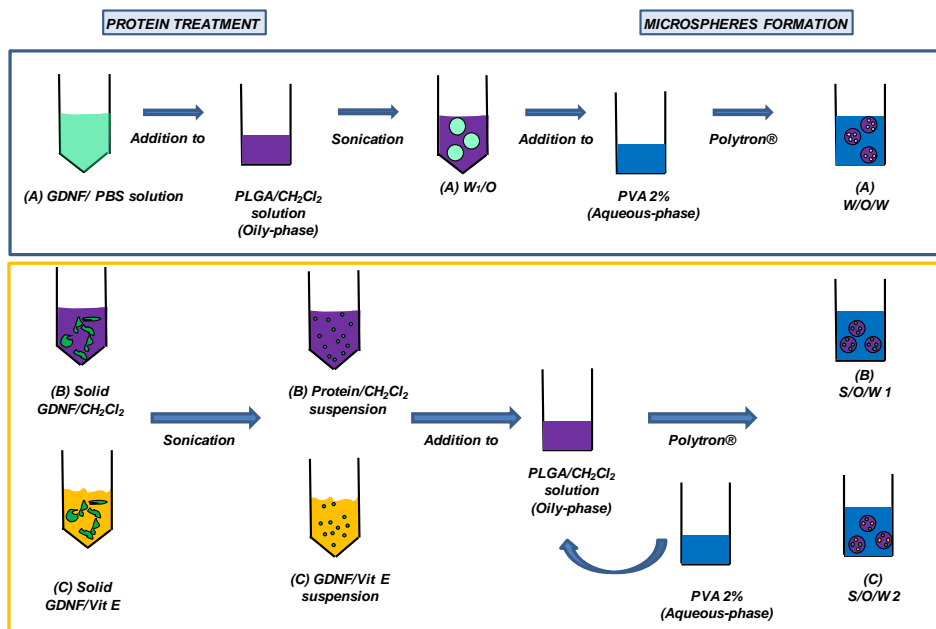
Retinal cell isolation and survival assay: Mouse retinal cells were isolated as described previously<sup>32</sup>. Briefly, retinas from postnatal day 10 B6 mice were dissected free from the posterior eyecup. Pooled retinal tissues were finely minced in Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-free Hanks' balanced salt solution (HBSS) and dissociated by incubating for 20 minutes at 37°C in HBSS containing 0.1% collagenase. The supernatant containing liberated cells was centrifuged at 233 g for 5 min at room temperature and the pellet was resuspended and seeded into 16-well chamber slides in neurobasal medium supplemented with B-27 supplement and N-2 supplement. Once isolated, retinal cells were exposed to various conditioned media released from different GDNF loaded microspheres prepared by the three different methods (W/O/W, S/O/W 1 and S/O/W 2) in the three different conditions [non sterilized (NS), sterilized at room temperature (SRT) and sterilized at low temperature (SLT)]. In order to compare biological activity of GDNF from the different microspheres, aliquots of the same concentration from the release study according to ELISA quantification were chosen for each condition (NS, SRT and SLT). Three different GDNF amounts were tested: 250 pg for non sterilized formulations (9 weeks of the release assay for W/O/W, 11 weeks for S/O/W 1 and 10 weeks for S/O/W 2), 70 pg for sterilized microspheres (with dry ice) (11 weeks of the release study for W/O/W, 10 weeks for S/O/W 1 and 9 weeks for S/O/W 2), and 5 pg for sterilized microspheres (at room conditions) (17 weeks for W/O/W, 16 weeks for S/O/W 1 and 13 weeks for S/O/W 2). At 40 h post plating, cultures were fixed and analyzed via tunel labelling to determine the percentage of cell death.

**Statistical Analysis:** The data were expressed as means ± SD. Data between groups were compared using an analysis of variance (one-way ANOVA). Results were taken as significantly different at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Microsphere characterization

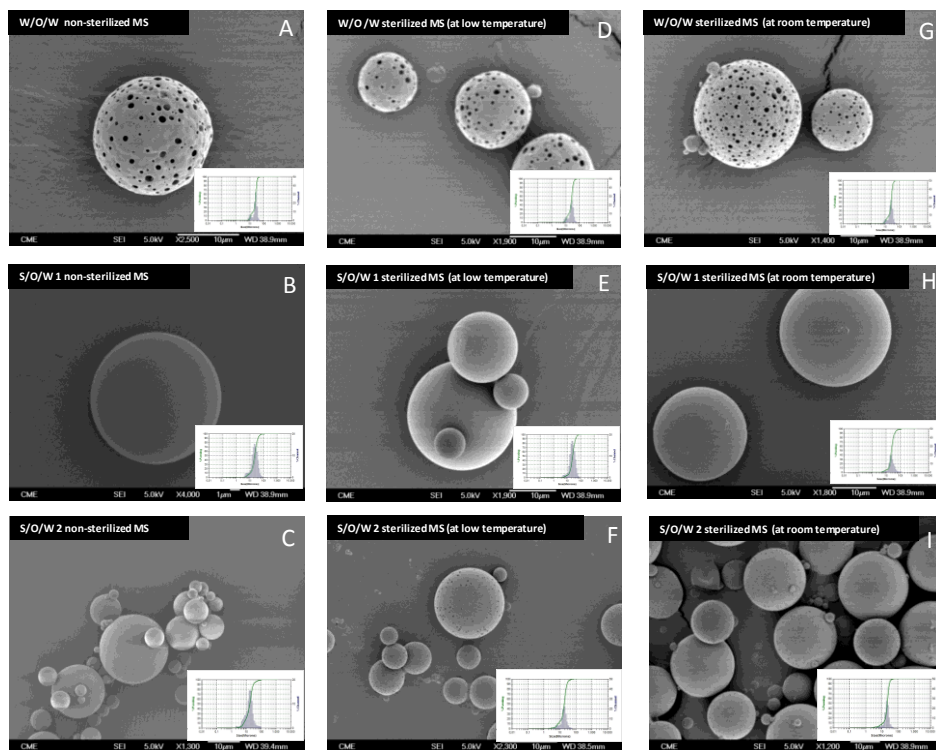
The microencapsulation methods used in this work are described in Scheme 1.



**Scheme 1:** Different techniques employed to encapsulated GDNF in PLGA microspheres

The different techniques led to a high production yield in all cases ( $72.4 \pm 7.0\%$  for W/O/W,  $79.7 \pm 4.4\%$  for S/O/W 1 and  $80.2 \pm 3.9\%$  for S/O/W 2). Scanning electron microscopy showed spherical particles with different aspects in the three formulations (Fig. 1A-C). Microspheres prepared by the W/O/W technique, possessed irregular surfaces with large concavities. On the contrary, the S/O/W 1 method produced microparticles with smooth surfaces and absence of pores. When Vit E was included in the inner O-phase (S/O/W 2), microspheres remained spherical and a large number of small pores were observed on the surface. The mean particle size values obtained for the three formulations

ranged from 19 to 26  $\mu\text{m}$  (Table 1), which is suitable for administration as suspension through standard injection needles (27-34G)<sup>33</sup>.



**Fig. 1:** SEM images of microspheres (non-irradiated and irradiated at low or room temperature) generated with the following three methods. W/O/W (A, D and G), S/O/W 1 (B, E and H) and S/O/W 2 (C, F and I). An example of the particle size distribution has been included for each formulation.

CONDITIONS	Mean particle size ( $\mu\text{m}$ )		
	W/O/W	S/O/W 1	S/O/W 2
Non-sterilized MS	26.11 $\pm$ 1.14	22.55 $\pm$ 2.65	19.80 $\pm$ 1.03
Sterilized MS (at low temperature)	25.23 $\pm$ 1.19	24.22 $\pm$ 1.95	20.32 $\pm$ 1.16
Sterilized MS (at room temperature)	25.67 $\pm$ 1.60	22.09 $\pm$ 3.90	20.39 $\pm$ 1.29

**Table 1:** Mean particle size presented as the diameter of the volume distribution. The data are shown as mean  $\pm$  SD.

***Encapsulation efficiency, in vitro release of GDNF and degradation of microspheres:***

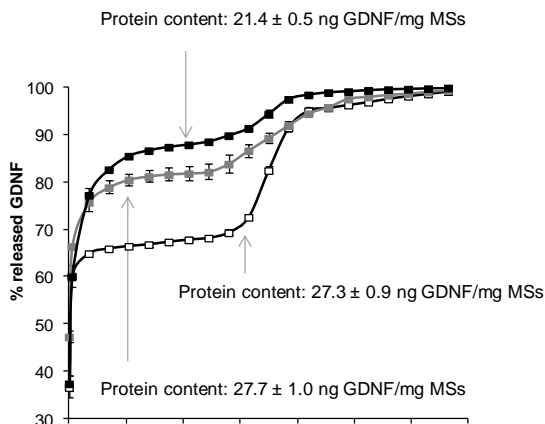
Table 2 summarizes the GDNF loading data of the particles elaborated by the different emulsification techniques.

The inclusion of the neurotrophic factor GDNF in its molecular state (dissolved in the inner phase of the first emulsion) (W/O/W) resulted in higher encapsulation efficiency ( $30.0 \pm 0.9\%$ ) when compared to that obtained when the protein was included as a solid in S/O/W 1 ( $23.4 \pm 0.5\%$ ). The inclusion of Vit E in the inner phase of the S/O/W 2 preparation increased the protein entrapment rendering similar values to the double emulsion technique ( $30.4 \pm 1.1\%$ ).

CONDITIONS	Protein content (ng GDNF/mg MS)		
	W/O/W	S/O/W 1	S/O/W 2
Non-sterilized MS	$27.3 \pm 0.9$	$21.4 \pm 0.5$	$27.7 \pm 1.0$
Sterilized MS (at low temperature)	$8.8 \pm 0.9$	$13.0 \pm 2.1$	$16.6 \pm 0.4$
Sterilized MS (at room temperature)	$5.4 \pm 0.1$	$5.2 \pm 0.2$	$7.4 \pm 1.4$

**Table 2:** GDNF encapsulation values obtained for each formulation. The data are shown as mean  $\pm$  SD.

The cumulative *in vitro* release profiles of GDNF from microspheres fabricated by the different techniques are shown in figure 2. The profile obtained showed the typical triphasic shape of PLGA systems for the three formulations.



**Fig. 2:** Cumulative GDNF release profile (%) for microspheres prepared by each of the three techniques: W/O/W (□), S/O/W 1 (■) and S/O/W 2 (■). Release media: PBS (pH 7.4) with 1.0% of BSA and 0.02% Sodium Azide.

According to table 3A, the initial phase was characterized by a burst effect (protein release during the first 24 hours of the release assay) followed by a short rapid release period (1 week for W/O/W and 2 weeks for S/O/W 1 and S/O/W 2), and a second long period of slow release. In the third phase, the release rate was clearly higher for the W/O/W formulation in comparison to S/O/W 1 and S/O/W 2. The protein remaining after the third phase was progressively released until the end of the assay:  $22.3 \pm 1.3$  pgGDNF/mgMS/day,  $4.8 \pm 0.4$  pgGDNF/mgMS/day and  $14.4 \pm 0.4$  pgGDNF/mgMS/day for W/O/W, S/O/W 1 and S/O/W 2 respectively (Fig. 3A).

Phases	W/O/W	S/O/W 1	S/O/W 2
<b>Phase I</b>	Burst: $16.1 \pm 0.1$ ngGDNF/mg MS Day 1-7: $210.5 \pm 10.1$ pgGDNF/mg MS/day	Burst: $12.7 \pm 0.2$ ngGDNF/mg MS Day 1-14: $362.4 \pm 44.3$ pgGDNF/mg MS/day	Burst: $19.3 \pm 0.8$ ngGDNF/mg MS Day 1-14: $274.6 \pm 36.9$ pgGDNF/mg MS/day
<b>Phase II</b>	Day 8-56: $21.3 \pm 1.2$ pgGDNF/mg MS/day	Day 15- 42: $23.9 \pm 2.0$ pgGDNF/mg MS/day	Day 15- 49: $16.4 \pm 4.9$ pgGDNF/mg MS/day
<b>Phase III</b>	Day 57-84: $292.4 \pm 12.3$ pgGDNF/mg MS/day	Day 43-84: $65.0 \pm 1.7$ pgGDNF/mg MS/day	Day 50-98: $95.7 \pm 7.6$ pgGDNF/mg MS/day

(A)

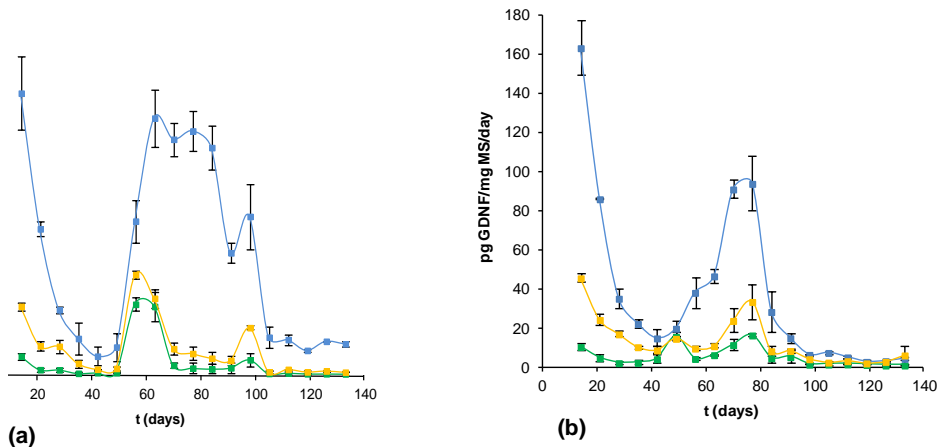
Phases	W/O/W	S/O/W 1	S/O/W 2
<b>Phase I</b>	Burst: $5.5 \pm 1.3$ ngGDNF/mg MS Day 1-7: $44.9 \pm 4.6$ pgGDNF/mg MS/day	Burst: $9.1 \pm 0.5$ ngGDNF/mg MS Day 1-14: $154.1 \pm 11.0$ pgGDNF/mg MS/day	Burst: $11.5 \pm 0.8$ ngGDNF/mg MS Day 1-14: $246.3 \pm 76.4$ pgGDNF/mg MS/day
<b>Phase II</b>	Day 8-56: $3.3 \pm 0.4$ pgGDNF/mg MS/day	Day 15-42: $11.8 \pm 0.4$ pgGDNF/mg MS/day	Day 15- 49: $6.7 \pm 0.3$ pgGDNF/mg MS/day
<b>Phase III</b>	Day 57-84: $33.5 \pm 9.9$ pgGDNF/mg MS/day	Day 43-84: $18.8 \pm 4.3$ pgGDNF/mg MS/day	Day 50-98: $13.4 \pm 1.5$ pgGDNF/mg MS/day

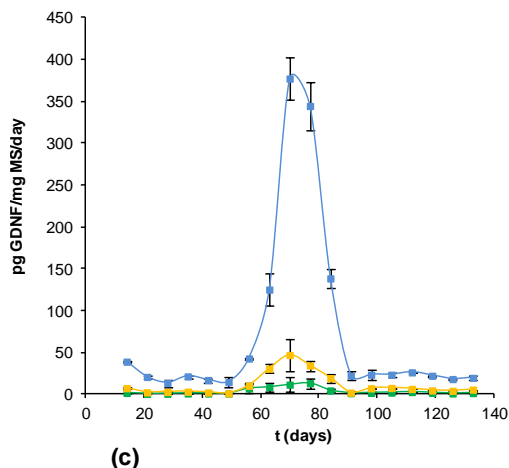
(B)

Phases	W/O/W	S/O/W 1	S/O/W 2
<b>Phase I</b>	Burst: $2.4 \pm 0.0$ ngGDNF/mg MS Day 1-7: $11.9 \pm 1.1$ pgGDNF/mg MS/day	Burst: $3.2 \pm 0.2$ ngGDNF/mg MS Day 1-14: $18.4 \pm 5.7$ pgGDNF/mg MS/day	Burst: $5.1 \pm 0.3$ ngGDNF/mg MS Day 1-14: $104.9 \pm 2.7$ pgGDNF/mg MS/day
<b>Phase II</b>	Day 8-56: $1.2 \pm 0.9$ pgGDNF/mg MS/day	Day 15-42: $2.8 \pm 0.1$ pgGDNF/mg MS/day	Day 15- 49: $1.7 \pm 0.6$ pgGDNF/mg MS/day
<b>Phase III</b>	Day 57-84: $10.0 \pm 5.5$ pgGDNF/mg MS/day	Day 43-84: $9.4 \pm 0.4$ pgGDNF/mg MS/day	Day 50-98: $7.1 \pm 1.3$ pgGDNF/mg MS/day

(C)

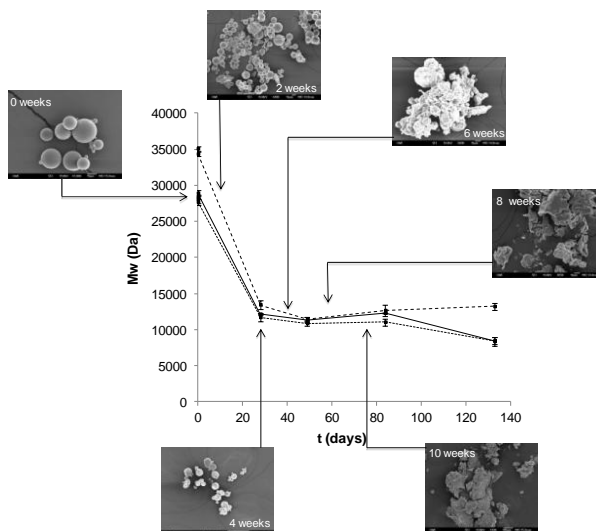
**Table 3:** Release rate of GDNF from both unsterilized (A) and sterilized microspheres ((B) at low temperature (C) at room temperature) fabricated using three different methods (W/O/W, S/O/W 1 and S/O/W 2).





**Fig. 3:** Release rate of GDNF from microspheres generated by W/O/W (A), S/O/W 1 (B) and S/O/W 2 (C) in the each of the different conditions: non sterilized microspheres (■), sterilized microspheres (with dry ice) (■) and sterilized microspheres (at room temperature) (■).

The evolution of the polymer molecular weight in the microspheres prepared by the S/O/W 2 technique was evaluated by GPC. Spheres were incubated in the release media following exactly the same protocol used for the protein release studies. A homogeneous Mw reduction of PLGA (initial Mw  $35076.8 \pm 292.4$  g/mol) occurred across each condition during the first 28 days, which led to a critical molecular weight of  $13445.5 \pm 566.4$  g/mol (Fig. 4A).



**Fig. 4:** Evolution of mean molecular weight (Mw) of (A) non-sterilized microspheres (- - -), (B) microspheres sterilized at low temperature (—) and (C) microspheres sterilized at room temperature (-----) generated by S/O/W 2 upon exposure to PBS (pH 7.4), 1% BSA and 0.02% Sodium Azide at 37°C.

### ***Sterilized microspheres:***

Regardless of sterilization conditions or fabrication process, the morphology of microspheres was unmodified by the sterilization procedure (Fig. 1D-I). Moreover, no changes in the mean particle size were detected ( $P = 0.73$ ,  $P = 0.66$  and  $P = 0.79$  for W/O/W, S/O/W 1 and S/O/W 2 respectively) (Table 1). The protein content in the microspheres after gamma irradiation was reduced in all formulations (Table 2). The percentage of protein contained into the microspheres sterilized in presence of dry ice was decreased by 68% for W/O/W and 40% for both S/O/W 1 and S/O/W 2, as determined by ELISA quantification. When irradiation was performed at room temperature, only 20%, 24% and 27% of the initial loaded protein was quantified for W/O/W, S/O/W 1 and S/O/W 2 preparations respectively.

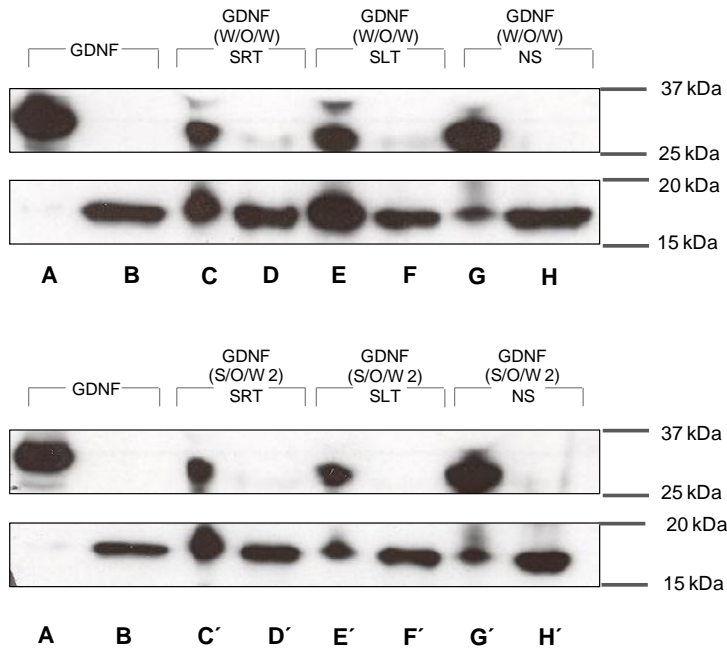
The effect of gamma irradiation on the GDNF release profile for each of the three different types of microspheres was investigated (Fig. 3 and Table 3B-C).

The biotechnological product released from microspheres after sterilization (at room and low temperature) maintained the triphasic profile. However, the initial burst release increased for the three formulations. Although no changes in the periods of time of each phase were identified, a reduction in the GDNF release rates was observed for W/O/W and S/O/W 1 microspheres during the first phase of the release assay. This was not the case of the S/O/W 2 formulation that released the same amount of GDNF during the first 14<sup>th</sup> days, both before and after sterilization when the samples were protected with dry ice (Table 3). Afterwards, significantly lower amounts of protein, compared with non sterilized microspheres, were progressively released until the end of the assay (133 days) for all microsphere batches:  $5.7 \pm 0.6$ ,  $3.2 \pm 0.1$  and  $2.1 \pm 0.0$  pgGDNF/mgMS/day for W/O/W, S/O/W 1 and S/O/W 2 formulations sterilized at low temperature and  $1.7 \pm 1.1$ ,  $1.4 \pm 0.1$  and  $1.0 \pm 0.7$  pgGDNF/mgMS/day for W/O/W, S/O/W 1 and S/O/W 2 formulations sterilized at room temperature.

When the PLGA molecular weight from microspheres prepared according to S/O/W 2 method was quantified by GPC after sterilization, a significant reduction (from  $35076.8 \pm 292.4$  g/mol to  $28441.0 \pm 279.3$  g/mol) was observed. The reduction in PLGA Mw was similar for microspheres sterilized both at room temperature and with dry ice (Fig 4B-C). The evolution of the microsphere morphology at different time points of the release assay (0h, 1h, 4, 7 and 12 weeks) is shown in Fig 4. As it can be seen, microspheres significantly changed their initial shape at 6 weeks. Subsequently, a shapeless mass of polymer was observed at 8 weeks of the release study.

#### ***Western blot analysis:***

Western blot analysis was carried out to evaluate the structural integrity of encapsulated protein before and after sterilization process (in presence or absence of dry ice) for W/O/W and S/O/W 2 microspheres. In non-reducing conditions, bands for the native dimer (25-37 kDa) appeared for samples obtained from both W/O/W and S/O/W 2 formulations. In both cases, additional bands of approximately 15-20 kDa were also detected, demonstrating that the quaternary structure of this labile protein was modified.

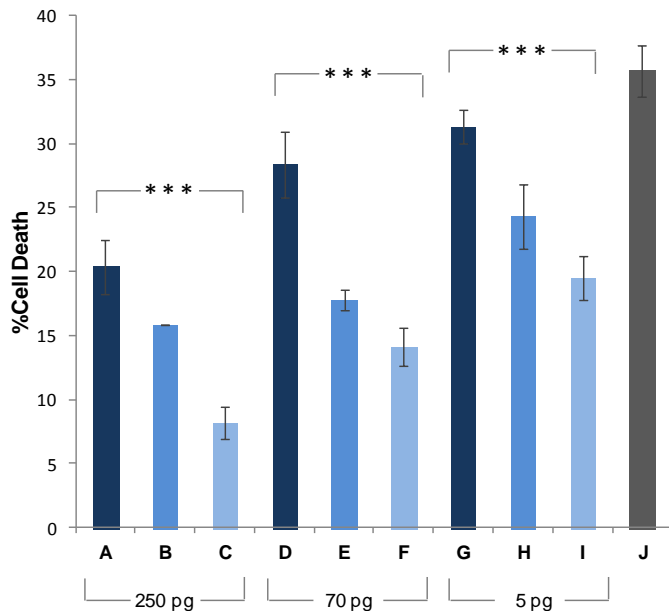
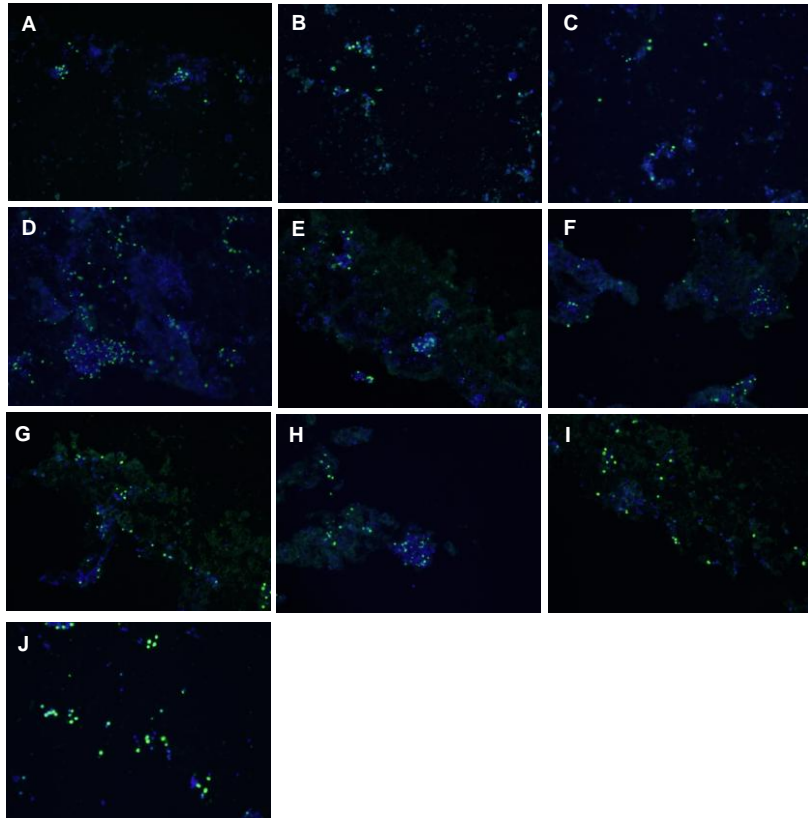


**Fig. 5:** Analysis of GDNF structural integrity by western blot using non-reducing and reducing conditions: (A) GDNF, (C) GDNF from W/O/W microspheres (sterilized at room temperature, SRT), (E) GDNF from W/O/W microspheres (sterilized at low temperature, SLT), (G) GDNF from W/O/W microspheres (non sterilized, NS), (C') GDNF from S/O/W 2 microspheres (sterilized at room temperature, SRT), (E') GDNF from S/O/W 2 microspheres (sterilized at low temperature, SLT), (G') GDNF from S/O/W 2 microspheres (non sterilized, NS) employing non-reducing conditions: (B) GDNF, (D) GDNF from W/O/W microspheres (sterilized at room temperature, SRT), (F) GDNF from W/O/W microspheres (sterilized at low temperature, SLT), (H) GDNF from W/O/W microspheres (non sterilized, NS), (D') GDNF from S/O/W 2 microspheres (sterilized at room temperature, SRT), (F') GDNF from S/O/W 2 microspheres (sterilized at low temperature, SLT), (H') GDNF from S/O/W 2 microspheres (non sterilized, NS) employing reducing conditions.

### ***In vitro* bioassays**

Bioactivity assays were performed to determine the biological activity of the protein after microencapsulation, sterilization, and release. To test, mouse

retinal cells were exposed to GDNF released from microspheres generated by each of the different techniques and sterilization conditions (non sterilized, sterilized at low temperature and sterilized at room temperature). As shown in figure 6, when comparing the three methods employed (W/O/W, S/O/W 1 and S/O/W 2), significantly less retinal cell death ( $P < 0.001$ ) was always observed at 40 h post-plating when cells were cultured in the presence of GDNF released from microspheres fabricated by the S/O/W 2 method. Biological activity of GDNF at 250 pg (detected by ELISA) from non sterilized microspheres fabricated by the S/O/W 2 method resulted in a lower retinal cell death (8.2%) compared with S/O/W 1 (15.9 %) and W/O/W (20.4%). Similarly, the retinal cell survival detected using GDNF released from sterilized microspheres, protected and non protected with dry ice, (70 pg and 5 pg GDNF determined by ELISA, respectively) was significantly higher ( $p < 0.001$ ) for the S/O/W 2 technique when compared to the W/O/W and S/O/W 1 methods. The percentage of cell death was resulted in 28.4% for W/O/W, 17.7% for S/O/W 1 and 14.1% for S/O/W 2 in microspheres sterilized at low temperature and 31.3% for W/O/W, 24.3% for S/O/W 1 and 19.5% for S/O/W 2 in microspheres sterilized at room temperature (Fig. 6).



**Fig. 6:** Analysis of GDNF function post-microsphere degradation. A-I: TUNEL assay performed on retinal cells culture in presence of released GDNF from microspheres generated by W/O/W (A, D and G), S/O/W 1 (B, E and H) and S/O/W 2 (C, F and I) in each of the different conditions: non-sterilized microspheres (A-C), sterilized microspheres (with dry ice) (D-F) and sterilized microspheres (at room temperature) (G-I). J: TUNEL assay performed on retinal cells culture in presence of BSS. The amounts of GDNF cultured were 250 pg (A-C), 70 pg (D-F) and 5 pg (G-I) according to ELISA quantification. (\*\*\*)  $P < 0.001$ ).

## DISCUSSION

The encapsulation of neurotrophic factors in biodegradable PLGA microspheres provides a desirable therapeutic approach for the treatment of chronic neurodegenerative diseases. GDNF loaded PLGA microspheres have been already prepared and tested for the treatment of Parkinson's disease<sup>34</sup> or glaucomatous optic neuropathy<sup>31</sup>. The manufacturing of these formulations for clinical use requires to either produced under aseptic conditions or terminally sterilized. The goal of this study was to evaluate whether the use of the active protein in its solid state combined with the inclusion of antioxidants would be considered as a useful strategy to preserve the bioactivity of neurotrophic factors such as GDNF after microencapsulation in PLGA microspheres and subsequent sterilization by gamma irradiation. The technological approaches can be extended to other biotechnological products encapsulated in PLGA microspheres.

Biological activity of active agents is essential and it must be assured in all steps of the microencapsulation process as well as after sterilization in the final formulation. As the pharmacological activity of the protein can be substantially altered due to the manufacturing conditions, the protection of the active agent employing technological strategies is critical to avoid immunogenicity complications<sup>35</sup>. Previous studies have demonstrated that the use of the protein in its solid state can reduce non-desired denaturation and the aggregation phenomena observed after its dissolution and posterior precipitation<sup>6, 36</sup>.

Three solvent evaporation methods, W/O/W, S/O/W 1, and S/O/W 2 (including Vit E), were applied to prepare PLGA microspheres containing GDNF. In the W/O/W method, the neurotrophic factor was first dissolved in the aqueous internal phase ( $W_1$ : PBS, pH 7.4). On the contrary, in the S/O/W methods, GDNF was encapsulated in its solid state, employing very mild conditions (short time, low power and low temperature) to reduce cavitation stress during the formation of a homogeneous suspension of the protein (Scheme 1). GDNF was dispersed as solid in a volume of vitamin E in the inner phase of the emulsion (S/O/W 2 technique) resulting both compounds entrapped in the microspheres.

As expected, the different microencapsulation techniques employed had a significant effect on GDNF entrapment, as well as release kinetics. The W/O/W technique has been described as the most efficient means of loading PLGA microspheres with water-soluble proteins<sup>1, 6, 37, 38</sup>. In our conditions, the inclusion of GDNF in the aqueous solution (W/O/W) led to an encapsulation efficiency of around 30%. Although this method allows protein loading up to 90%, the optimization of the procedure was beyond the scope of these experiments. Regarding the content of GDNF in the PLGA microspheres prepared with the solid protein, it is interesting to note that the inclusion of Vit E in the inner phase of the emulsion (S/O/W 2 method) had a beneficial effect increasing the amount of protein encapsulated compared to the S/O/W 1 technique. As shown in a previous report, the higher entrapment observed could be related to the disposition of the fatty additive close to the particle surface<sup>31</sup>, which might reduce the diffusion of the protein to the external phase during particle hardening. The cumulative *in vitro* release profiles of GDNF from microspheres fabricated by the diverse techniques showed the typical triphasic shape characteristic of PLGA systems.

Injectable drug delivery systems loaded with biological products require effective sterilization. Gamma irradiation is one of the most widely used and effective sterilization procedures available<sup>23, 33, 39, 40</sup>. However, ionizing radiation can have effects on the biodegradable polyesters, mainly by the formation of reactive radicals that might compromise the active substances included in these systems<sup>41, 42</sup>. Therefore, one approach to optimize the irradiation process could

be the addition of substances able to protect the protein from the reactive oxygen species (ROS) produced as by-products of irradiation<sup>24</sup>. In this sense, the use of an oxidation scavenger (ascorbate) has previously been shown to prevent radical induced degradation, favoring the stability of the proteins in gamma sterilized plasma samples<sup>24</sup>. To our knowledge, this is the first study in which the microencapsulation of an active protein (GDNF) in its molecular or in its solid state are compared in terms of biological activity after gamma sterilization as well as the beneficial effects of an antioxidant (Vit E) included in the formulation as a potential protection agent against bioactivity loss of the microencapsulated protein.

The effect of gamma-irradiation on GDNF release profile from microspheres prepared by the different methods led to a higher initial burst for the three formulations. These results are in accordance with a previous work in which a higher burst effect release of the peptide rhIGF-I (insulin like growth factor-I) was observed for irradiated microspheres<sup>16</sup>. Other authors also observed a faster release of the microencapsulated peptide (SPf66) after irradiation<sup>20</sup>. In the present work, comparing the three methods employed to fabricate the microspheres, the release rate of the protein after sterilization was less modified using the S/O/W 2 technique. During the first period of the release assay (1-14 days), the amount of GDNF released from the S/O/W 2 microspheres remained practically unchanged after  $\gamma$ -sterilization (protected with dry ice), with values of  $274.6 \pm 36.9$  pg GDNF/mg MS/day for non sterilized microspheres and  $246.3 \pm 76.4$  pg GDNF/mg MS/day for microspheres sterilized at low temperature. In contrast, a significant reduction (more than two fold) was observed for the GDNF released from microspheres prepared according to W/O/W and S/O/W 1 techniques for the first 7 and 14 days of the release assay, respectively.

Since the successful development of injectable drug delivery systems containing proteins requires the protection of the protein biological function throughout microencapsulation and sterilization, the structural integrity and biological activity of GDNF into the microspheres were analyzed. Electrophoresis studies demonstrated the existence of bands corresponding to native protein (25-37 kDa) and additional bands for monomers (15-20 kDa),

indicating structural changes in the protein. However, we cannot assure that the modifications observed were consequence of microencapsulation and sterilization because GDNF was extracted from the microspheres with the help of an organic solvent (methylene chloride). It is well known that this condition often perturb protein structure, inducing protein aggregates and/or accelerate chemical degradation<sup>35</sup>.

The most relevant results of the present study are related to functional activity of GDNF in their potential target cells (retinal cells) from the different formulations and conditions. In all cases, the S/O/W 2 formulation seemed to offer better perspectives, according to the evaluation of retinal cell survival of GDNF released from the three formulations. In bioassays, equal amounts of GDNF (quantified by ELISA) released from each formulation in each condition (non sterilized, sterilized at low temperature and sterilized at room temperature) were compared. Three different amounts of the biotechnological product (250 pg for NS, 70 pg for SLT and 5 pg for SRT) were tested. In all cases, the cell survival resulted always higher for the GDNF released from the S/O/W 2 microspheres. However, considering that ELISA can determine both monomers and dimers and only the latest are active, the higher bioactivity observed for the protein released from all microspheres prepared by the S/O/W 2 technique would be related to a more preservation of the native structure due to the use of protein in its solid state and the inclusion of antioxidants.

## **CONCLUSIONS**

Although none of the systems proposed achieved with the goal of totally retain the structural integrity of GDNF, the use of solid proteins in combination with antioxidants, can be considered an appropriated start-point to develop formulations able to preserve the biological activity of microencapsulated biotechnological products after sterilization by gamma irradiation at low temperature (-78°C).

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for financial support (MAT-2010-18242), UCM 920415 GR 35/10-A and RETICS net (RD07/0062/2002). Patricia Checa Casalengua thanks CAM (Spain) by the fellowship granted. Authors are grateful to the technical SEM assistance of the Centro de Microscopía Electrónica Luis Bru (CAI, UCM). Authors thank Alberto Bartolomé and Carlos Guillén (Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, UCM) for kindly help with Western Blot Analysis.

## REFERENCES

1. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release* 2003;90:261-280.
2. Al Haushey L, Bolzinger MA, Bordes C, Gauthier JY, Briançon S. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. *Int J Pharm* 2007;344:16-25.
3. Hamishehkar H, Emami J, Najafabadi AR, et al. The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009;74:340-349.
4. Yuan W, Wu F, Guo M, Jin T. Development of protein delivery microsphere system by a novel S/O/O/W multi-emulsion. *Eur J Pharm Sci* 2009;36:212-218.
5. Ye M, Kim S, Park K. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *J Control Release* 2010;146:241-260.
6. Andreas K, Zehbe R, Kazubek M, et al. Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification techniques: investigation for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 2011;7:1485-1495.
7. Hausberger AG, Kenley RA, DeLuca PP. Gamma irradiation effects on molecular weight and in vitro degradation of poly(D,L-lactide-CO-glycolide) microparticles. *Pharm Res* 1995;12:851-856.

8. Montanari L, Costantini M, Signoretti EC, et al. Gamma irradiation effects on poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Control Release* 1998;56:219-229.
9. Bittner B, Mader K, Kroll C, Borchert HH, Kissel T. Tetracycline-HCl-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres prepared by a spray drying technique: influence of gamma-irradiation on radical formation and polymer degradation. *J Control Release* 1999;59:23-32.
10. Faisant N, Siepmann J, Oury P, et al. The effect of gamma-irradiation on drug release from bioerodible microparticles: a quantitative treatment. *Int J Pharm* 2002;242:281-284.
11. Martinez-Sancho C, Herrero-Vanrell R, Negro S. Study of gamma-irradiation effects on aciclovir poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration. *J Control Release* 2004;99:41-52.
12. Fernandez-Carballido A, Herrero-Vanrell R, Molina-Martinez IT, Pastoriza P. Sterilized ibuprofen-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for intra-articular administration: effect of gamma-irradiation and storage. *J Microencapsul* 2004;21:653-665.
13. Dorati R, Colonna C, Serra M, et al. gamma-Irradiation of PEGd,IPLA and PEG-PLGA multiblock copolymers. I. Effect of irradiation doses. *AAPS PharmSciTech* 2008;9:718-725.
14. Jain S, Malyala P, Pallaoro M, et al. A two-stage strategy for sterilization of poly(lactide-co-glycolide) particles by gamma-irradiation does not impair their potency for vaccine delivery. *J Pharm Sci* 2011;100:646-654.
15. Shameem M, Lee H, Burton K, Thanoo BC, Deluca PP. Effect of gamma-irradiation on peptide-containing hydrophilic poly (d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *PDA J Pharm Sci Technol* 1999;53:309-313.
16. Carrascosa C, Espejo L, Torrado S, Torrado JJ. Effect of gamma-sterilization process on PLGA microspheres loaded with insulin-like growth factor-I (IGF-I). *J Biomater Appl* 2003;18:95-108.
17. Schwach G, Oudry N, Delhomme S, Luck M, Lindner H, Gurny R. Biodegradable microparticles for sustained release of a new GnRH antagonist--part I: Screening commercial PLGA and formulation technologies. *Eur J Pharm Biopharm* 2003;56:327-336.

18. Dorati R, Genta I, Montanari L, et al. The effect of gamma-irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin. *J Control Release* 2005;107:78-90.
19. Puthli S, Vavia P. Gamma irradiated micro system for long-term parenteral contraception: An alternative to synthetic polymers. *Eur J Pharm Sci* 2008;35:307-317.
20. Igartua M, Hernandez RM, Rosas JE, Patarroyo ME, Pedraz JL. Gamma-irradiation effects on biopharmaceutical properties of PLGA microspheres loaded with SPf66 synthetic vaccine. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;69:519-526.
21. Mohanan D, Gander B, Kundig TM, Johansen P. Encapsulation of antigen in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres protects from harmful effects of gamma-irradiation as assessed in mice. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;[Epub ahead of print].
22. Herrero-Vanrell R, Ramirez L, Fernandez-Carballido A, Refojo MF. Biodegradable PLGA microspheres loaded with ganciclovir for intraocular administration. Encapsulation technique, in vitro release profiles, and sterilization process. *Pharm Res* 2000;17:1323-1328.
23. Fernandez-Carballido A, Puebla P, Herrero-Vanrell R, Pastoriza P. Radiosterilisation of indomethacin PLGA/PEG-derivative microspheres: protective effects of low temperature during gamma-irradiation. *Int J Pharm* 2006;313:129-135.
24. Zbikowska HM, Nowak P, Wachowicz B. Protein modification caused by a high dose of gamma irradiation in cryo-sterilized plasma: protective effects of ascorbate. *Free Radic Biol Med* 2006;40:536-542.
25. Klocker N, Braunling F, Isenmann S, Bahr M. In vivo neurotrophic effects of GDNF on axotomized retinal ganglion cells. *Neuroreport* 1997;8:3439-3442.
26. Koeberle PD, Ball AK. Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy. *Vision Res* 1998;38:1505-1515.
27. Yan Q, Wang J, Matheson CR, Urich JL. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurobiol* 1999;38:382-390.

28. Andrieu-Soler C, Aubert-Pouessel A, Doat M, et al. Intravitreal injection of PLGA microspheres encapsulating GDNF promotes the survival of photoreceptors in the rd1/rd1 mouse. *Mol Vis* 2005;11:1002-1011.
29. Ward MS, Khoobehi A, Lavik EB, Langer R, Young MJ. Neuroprotection of retinal ganglion cells in DBA/2J mice with GDNF-loaded biodegradable microspheres. *J Pharm Sci* 2007;96:558-568.
30. Jiang C, Moore MJ, Zhang X, Klassen H, Langer R, Young M. Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma. *Mol Vis* 2007;13:1783-1792.
31. Checa-Casalengua P, Jiang C, Bravo-Osuna I, et al. Retinal ganglion cells survival in a glaucoma model by GDNF/Vit E PLGA microspheres prepared according to a novel microencapsulation procedure. *J Control Release* 2011;156 92-100.
32. Jiang C, Klassen H, Zhang X, Young M. Laser injury promotes migration and integration of retinal progenitor cells into host retina. *Mol Vis* 2010;16:983-990.
33. Herrero-Vanrell R, Refojo MF. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;52:5-16.
34. Garbayo E, Ansorena E, Lanciego JL, Aymerich MS, Blanco-Prieto MJ. Sustained release of bioactive glycosylated glial cell-line derived neurotrophic factor from biodegradable polymeric microspheres. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;69:844-851.
35. Jiskoot W, Randolph TW, Volkin DB, et al. Protein instability and immunogenicity: roadblocks to clinical application of injectable protein delivery systems for sustained release. *J Pharm Sci* 2012;101:946-954.
36. Perez C, Castellanos IJ, Costantino HR, Al-Azzam W, Griebenow K. Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers. *J Pharm Pharmacol* 2002;54:301-313.
37. Lagarce F, Garcion E, Faisant N, et al. Development and characterization of interleukin-18-loaded biodegradable microspheres. *Int J Pharm* 2006;314:179-188.
38. Wang J, Chua KM, Wang CH. Stabilization and encapsulation of human immunoglobulin G into biodegradable microspheres. *J Colloid Interface Sci* 2004;271:92-101.

39. Friess W, Schlapp M. Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. *Eur J Pharm Biopharm* 2006;63:176-187.
40. Puthli S, Vavia P. Formulation and performance characterization of radio-sterilized "progestin-only" microparticles intended for contraception. *AAPS PharmSciTech* 2009;10:443-452.
41. Faisant N, Siepmann J, Richard J, Benoit JP. Mathematical modeling of drug release from bioerodible microparticles: effect of gamma-irradiation. *Eur J Pharm Biopharm* 2003;56:271-279.
42. Mohr D, Wolff M, Kissel T. Gamma irradiation for terminal sterilization of 17beta-estradiol loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *J Control Release* 1999;61:203-217.

**4.3 Anti-angiogenic effect of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)-vitamin E combination encapsulated in a novel microsphere delivery system.**

P. Checa-Casalengua, C. V. Regatieri, I. Bravo-Osuna, I.T. Molina-Martínez, M.M. Puebla-Gonzalez, R. Herrero-Vanrell, M. J. Young.

Enviado a Investigative Ophthalmology & Visual Science.



## ABSTRACT

**Purpose:** To develop a novel microsphere long-term delivery system combining neurotrophic factors and vitamin E, for alternative or complementary therapy to the administration of anti-VEGF agents in the treatment of retinopathies involving vascular growth.

**Methods:** Poly(lactic-co-glycolic) acid PLGA microspheres loaded with a combination of GDNF/Vit E or GDNF/BDNF/Vit E were prepared by a solid-in-oil-in-water (S/O/W) solvent evaporation method in a micro-range of 20-40  $\mu\text{m}$ . Microspheres were characterized in terms of size, morphology and *in vitro* release studies. Cytotoxicity of the systems was evaluated in both, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and adult human retinal pigment epithelial (ARPE-19) cell lines. Subsequently, the anti-angiogenic effect of the microspheres was explored by measurement of the inhibition of capillary tube formation of endothelial cells (HUVECs).

**Results:** The encapsulation method led to GDNF/VitE and GDNF/BDNF/VitE microspheres (MSs) of 25 $\mu\text{m}$  size. The protein loading for neurotrophic factors in both formulations were  $14.4 \pm 1.2$  ng GDNF/mg MSs ( $15.8 \pm 1.3$  %) for GDNF/Vit E microspheres and  $29.8 \pm 3.2$  ng GDNF/mg MSs ( $22.3 \pm 2.4$  %) and  $14.6 \pm 1.9$  ng BDNF/mg MSs ( $17.29 \pm 2.3\%$ ) for GDNF/BDNF/VitE microspheres. Furthermore, the vitamin E content was also estimated to be  $86.9 \pm 0.2$   $\mu\text{g}$  Vit E/mg MSs for GDNF/Vit E microspheres and  $159.9 \pm 2.7$   $\mu\text{g}$  Vit E/mg MSs for GDNF/BDNF/Vit E microspheres. The PLGA microspheres were able to deliver the neurotrophic factors in a sustained manner for 12 weeks and did not show any cytotoxic effects in ARPE-19 and HUVEC cells lines. Tube formation experiments demonstrated that the novel microsphere system GDNF/Vitamin E prepared in this work possessed anti-angiogenic properties. However, the inclusion of the neuroprotective agent BDNF in the formulation did not offer any benefit in terms of reduction of tube length.

**Conclusions:** The GDNF-Vitamin E combination in a novel microsphere delivery system emerges as a promising therapeutic approach that can be used as alternative or complementary to the administration of anti-VEGF agents in the treatment of CNV associated to AMD as well as in other retinopathies involving vascular growth.

**KEYWORDS:** GDNF, BDNF, Vitamin E, anti-angiogenic effect, microspheres.

## INTRODUCTION

In the industrialized world, age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of severe vision loss in individuals over 60 years of age<sup>1</sup>. In exudative or neovascular AMD, new capillaries sprout from the choroid through Bruch's membrane and enter the retina<sup>2</sup>. Choroidal neovascularization (CNV) is a complex process controlled by numerous angiogenic agents such as growth factors, cytokines and extracellular cell matrix (ECM) components<sup>3, 4</sup>. Inhibition of angiogenesis is critical in the prevention and treatment of neovascular age-related macular degeneration (AMD)<sup>5</sup>.

Currently, intravitreal administration of anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) monoclonal antibody therapy is in use<sup>6</sup>, even though the treatment is not totally effective and it is necessary to combine biologic therapies to improve the quality and duration of responses while reducing frequency of treatments and diminishing side effects<sup>7</sup>. Furthermore, recent research suggests that repeated exposure to these drugs may damage retinal neurons<sup>8, 9</sup>. In its natural course, AMD results in a submacular fibrotic scar, causing degeneration of the sensory retina and photoreceptor loss in the macula<sup>10</sup>. Therefore, one therapeutic approach for vascular retinal diseases should be one in which simultaneously mitigates choroidal angiogenesis and protects retinal neurons. Following this tendency, some authors have pointed out the benefits of neuronal protection in neovascularization diseases. In this sense, the use of neurotrophic factors becomes an interesting implement.

The neuroprotective effect of factors such as GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor), BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) or CNTF (Ciliary neurotrophic factor) has been extensively reported, with a recognized potential for the treatment of a wide variety of neurodegenerative diseases<sup>11-16</sup>. Furthermore, recent studies have demonstrated that some of them, GDNF for example, showed some effects at vascular endothelium level<sup>17</sup>, so the administration of this neurotrophic factor indicated an additional benefit in the maintenance of the blood-retinal barrier in diseases such as age-related

macular degeneration (AMD) or diabetic retinopathy (DR). However, the advantage of using neuroprotective factors in AMD is not only limited to complementary therapy. This is the case of PEDF (Pigment epithelium-derived factor), presenting neuroprotective and anti-angiogenic properties. Nevertheless, under the best knowledge of the authors there is not reported an anti-angiogenic activity for other neuroprotective agents as GDNF or BDNF.

In parallel, as cumulative oxidative damage has been proved to be a possible cause of AMD, another therapeutic strategy is the reduction of oxidant substances, currently being tested in undergoing clinical trials<sup>18, 19</sup>. Furthermore, local delivery of antioxidants is an area of current interest, avoiding secondary effects of oral antioxidant supplementation<sup>20</sup>. Hence, one interesting approach would be the co-administration of antioxidant agents and neurotrophic factors in a local delivery manner in formulations intended for AMD.

Under the therapeutic point of view, the treatment of chronic diseases, such as AMD, requires an effective concentration of the active agents in the target side for prolonged periods of time. However, it is difficult to achieve this purpose via topical or systemic administration. The intravitreal injection of drugs is the most accepted method to treat vitreoretinal disorders, nevertheless a high dose and repeated injections are necessary to maintain drug levels in the therapeutic range<sup>21-23</sup>. Biodegradable microparticulate systems possess several characteristics that make them interesting as drug delivery vehicles. First, microspheres provide an alternative to multiple injections, controlling the release of the active substances over time and consequently, reducing the frequency of intraocular injections a patient must endure each year and the associated risks as retinal detachment, endophthalmitis, vitreous hemorrhage and cataract<sup>24</sup>. Furthermore, they are biocompatible and practically inert into the vitreous cavity, showing good tolerability<sup>25, 26</sup>. In addition, these systems can be easily eliminated from the body<sup>22</sup>. According to that, the use of microspheres made with poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) and loaded with neurotrophic factors and antioxidants emerges as a promising strategy in the treatment of this chronic disease.

As the neuroprotective effects of GDNF and BDNF are well established, the aim of the present work was to test the potential usefulness of the neurotrophic factor, GDNF alone and in combination with BDNF, released from sustained delivery systems as a new therapy against the angiogenic components of CNV. To this, PLGA microspheres loaded with a combination of GDNF and Vit E or a combination of GDNF, BDNF and Vit E were prepared and characterized. As angiogenesis process involves endothelial cell migration and proliferation<sup>5</sup>, the potential anti-angiogenic effect of these systems was explored by measurement of the inhibition of capillary tube formation of endothelial cells. Prior to that, the cytotoxicity of the systems were evaluated in both, endothelial and retinal cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **MATERIALS**

Recombinant Human GDNF, Recombinant Human BDNF and the ELISA (enzymo-linked immunosorbant assay) kits for GDNF and BDNF quantification were supplied by R & D Systems (Minneapolis, MN USA). Poly-(D,L-lactide-co-glycolide) PLGA ratio 50:50 (Resomer<sup>®</sup> 503) was purchased from Boehringer Ingelheim (Pharma Co., Germany). Polyvinyl alcohol 72,000 g/mol (PVA) was supplied by Merck KGaA (Darmstadt, Germany).  $\alpha$ -tocopherol acetate (Vit E) was obtained from Sigma-Aldrich (Schneildorf, Germany). Matrigel was purchased from BD Biosciences (Bedford, Massachusetts, USA). All other chemicals were reagent grade and used as received.

### **METHODS**

#### ***Microspheres elaboration***

GDNF/Vit E and GDNF/BDNF/Vit E-loaded PLGA microspheres (MSs) were prepared using the S/O/W emulsion-solvent evaporation technique previously described<sup>27</sup>. The first formulation was performed suspending 20  $\mu$ g of recombinant human GDNF in 20  $\mu$ l of Vit E. In the second one, 35  $\mu$ g of recombinant human GDNF and 20  $\mu$ g of recombinant human BDNF were

suspended in 40  $\mu$ l of Vit E. In both cases, the suspensions were carried out throughout gentle sonication at low temperature (Sonicator XL, Head Systems, Iowa, USA) for 30 sec in order to reduce the risk of proteins alteration<sup>28</sup>. The formed suspensions were mixed with 1 ml of PLGA solution in methylene chloride (20 % w/v). The so-prepared organic phases were emulsified with 5 ml of PVA MilliQ<sup>®</sup> water solution (2% w/v). Both emulsifications were performed in a homogenizer (Polytron<sup>®</sup> RECO, Kinematica GmbH PT 3000, Lucerna, Switzerland) at 5,000 rpm for 1 min. The resulting S/O/W emulsions were subsequently poured onto 100 ml of an aqueous PVA solution (0.1%) and continuously stirred for 3 hours at room temperature, to allow complete evaporation of the organic solvent. Once formed, microspheres were washed with MilliQ<sup>®</sup> water to eliminate the PVA and separated according to their particle size by filtration under vacuum conditions using different sieves sizes filters (20 and 40  $\mu$ m). Solid particles were rapidly frozen (methanol/ice mixture) and freeze-dried to obtain a free flowing powder. The dried microspheres were kept at -20 °C under dry conditions until use. Vit E microspheres were prepared in the same manner that GDNF/Vit E microspheres except that no neurotrophic factor was included. Additionally, blank microspheres without neurotrophic factors and Vit E were fabricated.

### ***Microspheres sterilization***

Microspheres were placed in glass vials. The vials were labelled and packed surrounded with dry ice into a polyurethane container, assuring a low temperature during de irradiation process. All samples were irradiated using <sup>60</sup>Co as the irradiation source in the Gamma Sterilization Unit of Aragogamma S.A. (Barcelona, Spain). Following the EMA recommendations, a dose of 25 kGy was applied to ensure an effective sterilization<sup>29</sup>.

### ***Microspheres characterization***

The ***Production yield percentage (PY%)*** of each batch was calculated.

**Morphological evaluation.** The morphology of microspheres was evaluated by scanning electron microscopy (SEM; Jeol, JSM-6335F, Tokyo, Japan). Microspheres were gold sputter-coated before observation.

**Mean particle size and particle size distribution** were measured by light scattering in a Microtrac<sup>®</sup> S3500 Series Particle Size Analyzer (Montgomeryville, PA, USA). A suitable amount of freeze-dried microspheres was suspended in deionized water. The average particle size was expressed as the volume mean diameter in micrometers  $\pm$  SD for 3 measurements per batch.

**Encapsulation efficiency of neurotrophic factors:** The content of encapsulated proteins in PLGA microspheres was determined by a liquid/liquid extraction method. Briefly, 5 mg of microspheres were placed in 0.7 ml of methylene chloride. Once the polymer was completely dissolved, 0.7 ml of PBS 7.4 and BSA 1% (diluent reactive provided in the ELISA kit) was added and the mixture was shaken in order to extract the proteins from the organic solution. After centrifugation at 7880 g for 15 min, the aqueous phase was collected and the GDNF and BDNF content in the solution was quantified using ELISA technique. The liquid/liquid extraction was repeated four times to recuperate the totally of the entrapped proteins and the assays were performed in triplicate. The amount of proteins recovered in each formulation was divided by the total mass added in the formulations to calculate proteins loading efficiency.

**Encapsulation efficiency of Vit E:** 10 mg of microspheres were dissolved with 1 ml of methylene chloride. Then, 4 ml of ethanol was added and mixed in a vortex for 1 min to precipitate the polymer and dissolve  $\alpha$ -tocopherol acetate. The mixture was centrifuged (8500 g, 15 min), and the supernatant was filtered through a 0.45  $\mu$ m syringe filter. Assays were performed in triplicate.  $\alpha$ -tocopherol acetate content in the filtrate was determined by HPLC technique. HPLC was performed on a Waters 717 Plus system using a Tracer Extrasil ODS2 column (5  $\mu$ m, 25 mm x 0.4 mm, Tecknokroma), and methanol-water (97:3 v/v) as mobile phase (1.5 ml/min). Absorbance was monitored at 294 nm (UV detector, Waters 486). The column was eluted in isocratic conditions over 18 min. Data acquisition and peak areas were determined with the Empower

Login software. The concentration of Vit E was calculated from a calibration curve between 100-500 µg/ml. The absence of adsorption of Vit E to filters was previously checked.

***In vitro release studies of neurotrophic factors:*** For determination of proteins release profiles, 5 mg of microspheres were suspended in 1.5 ml of PBS pH 7.4 containing 1.0% BSA and microbiologically preserved with 0.02% Sodium Azide. Incubation took place in “Low binding” Eppendorf® vials maintained at 37°C in a shaker with a constant agitation of 100 rpm (Clifton Shaking Bath NE5, Nikel Electro Ltd Avon United Kingdom). At defined time intervals (1h, 24h and one at week until the end of the assay) the microsphere suspensions were centrifuged at 490 g for 3 min and the supernatants were removed and replaced by an equal volume of fresh medium to continue the release test. The released proteins were analysed by ELISA previous dilution with the diluent reactive provided in the ELISA kit to obtain a protein concentration in the suitable ranges (15-1000 pg/ml for GDNF and 24-1500 pg/ml for BDNF).

***Cell culture and cytotoxicity assay:*** Adult human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) were grown in basal DMEM/F12 medium (Invitrogen, San Diego, CA) containing 10% fetal bovine serum (Invitrogen, San Diego, CA), 15 mM HEPES, 2.0 mM L-glutamine, 0.5 mM sodium pyruvate, and 20 mM sodium bicarbonate. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were grown in F12 medium (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (Cultilab) and 20 mM sodium bicarbonate. Cytotoxicity was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay. For this assay,  $10^5$  ARPE-19 cells or  $2 \times 10^4$  HUVEC cells were seeded in 96-well plates and cultured for 5 days. Afterwards, the medium was removed and fresh medium containing different amounts of Vit E microspheres (40 and 80 µg in 200 µL/well), GDNF/Vit E microspheres (40 and 80 µg in 200 µL/well) and GDNF/BDNF/Vit E microspheres (40 and 80 µg in 200 µL/well) were added to the wells, and the cells maintained for 24 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. Subsequently, the cells were washed with PBS and serum-free

medium containing MTT (0.5 mg/mL) added. After 2 hours of incubation, isopropanol extraction was performed and the absorbance measured at 570 nm with an ELISA reader (ELx800 BioTek Instruments, Winooski, VT).

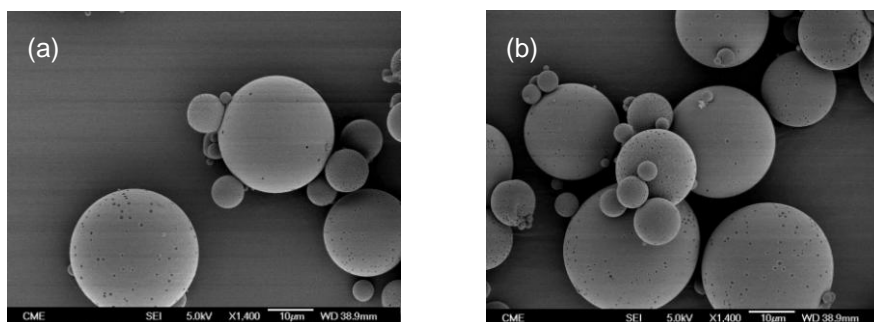
***Capillary-like tube formation on reconstituted basement membrane:***

Matrigel (BD Matrigel Matrix, BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA) was thawed at 4°C on ice and plated on the bottom of 24 well-plates, and left at 37°C for 16 hours for gelification. HUVECs (105 cells) were seeded on Matrigel in F12 medium containing 10% FBS and different amounts of heparinoid (90, 900, 9000 ng/mL) or saline (control). The cultures were maintained at 37°C in a 2.5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere for 24 hours<sup>30</sup>. Taking into consideration that the volume of rat vitreous is approximately 50 µL<sup>31</sup>, the concentrations of the heparinoid used for the cells mimic those used in direct intravitreal injection showed below. Each treatment was performed in triplicate. Tube formation was examined under an inverted light microscope at 100x magnification. Three images were randomly taken in different areas and quantified by two different observers. The total length of connected cells forming tubular structures on the matrigel was measured and determined using image analysis software (Image J, NIH, Bethesda, MD, USA) expressed as mm tube length/cm<sup>2</sup> area.

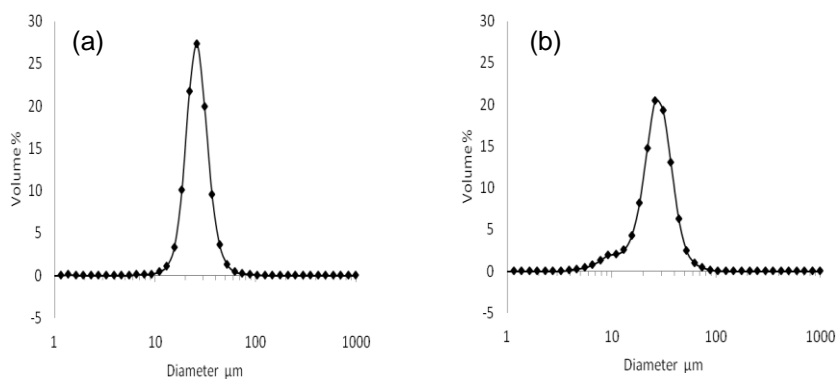
## **RESULTS**

### ***Microspheres characterization***

The encapsulation method proposed in this work led to a high production yield in both formulations 76.3 ± 3.4% for GDNF/VitE microspheres and 79.9 ± 2.4% for GDNF/BDNF/VitE microspheres. The morphology of the sterilized microspheres was evaluated by scanning electron microscopy (Fig. 1A). In all cases spherical particles were obtained showing some porous on the surface. Microspheres were performed in the micro-range 20-40 µm. The particle size distribution evaluation, observed in Fig. 1B, denoted a mean particle size of 25.0 ± 0.9 µm for GDNF/VitE microspheres and 25.5 ± 0.4 µm for GDNF/BDNF/VitE microspheres.



**Fig. 1A**



**Fig. 1B**

**Fig 1. (A)** SEM image of GDNF/Vit E microspheres (a) and GDNF/BDNF/Vit E microspheres (b). **(B)** Particle size distribution of GDNF/Vit E microspheres (a) and GDNF/BDNF/Vit E microspheres (b).

### ***In vitro release studies***

The protein loading for neurotrophic factors in both formulations were  $14.4 \pm 1.2$  ng GDNF/mg MSs ( $15.8 \pm 1.3$  %) for GDNF/Vit E microspheres and  $29.8 \pm 3.2$  ng GDNF/mg MSs ( $22.3 \pm 2.4$  %) and  $14.6 \pm 1.9$  ng BDNF/mg MSs ( $17.29 \pm 2.3\%$ ) for GDNF/BDNF/VitE microspheres. Furthermore, the vitamin E content

was also estimated to be  $86.9 \pm 0.2 \mu\text{g Vit E/mg MSs}$  for GDNF/Vit E microspheres and  $159.9 \pm 2.7 \mu\text{g Vit E/mg MSs}$  for GDNF/BDNF/Vit E microspheres. According to Fig. 2, the initial burst effects released in the first 24h were  $11.3 \pm 0.3 \text{ ng GDNF/mg MSs}$  for GDNF/Vit E microspheres and  $27.5 \pm 0.4 \text{ ng GDNF/mg MSs}$  and  $10.7 \pm 0.1 \text{ ng BDNF/mg MSs}$  for GDNF/BDNF/Vit E microspheres. After that, a rapid release short phase until 2 weeks was observed in both proteins for both formulations. The progressive surface erosion of microspheres would provoke the sustained proteins release observed for the following 34 days for GDNF and 69 days for BDNF. Finally, a rapid release was observed for GDNF until the end of the assay (day 84) (Table 1).

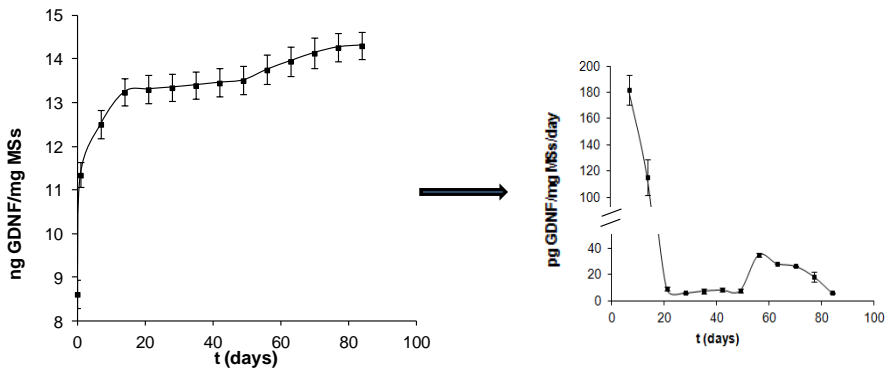


Fig 2A

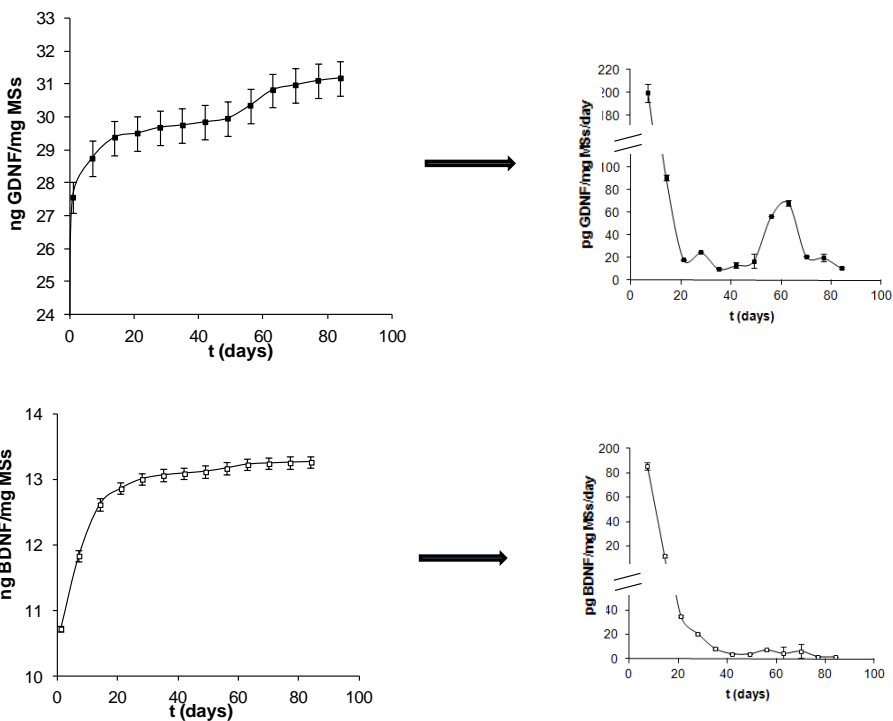


Fig 2B

**Fig 2. (A)** Cumulative GDNF release profile (ng GDNF/mg MSs) and release rate of GDNF (pg GDNF/mg MSs/day) from GDNF/Vit E microspheres. **(B)** Cumulative GDNF and BDNF release profile (ng GDNF or BDNF/mg MSs) and release rate of GDNF and BDNF (pg GDNF or BDNF/mg MSs/day) from

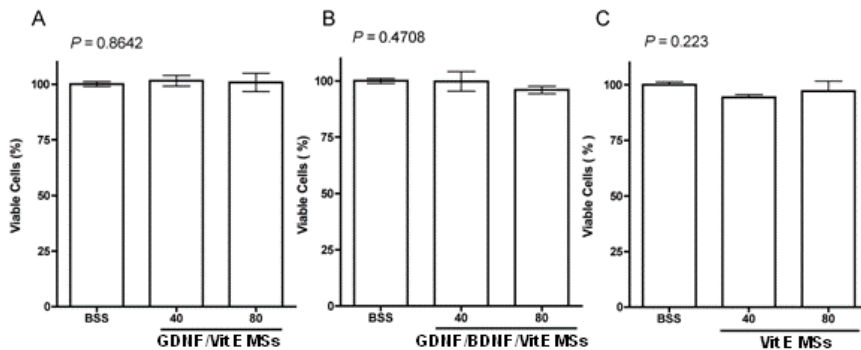
GDNF/BDNF/Vit E microspheres. GDNF (■) and BDNF (□). Release media: PBS (pH 7.4) with 1.0% of BSA and 0.02% Sodium Azide.

Phases	GDNF/Vit E MSs	GDNF/BDNF/Vit E MSs	
<b>Phase I</b>	Burst: $11.3 \pm 0.3$ ngGDNF/mgMSs Day 1-14: $144.9 \pm 12.7$ pgGDNF/mg MSs/day	Burst: $27.5 \pm 0.4$ ngGDNF/mgMSs Day 1-14: $139.5 \pm 2.2$ pgGDNF/mg MSs/day	Burst: $10.7 \pm 0.1$ ngBDNF/mgMSs Day 1-14: $144.9 \pm 0.8$ pgBDNF/mg MSs/day
<b>Phase II</b>	Day 15-49: $7.4 \pm 0.1$ pgGDNF/mg MSs/day	Day 15- 49: $15.4 \pm 0.7$ pgGDNF/mg MSs/day	Day 15- 84: $5.8 \pm 0.0$ pgBDNF/mg MSs/day
<b>Phase III</b>	Day 50-84: $20.3 \pm 1.1$ pgGDNF/mg MSs/day	Day 50-84: $28.1 \pm 1.8$ pgGDNF/mg MSs/day	

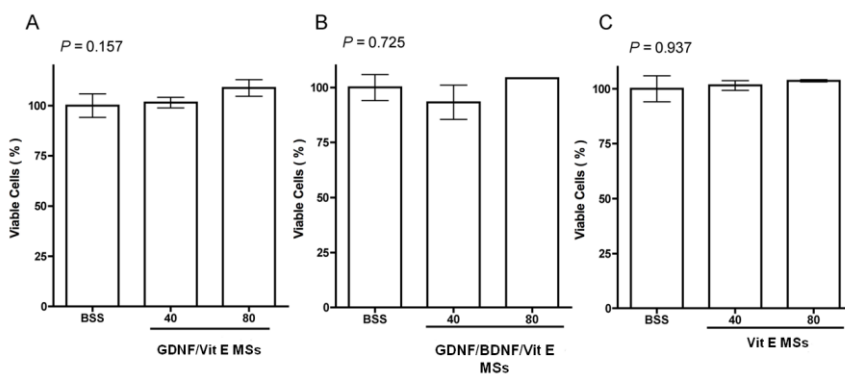
**Table 1:** Release rate of neurotrophic factors from GDNF/Vit E microspheres and GDNF/BDNF/Vit E microspheres.

**Cell viability of GDNF/Vit E and GDNF/BDNF/Vit E microspheres**

The potential cytotoxicity of GDNF/Vit E microspheres and GDNF/BDNF/Vit E microspheres was investigated in both ARPE-19 cells and HUVECs. Furthermore, Vit E microspheres was also tested. Fig 3. and Fig 4. Show values close to 100% of cell viability demonstrating non cytotoxic effects upon in ARPE-19 cells nor in HUVEC cells up to 80 µg of the three preparations.



**Fig 3.** Cell viability of retinal pigmented epithelium cells (ARPE-19) assessed by the MTT assay. 40 and 80  $\mu\text{g}$  of (A) GDNF/Vit E microspheres, (B) GDNF/BDNF/Vit E microspheres and (C) Vit E microspheres do not promote cell death.

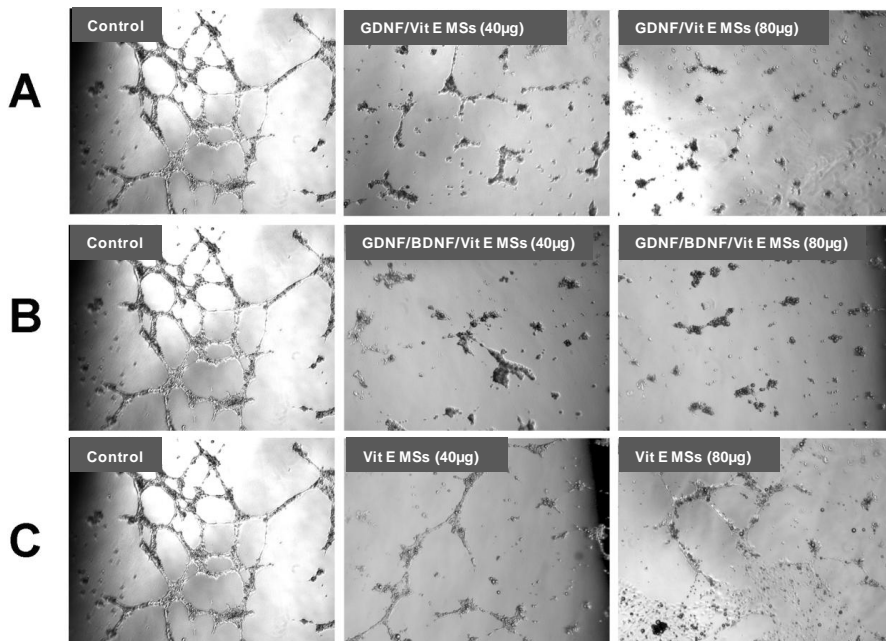


**Fig 4.** Cell viability of endothelial cells (HUVEC) assessed by the MTT assay. 40 and 80  $\mu\text{g}$  of (A) GDNF/Vit E microspheres, (B) GDNF/BDNF/Vit E microspheres and (C) Vit E microspheres do not promote cell death.

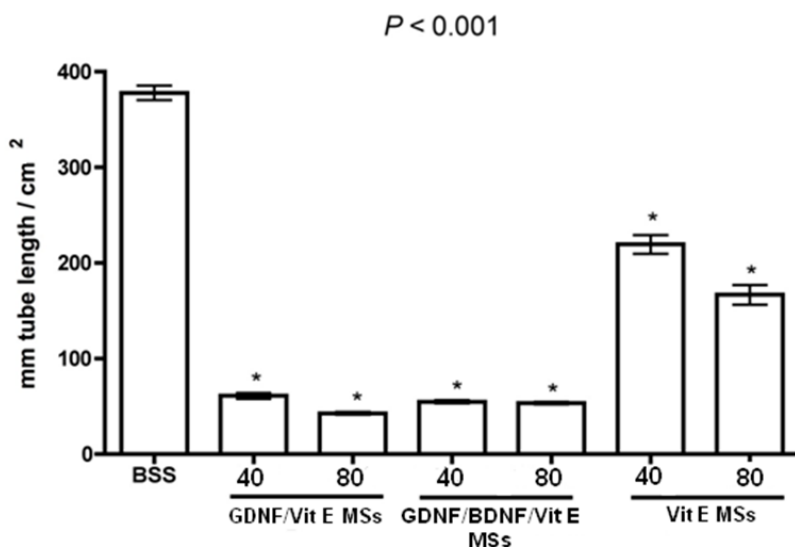
#### ***Inhibition of capillary tube formation of endothelial cells on matrigel with GDNF/Vit E and GDNF/BDNF/Vit E microspheres***

In order to evaluate whether the GDNF/Vit E and GDNF/BDNF/Vit E microspheres were capable of affecting tube formation, endothelial cells were plated in the presence or absence of the different amounts of the microspheres on top of a reconstituted basement membrane (Matrigel). Furthermore, Vit E microspheres and plain PLGA microspheres (blank microspheres) were also evaluated. All doses of the GDNF/Vit E and GDNF/BDNF/Vit E microspheres (40 and 80  $\mu\text{g}$ ) inhibited capillary tube formation when compared with the control (BSS group) (Fig. 5 and Fig. 6). The decrease in total mm of tube length was statistically significant for all doses of both formulations when compared with the control (BSS group). There was no difference between the two

amounts of GDNF/Vit E and GDNF/BDNF/Vit E microspheres tested (40 and 80  $\mu\text{g}$ ). Additionally, it was observed a statistically significant decrease in total mm of tube length of all doses of Vit E microspheres (40 and 80  $\mu\text{g}$ ) when compared with the BSS control (Fig. 5 and Fig. 6). Results of blank microspheres were not found to be significant different from the BSS control (data non shown).



**Fig 5.** Matrigel-based capillary-genesi assay was performed using endothelial cells exposed to GDNF/Vit E microspheres (A), GDNF/BDNF/Vit E microspheres (B) and Vit E microspheres (C). Each treatment was performed in triplicate. Tube formation was examined under an inverted light microscope at 40X magnification. BSS, balanced salt solution (control group).



**Fig 6.** The total length of connected cells forming tubular structures on the Matrigel was measured and determined using image J analysis software, and is expressed as mm tube length/cm<sup>2</sup> area. 40 and 80 µg of GDNF/VitE microspheres, GDNF/BDNF/Vit E microspheres and Vit E microspheres were tested. BSS, balanced salt solution (control group). *P*-values represent the results of statistical analyses (ANOVA); \* represents  $P < 0.05$  in Bonferroni's post-test, comparing all the groups with BSS.

## DISCUSSION

The neuroprotective properties of neurotrophic factors make them a useful therapeutic approach for the treatment of retinal degenerative diseases<sup>32, 33</sup>. Among them, GDNF has demonstrated to have strong neurotrophic properties in the retina by preserving photoreceptor cells functionality in animal models of retinal degeneration (*rd* mouse), enhancing rod outer segment maintenance and increasing the number of photoreceptors expressing opsin<sup>34-36</sup>.

Treatment of ocular multifactorial diseases with a combination of active substances is currently in the research pipeline. In some cases, the combination of two or more active substances has demonstrated positive effects as different pathways of the diseases at multiple levels are blockaded. This is the case of

administering GDNF with docosahexaenoic acid (DHA) presenting an additive effect both on photoreceptor survival and on opsin expression<sup>36</sup>. Another example is the co-administration of both neurotrophic factors (GDNF and BDNF) in an animal model of optic nerve axotomy, enhancing the survival of retinal ganglion cells (RGC) compared with the injection of either, GDNF or BDNF, alone<sup>37, 38</sup>. One of the formulations tested in the present work, combining GDNF and vitamin E, has demonstrated to be effective in RGC rescue for at least eleven weeks after a single intravitreal injection in an animal model of glaucoma<sup>27</sup>. In the field of vascular retinal diseases such as AMD, the triple therapy based on intravitreal administration of anti-VEGF monoclonal antibodies (bevacizumab or ranibizumab) with dexamethasone and verteporfin photodynamic therapy provided visual and anatomy improvement compared with anti-VEGF alone<sup>39</sup>.

Furthermore, recent studies have pointed out the possibility of using neurotrophic factors as anti-angiogenic agents<sup>40-42</sup>. PEDF has demonstrated to inhibit the migration of endothelial cells in a dose-dependent manner and reduce pathological blood vessel formation in the eye<sup>43</sup>. The possibility of using neurotrophic factors as anti-angiogenic agents make them an interesting platform for the treatment of vascular retinal pathologies.

The search for a combination of several active substances in drug delivery systems results very interesting under the therapeutic point of view. To our knowledge, this is the first study demonstrating that GDNF in association with an antioxidant agent (vitamin E) in a novel microsphere delivery system may contribute to the control of angiogenesis. This finding may have therapeutic relevance for chronic diseases in which choroidal neovascularization is present and sustained amounts of active substances are required.

The therapeutic approach proposed in the present work combines two front lines (neuroprotection and anti-angiogenesis) against devastating pathologies as age-related macular degeneration (AMD) and diabetic retinopathy (DR). For these chronic diseases the single intravitreal injection of active substances is not enough<sup>19, 43, 44</sup> and it is patent the need to develop drug delivery systems to

provide drug concentrations in the therapeutic range for extended periods of time<sup>45</sup>. To this, the development of biodegradable microspheres including neurotrophic factors as GDNF and BDNF, which could be injected into the vitreous cavity to treat chronic vascular retinal pathologies, reducing choroidal angiogenesis and simultaneously protecting retinal neurons results of great interest.

However, the microencapsulation of neurotrophic factors jeopardizes their biological activity due to the easy degradation and instability of the proteins<sup>46-48</sup>. For this reason, it is extremely important the employment of an appropriate method to encapsulate these biotechnological products, that maintain the bioactivity during and after microencapsulation process. A successfully approach has been achieved in a previous work carried out by the authors in which a new microencapsulation method based on the S/O/W emulsion solvent evaporation technique was proposed<sup>27</sup>. For this purpose, the neurotrophic factor was incorporated in its solid state in PLGA microspheres. Moreover, vitamin E was also included in the formulation. The inclusion of the protein in its solid state reduces the risk of alteration during manipulation and the addition of Vit E offered additional protection to protein due to its antioxidant nature<sup>49</sup>. The so prepared GDNF/Vit E loaded PLGA microspheres were able to promote the survival of retinal ganglion cells and their axons for at least eleven weeks in a glaucoma animal model (rats)<sup>27</sup>. In the reported work, microspheres loaded with vitamin E alone did not produce survival of RGC (anti-NeuN positive cells).

The microspheres developed in the present experimental work were optimized to obtain spherical particles in the micro-range 20-40  $\mu\text{m}$ , suitable for injection them as an aqueous suspension into the vitreous using standard needles (27-34G) and adequately to control the drugs release during weeks (Fig. 1B). The GDNF and BDNF release profiles from these microspheres were characterized by a high initial burst followed by a sustained release for 84 days in amounts of pg/mg MS (Fig 2 and Table 1). Such small amounts of neurotrophic factors have been demonstrated to be neuroprotective in the retina<sup>27</sup>. However, their potential anti-angiogenic activity has not been tested yet.

Considering that the formulation is going to be in contact with the target tissue for prolonged periods of time, the potential cytotoxicity of the prepared formulations was *in vitro* assayed in the model target cells (HUVECs)<sup>50, 51</sup> as well as retinal cells (ARPE-19)<sup>52</sup>. As expected, none of the formulations tested resulted toxic for these cells, which might guarantee a good tolerance of formulations once administered in the vitreous cavity.

Once assured the good tolerance of the formulations, the anti-angiogenic effect of the compounds including in the formulations (GDNF, BDNF and Vit E) was studied by monitoring the capillary tube formation of endothelial cells on Matrigel. In the final stages of angiogenesis endothelial cells organize in a 2-D network, so these experiments represent a good scenario for evaluating the functional activity of the microspheres. The inhibition of tube formation of HUVECs after incubation in presence of substances under study is considered indicative of the anti-angiogenic activity of the tested formulations<sup>50, 51</sup>. According to the encapsulation efficiency, the amounts of neurotrophic factors included in the microspheres (40 and 80 µg of MS) were 0.58 and 1.15 ng of GDNF for GDNF/Vit E MS and 2.38 and 1.19 ng of GDNF and 0.58 and 1.17 ng of BDNF for GDNF/BDNF/Vit E MS. The amount of Vit E incorporated were 3.48 and 6.96 µg for GDNF/Vit E MSs and 6.40 and 12.80 µg for GDNF/BDNF/Vit E MSs (40 and 80 µg of MS respectively). It was clear that small amounts of neurotrophic factors were able to induce the inhibition on the capillary tube formation in high extent, compared with the BSS control. The cytotoxicity evaluation of these formulations performed in the potential target cells (endothelial cells - HUVEC -) showed that the systems did not interfere in their normal development, so the anti-angiogenic effect observed might be directly related with the formation of blood vessels.

According to the results of tube formation, the inclusion of BDNF in the formulation did not seemed to offer any benefit in terms of anti-angiogenic effect in the experimental condition employed, so its inclusion in the formulation could be questionable. However, at stated above, it is well known that both, neuroprotection and anti-angiogenic activities, are essential to control pathologies such as AMD and DR<sup>40, 43</sup>. As BDNF has demonstrated a

remarkable positive effect as neuroprotector increasing the RGC survival in axotomized rats<sup>32, 53</sup>, the inclusion of this neurotrophic factor in the formulation would result very useful to protect neurons in the retina of AMD patients. Furthermore, as previously mentioned, it has been demonstrated that the combination of GDNF and BDNF enhance their neuroprotective activity<sup>37, 38</sup>.

One exceptional result presented in this work is the inhibition of the angiogenic process in endothelial cells produced by Vit E loaded microspheres (without neurotrophic factors). Although the anti-angiogenic effect of tocopherols is controversial, it has been already demonstrated that  $\alpha$ -tocopherol can reduce the number of capillary tubes in HMEC-1 (immortalized human dermal capillary cells) on Matrigel in a dose-dependent manner<sup>54</sup>. The action mechanism seems to be related with the inhibition of the formation of intracellular oxidants<sup>55</sup>.

In summary, the results presented in this work demonstrate, first, that small amounts of GDNF released from the PLGA microspheres prepared posses anti-angiogenic properties. Secondly, that the inclusion of the neuroprotective agent BDNF did not offer any benefit in terms of anti-angiogenicity, at least, in the experimental conditions tested, and finally, that the combination of Vit E and GDNF has a beneficial effect in the reduction of tube length.

## CONCLUSIONS

In the present study, we have demonstrated that a novel formulation of PLGA microspheres loaded with neurotrophic factors in combination with an antioxidant (vitamin E) inhibits *in vitro* angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) without cytotoxic effects in RPE and HUVEC cell lines. Herein, we suggest that GDNF combined with an antioxidant (vitamin E) may have therapeutic potential in the treatment of CNV in AMD as well as in other retinopathies involving vascular growth.

This therapeutic approach can be used as alternative or complementary to the administration of anti-VEGF agents. Furthermore, the use of controlled delivery systems would allow the maintenance of neurotrophic factors levels for prolonged periods of time reducing the number of intravitreal injections.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for financial support (MAT-2010-18242), UCM Research Group 920415 and RETICS net (RD07/0062/2002). Patricia Checa Casalengua thanks CAM (Spain) by the fellowship granted. Authors are grateful to the technical SEM assistance of the Centro de Microscopía Electrónica Luis Bru (CAI, UCM).

## REFERENCES

1. Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, et al. The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Surv Ophthalmol* 1980;24:335-610.
2. Gass JD. Drusen and disciform macular detachment and degeneration. *Arch Ophthalmol* 1973;90:206-217.
3. Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 2000;184:301-310.
4. Dreyfuss JL, Regatieri CV, Jarrouge TR, Cavalheiro RP, Sampaio LO, Nader HB. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc* 2009;81:409-429.
5. Bressler SB. Introduction: Understanding the role of angiogenesis and antiangiogenic agents in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2009;116:S1-7.
6. Keane PA, Sadda SR. Development of Anti-VEGF Therapies for Intraocular Use: A Guide for Clinicians. *J Ophthalmol* 2012;2012:483034.
7. Rodrigues EB, Farah ME, Maia M, et al. Therapeutic monoclonal antibodies in ophthalmology. *Prog Retin Eye Res* 2009;28:117-144.
8. Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, et al. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors. *PLoS One* 2008;3:e3554.

9. Brar VS, Sharma RK, Murthy RK, Chalam KV. Bevacizumab neutralizes the protective effect of vascular endothelial growth factor on retinal ganglion cells. *Mol Vis* 2010;16:1848-1853.
10. Teeters VW, Bird AC. The development of neovascularization of senile disciform macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1973;76:1-18.
11. Andrieu-Soler C, Aubert-Pouessel A, Doat M, et al. Intravitreal injection of PLGA microspheres encapsulating GDNF promotes the survival of photoreceptors in the rd1/rd1 mouse. *Mol Vis* 2005;11:1002-1011.
12. Garbayo E, Montero-Menei CN, Ansorena E, Lanciego JL, Aymerich MS, Blanco-Prieto MJ. Effective GDNF brain delivery using microspheres--a promising strategy for Parkinson's disease. *J Control Release* 2009;135:119-126.
13. Stahl K, Mylonakou MN, Skare O, Amiry-Moghaddam M, Torp R. Cytoprotective effects of growth factors: BDNF more potent than GDNF in an organotypic culture model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2011;1378:105-118.
14. Harper MM, Grozdanic SD, Blits B, et al. Transplantation of BDNF-secreting mesenchymal stem cells provides neuroprotection in chronically hypertensive rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:4506-4515.
15. Nagahara AH, Tuszynski MH. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:209-219.
16. Pease ME, Zack DJ, Berlinicke C, et al. Effect of CNTF on retinal ganglion cell survival in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2194-2200.
17. Nishikiori N, Osanai M, Chiba H, et al. Glial cell-derived cytokines attenuate the breakdown of vascular integrity in diabetic retinopathy. *Diabetes* 2007;56:1333-1340.
18. Yehoshua Z, Rosenfeld PJ, Alбини TA. Current Clinical Trials in Dry AMD and the Definition of Appropriate Clinical Outcome Measures. *Semin Ophthalmol* 2011;26:167-180.
19. Zarbin MA, Rosenfeld PJ. Pathway-based therapies for age-related macular degeneration: an integrated survey of emerging treatment alternatives. *Retina* 2010;30:1350-1367.

20. Emerson MV, Lauer AK. Current and emerging therapies for the treatment of age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol* 2008;2:377-388.
21. Moritera T, Ogura Y, Honda Y, Wada R, Hyon SH, Ikada Y. Microspheres of biodegradable polymers as a drug-delivery system in the vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:1785-1790.
22. Herrero-Vanrell R, Refojo MF. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;52:5-16.
23. Kuno N, Fujii S. Biodegradable intraocular therapies for retinal disorders: progress to date. *Drugs Aging* 2010;27:117-134.
24. Jager RD, Aiello LP, Patel SC, Cunningham ET, Jr. Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. *Retina* 2004;24:676-698.
25. Giordano GG, Chevez-Barrios P, Refojo MF, Garcia CA. Biodegradation and tissue reaction to intravitreal biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic)acid microspheres. *Curr Eye Res* 1995;14:761-768.
26. Veloso AA, Jr., Zhu Q, Herrero-Vanrell R, Refojo MF. Ganciclovir-loaded polymer microspheres in rabbit eyes inoculated with human cytomegalovirus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:665-675.
27. Checa-Casalengua P, Jiang C, Bravo-Osuna I, et al. Retinal ganglion cells survival in a glaucoma model by GDNF/Vit E PLGA microspheres prepared according to a novel microencapsulation procedure. *J Control Release* 2011;156:92-100.
28. Al Haushey L, Bolzinger MA, Bordes C, Gauvrit JY, Briancon S. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. *Int J Pharm* 2007;344:16-25.
29. European Guideline 3AQ4a. The use of ionising radiation in the manufacture of medicinal products. *Official Publications in the European Communities, London* 1992.
30. Staton CA, Reed MW, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol* 2009;90:195-221.
31. Swanson KI, Schlieve CR, Lieven CJ, Levin LA. Neuroprotective effect of sulfhydryl reduction in a rat optic nerve crush model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3737-3741.

32. Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:489-500.
33. Koeberle PD, Ball AK. Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy. *Vision Res* 1998;38:1505-1515.
34. Carwile ME, Culbert RB, Sturdivant RL, Kraft TW. Rod outer segment maintenance is enhanced in the presence of bFGF, CNTF and GDNF. *Exp Eye Res* 1998;66:791-805.
35. Frasson M, Picaud S, Leveillard T, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2724-2734.
36. Politi LE, Rotstein NP, Carri NG. Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: additive protection with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:3008-3015.
37. Yan Q, Wang J, Matheson CR, Urich JL. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurobiol* 1999;38:382-390.
38. Koeberle PD, Ball AK. Neurturin enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo: combined effects with glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 2002;110:555-567.
39. Forte R, Bonavolonta P, Benayoun Y, Adenis JP, Robert PY. Intravitreal ranibizumab and bevacizumab in combination with full-fluence verteporfin therapy and dexamethasone for exudative age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res* 2011;45:129-134.
40. Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res* 2004;23:561-577.
41. Haribalaganesh R, Sheikpranbabu S, Banumathi E, Gurunathan S. Pigment epithelium-derived factor inhibits erythropoietin-induced retinal

endothelial cell angiogenesis by suppression of PI3K/Akt pathway. *Exp Eye Res* 2010;90:726-733.

42. Fan W, Crawford R, Xiao Y. The ratio of VEGF/PEDF expression in bone marrow mesenchymal stem cells regulates neovascularization. *Differentiation* 2011;81:181-191.

43. Tombran-Tink J. PEDF in angiogenic eye diseases. *Curr Mol Med* 2010;10:267-278.

44. Fontaine O, Olivier S, Descovich D, Cordahi G, Vaucher E, Lesk MR. The effect of intravitreal injection of bevacizumab on retinal circulation in patients with neovascular macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:7400-7405.

45. Jin J, Zhou KK, Park K, et al. Anti-inflammatory and antiangiogenic effects of nanoparticle-mediated delivery of a natural angiogenic inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:6230-6237.

46. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release* 2003;90:261-280.

47. Pisal DS, Kosloski MP, Balu-Iyer SV. Delivery of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 2010;99:2557-2575.

48. Jiskoot W, Randolph TW, Volkin DB, et al. Protein instability and immunogenicity: roadblocks to clinical application of injectable protein delivery systems for sustained release. *J Pharm Sci* 2012;101:946-954.

49. Engin KN. Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Mol Vis* 2009;15:855-860.

50. Sheu SJ, Bee YS, Ma YL, et al. Inhibition of choroidal neovascularization by topical application of angiogenesis inhibitor vasostatin. *Mol Vis* 2009;15:1897-1905.

51. Kim JH, Yu YS, Jun HO, Kwon HJ, Park KH, Kim KW. Inhibition of choroidal neovascularization by homoisoflavanone, a new angiogenesis inhibitor. *Mol Vis* 2008;14:556-561.

52. Bejjani RA, BenEzra D, Cohen H, et al. Nanoparticles for gene delivery to retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis* 2005;11:124-132.

53. Klocker N, Cellerino A, Bahr M. Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of brain-derived

neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells In vivo. *J Neurosci* 1998;18:1038-1046.

54. Wells SR, Jennings MH, Rome C, Hadjivassiliou V, Papas KA, Alexander JS. Alpha-, gamma- and delta-tocopherols reduce inflammatory angiogenesis in human microvascular endothelial cells. *J Nutr Biochem* 2010;21:589-597.

55. Navarra T, Del Turco S, Papa A, Battaglia D, Lazzerini G, Basta G. Lack of effect of alpha-tocopherol on in vitro angiogenesis. *Microvasc Res* 2006;72:12-19.

**4.4 Vitamin E effect as coadjuvant in protein microencapsulation for intravitreal administration.**

*Note*

P. Checa-Casalengua, C.G. García-Caballero, I.T. Molina-Martínez, R. Herrero-Vanrell, I. Bravo-Osuna.

Enviado a European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.



## **ABSTRACT**

The purpose of this work was to evaluate the effect of the presence of an oily additive ( $\alpha$ -tocopherol acetate) on the encapsulation and in vitro release behaviour of a model protein (GDNF glial cell line-derived neurotrophic factor) encapsulated in PLGA [poly (lactic-co-glycolic acid)] microspheres fabricated via solid-in-oil-in-water (S/O/W) solvent emulsion evaporation method. To this, six formulations elaborated with different amounts of GDNF and  $\alpha$ -tocopherol acetate (Vit E) were prepared. The morphology of microspheres, the mean particle size, the encapsulation efficacy, the protein release profile and the distribution into the spheres of both compounds, the protein and the oily additive, were analyzed. The data obtained demonstrated that the inclusion of Vit E in the inner phase during the preparation of PLGA microspheres increased the protein entrapped, reduced the initial burst of GDNF and was useful in the modulation of neurotrophic factor release.

**KEYWORDS:** Microencapsulation, PLGA, protein delivery,  $\alpha$ -tocopherol acetate, glial cell line-derived neurotrophic factor.

## INTRODUCTION

Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) is a proteic factor that has demonstrated a neuroprotective effect for retinal ganglion cell (RGC) promoting the survival of axotomized cells after intravitreal injection<sup>1</sup>. However, the applicability of this neuroprotective therapy is totally linked to the development of effective administration forms able to supply therapeutic concentrations at neuronal level for an extended period of time. In fact, several authors are currently working on the development of biodegradable microsystems loaded with GDNF for intravitreal application<sup>2-4</sup>. In a previous work, we recently developed a microencapsulation method of GDNF in PLGA microspheres using a S/O/W solvent emulsion evaporation method modified by the inclusion of an oily additive (vitamin E) in the O-phase. This system allowed the *in vitro* release of the protein in its bioactive form up to 19 weeks. This formulation was intravitreally administered in an animal model of glaucoma (rats), resulting effective in the protection of RGC for at least three months, even when low amounts of GDNF were released<sup>5</sup>.

Alpha-tocopherol (Vit E), possess very interesting properties to be included in intravitreal formulations destined to treat neurodegenerative chronic diseases. From a pharmacological point of view, vitamin E has antioxidative effects<sup>6</sup>, so it could offer additional benefit in the treatment of neurodegenerative diseases, since it is well known that neurons death is associated to massive release of oxidative molecules that can damage healthy neurons in the proximity. Additionally, it has been proposed that vitamin E can also develop antiproliferative behaviour<sup>7</sup>, which could supply additional benefit in the reduction of side effects typically linked to repeated intravitreal injections. From a technological point of view, it has been determined that the presence of this oily additive in PLGA microspheres loaded with GDNF can protect the protein from degradation during sterilization by gamma irradiation, thanks to its antioxidant nature<sup>8</sup>. The aim of the present work is to explore a fourth suggested benefit of the inclusion of vitamin E; the modulation of protein encapsulation and release from microspheres due to its oily nature. In our research group we have already demonstrated that the inclusion of this oily

additive in PLGA microspheres can modulate the drug release of low molecular weight drugs<sup>9</sup>. However, to our best knowledge, the effect of the presence of vitamin E on the encapsulation and distribution of proteins within the PLGA matrix and hence on the posterior release has not been studied yet. With this aim, this experimental work has been conceived to evaluate the effect of the presence of different amounts of vitamin E on the microencapsulation and *in vitro* release of GDNF. Several parameters have been evaluated and compared, such as the morphology of microspheres and the distribution into the microspheres of both, the protein and the oily additive, the protein encapsulation efficacy and its release profile,. As the final objective is to administrate the microspheres into the vitreous cavity, both an adequate particle size for being injected as a conventional suspension and a sustained controlled release of GDNF for an extended period of time were researched.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **MATERIALS**

Recombinant Human GDNF and the ELISA (enzymo-linked immunosorbant assay) kit for GDNF quantification were supplied by R&D Systems (Minneapolis, MN USA). Poly-(D,L-lactide-co-glycolide) PLGA ratio 50:50 (Resomer®503) was purchased from Boehringer Ingelheim (Pharma Co., Germany). Polyvinyl alcohol 72,000 g/mol (PVA) was obtained by Merck KGaA (Darmstadt, Germany). N-(tetramethylrhodamine-6-thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (TRITC-DHPE) was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).  $\alpha$ -tocopherol acetate (Vit E), bovine serum albumin (BSA), Nile red and albumin human fluorescein isothiocyanate (HSA-FITC) were obtained from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany).

## METHODS

### ***Microspheres elaboration***

GDNF-loaded PLGA microspheres were prepared using a S/O/W emulsion-solvent evaporation technique. Briefly, 10-50 µg of recombinant human GDNF was suspended in 0-40 µl of Vit E via gentle sonication at low temperature (Sonicator XL, Head Systems, Iowa, USA) for 30 sec in order to reduce the risk of protein alteration. This suspension was mixed with 1 ml of PLGA solution in methylene chloride (20% w/v). The so-prepared organic phase was emulsified with 5 ml of PVA MilliQ<sup>®</sup> water solution (2% w/v). Emulsification was performed in a homogenizer (Polytron<sup>®</sup> RECO, Kinematica GmbH PT 3000, Lucerna, Switzerland) at 5,000 rpm for 1 min. This emulsion was subsequently poured onto 100 ml of an aqueous PVA solution (0.1%) and kept under constant stirring for 3 hours, to allow organic solvent evaporation. Once formed, microspheres were washed with MilliQ<sup>®</sup> water to eliminate the PVA and separated according to their particle size by filtration under vacuum conditions. Particles were rapidly frozen (methanol/ice mixture) and freeze-dried to obtain a free flowing microspheres powder. Microspheres were kept at -20 °C under dry conditions until use.

### ***Microspheres characterization***

The ***Production yield percentage (PY%)*** of each batch was calculated.

***Mean particle size and particle size distribution*** were measured by light scattering in a Microtrac<sup>®</sup> S3500 Series Particle Size Analyzer (Montgomeryville, PA, USA). Samples were prepared by suspending the microspheres in MilliQ<sup>®</sup> water. The data were presented as mean volume diameter ± SD of three independent measurements.

**Morphological evaluation.** The external morphology of microspheres was evaluated by scanning electron microscopy (SEM; Jeol, JSM-6335F, Tokyo, Japan). Samples were gold sputter-coated prior to observation.

**Inner structure of microspheres.** PLGA microspheres were elaborated according to the previously described method, including 20  $\mu$ l of Nile red (4 mg/ml) in the o-phase by physically mixing. This fluorescent marker has been already used to label PLGA<sup>10</sup>. The inner structure of the spheres was observed by confocal microscopy (Leica TCS SP2, Leica Microsystems Heidelberg GmbH).

**Protein and additive distribution:** The protein and additive distribution within microspheres was achieved by confocal microscopy. Briefly, a model labelled-protein (HSA-FITC) was encapsulated in the same conditions described for GDNF. Combinations of the additive (Vit E) with small proportions (12-24  $\mu$ l) of fluorescently lipid dye (TRITC-DHPE, 0.5 mg/ml in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) were also included in the O-phase<sup>5</sup>.

Samples of these formulations were placed in release media for 24 hours, in a shaker with a constant agitation speed of 100 rpm (Clifton Shaking Bath NE5, Nikel Electro Ltd Avon United Kingdom) at 37°C. After that, the microsphere suspensions were gently centrifuged (490 g for 3 min) and particles were recovered and freeze-dried. Once prepared, microsphere samples (at time 0 and 24h after release) were observed by confocal microscopy (Leica TCS SP2, Leica Microsystems Heidelberg GmbH).

**In vitro release studies:** Replicates of 5 mg of GDNF loaded microspheres of each batch were suspended in 1.5 ml of PBS pH 7.4 isotonized with NaCl. "Low binding" Eppendorf<sup>®</sup> vials were used in all cases. Samples were placed in a shaker with a constant agitation speed of 100 rpm (Clifton Shaking Bath NE5, Nikel Electro Ltd Avon United Kingdom) at 37°C. At pre-set times (1h, 24h and once a week until the end of the assay) the microsphere suspensions were gently centrifuged (490 g for 3 min) and the supernatant was recovered (approximately 1.5 ml) and replaced by the same volume of fresh medium, for

continuation of the release test. Aliquots from supernatant were diluted with the diluent reactive provided in the ELISA kit (DY995 R&D System) to obtain a protein concentration in the suitable range (15-1,000 pg/ml) to be quantified by the ELISA technique.

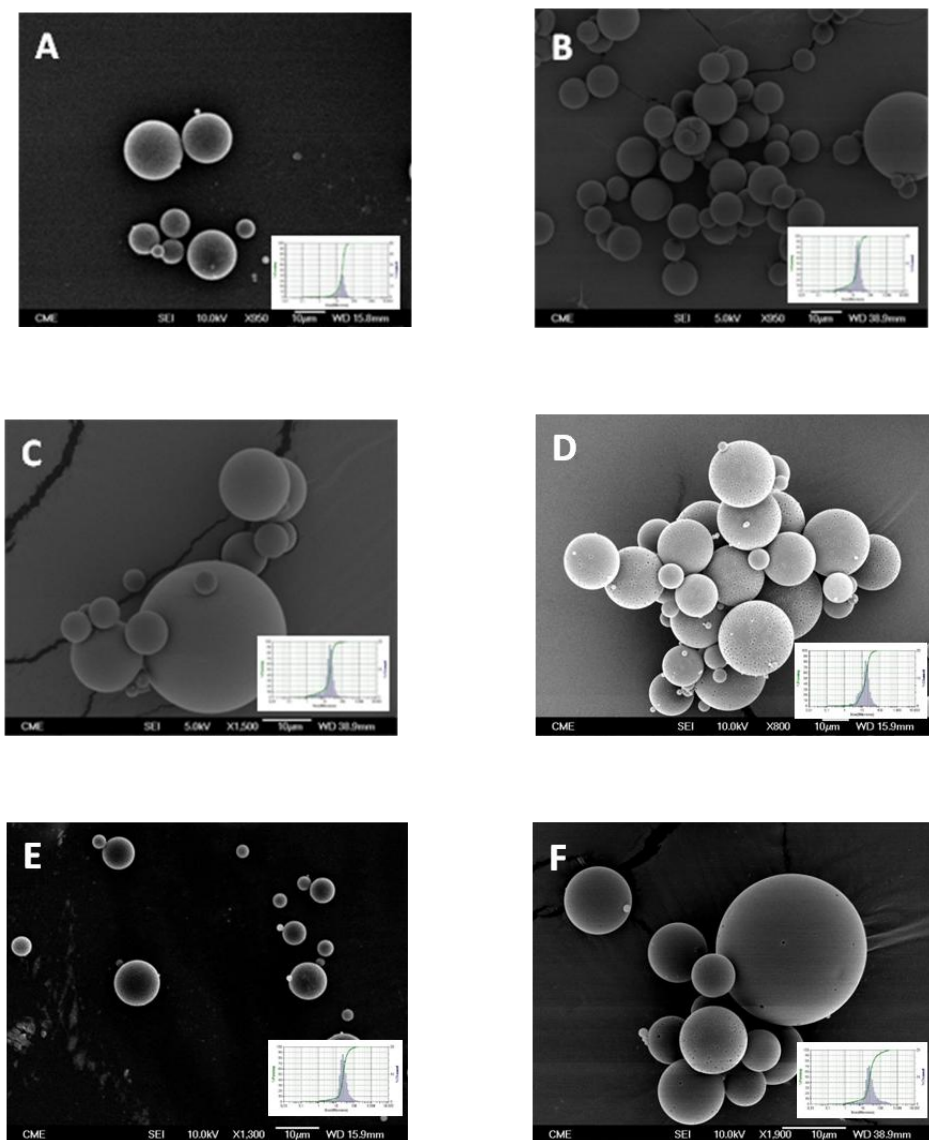
## RESULTS AND DISCUSSION

Biodegradable microparticulate systems, capable of controlling drug release, are becoming a very interesting alternative in the development of intravitreal formulations. These systems can be administered in suspensions as a conventional injection, without surgery<sup>11</sup>. Furthermore, as they can control the active substance release for months, the number of applications per year resulted considerably reduced. The method used for the microencapsulation of GDNF was optimized to obtain a particle size range suitable for injection as suspension through the needles typically used for intravitreal administration (27-32G).

Table 1 shows a summary of formulation content. It also compiles results of microspheres characterization. In all cases, the mean particles size was around 20 µm. All formulations showed spherical particles (Fig. 1).

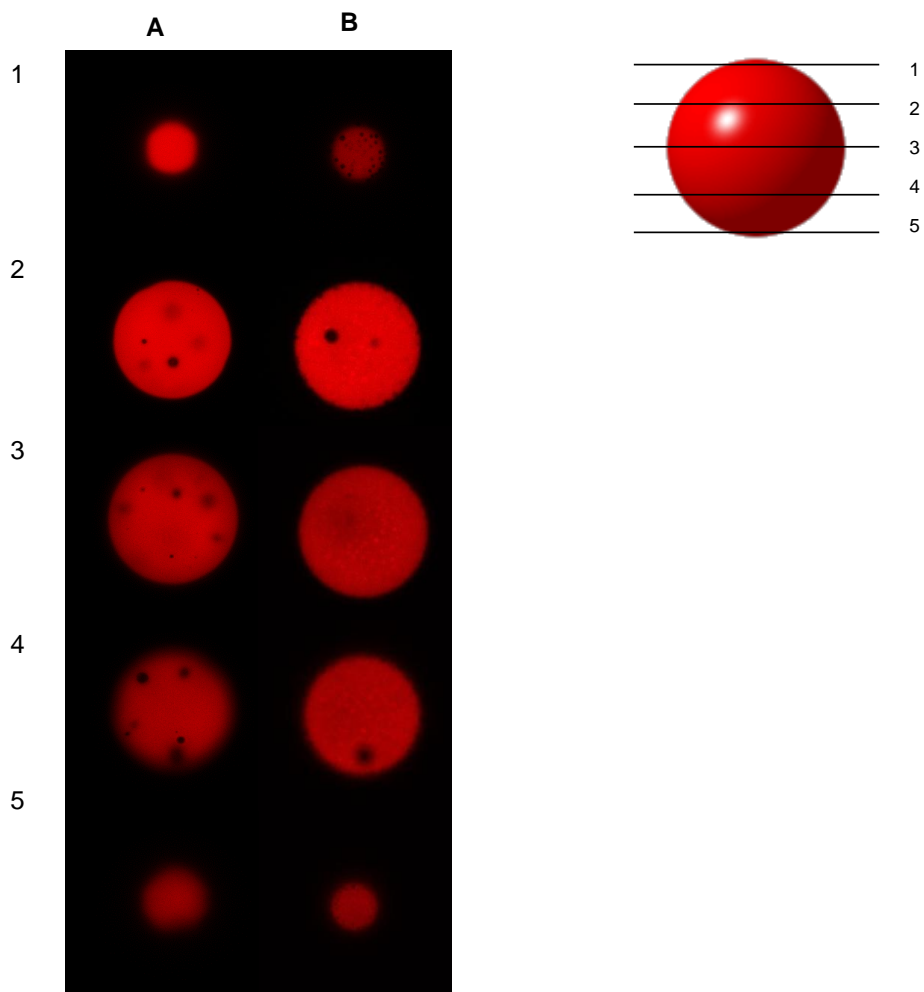
Formulation	µg GDNF	µl Vit E	Production yield (%)	Mean particle size (µm)
<b>A</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	73.6	18.3 ± 0.2
<b>B</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	73.3	21.7 ± 0.3
<b>C</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	75.2	20.1 ± 0.3
<b>D</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	71.7	22.2 ± 1.0
<b>E</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	82.9	24.9 ± 0.3
<b>F</b>	<b>50</b>	<b>40</b>	78.8	24.6 ± 0.4

**Table 1:** Formulations composition, production yields and means particle size (n= 3) for each formulation (A-F).



**Fig. 1:** SEM images of different GDNF-loaded microparticles: formulation A (10 μg GDNF, 0 μl Vit E); formulation B (10 μg GDNF, 20 μl Vit E); formulation C (20 μg GDNF, 0 μl Vit E); formulation D (20 μg GDNF, 20 μl Vit E); formulation E (20 μg GDNF, 40 μl Vit E) and formulation F (50 μg GDNF, 40 μl Vit E). One example of particle size distribution is added for each formulation.

Microspheres elaborated without additive showed a non-porous surface (Formulations A and C). On the contrary, a high amount of small pores in addition to some big pores were observed on the particle surfaces prepared when Vit E was included in the inner phase of the emulsion (Formulations B, D, E and F). The inner structure of microparticles was evaluated by confocal microscopy by including in the formulation a fluorescent marker with high affinity for PLGA<sup>10</sup>. According to figure 2, microparticles exhibit a matrix system, typical of PLGA microparticles elaborated by emulsion solvent extraction-evaporation process. Although SEM pictures did not reveal any porous on the surface of microparticles prepared without vitamin E, the confocal images showed some big porous across the matrix. When vitamin E was included in the formulation a big amount of small porous appeared close to the surface. According to figure 2, these small porous do not cross the entire matrix but are exclusively located close to the surface.

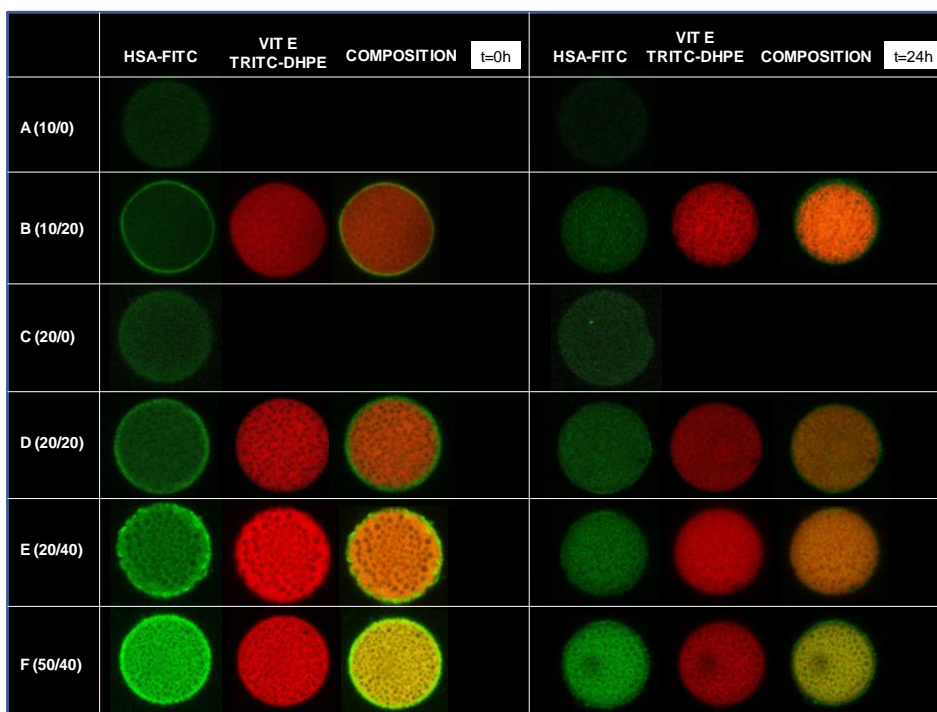


**Fig. 2:** Confocal microscopy images of Nile red for labeled PLGA microspheres: **(A)** blank microspheres and **(B)** microspheres elaborated with 20 µg of HSA and 20 µl of Vit E. Images represent five cuts in different sections through microspheres.

During the formation of microparticles by the solvent evaporation technique, droplets of the organic inner phase are suspended in the external aqueous phase and the organic solvent is being progressively eliminated causing polymer precipitation and by hence entrapment of the active substances

inside<sup>12</sup>. The presence of an oily component in the inner phase would influence the diffusion of the organic solvent, and hence the internal matrix structure. According to the results presented in this work, the inclusion of vitamin E in the PLGA matrix provoked the formation of small surface porous. This phenomena could be explained considering that the presence of Vit E on the droplets could promote a slowly evacuation of the organic solvent which might form then small pores on the microsphere surface.

The distribution of the fluorescently marked protein and the oily additive is presented for the six formulations in figure 3. The presence of the oily additive in the inner phase might modify the distribution of the active substance in the final solid microsphere. Unfortunately, to our knowledge, it does not exist GDNF fluorescently labelled commercially available. That is why fluorescently marked HSA was used in this work. However, the method presented in this work is intended for any protein of interest while it is in its solid state during the microencapsulation procedure, so it can be assumed that despite of the different molecular weight a similar behaviour can be expected for GDNF and HAS if both proteins are in solid state<sup>5</sup>. The oily additive resulted homogeneously distributed on the polymeric matrix, although more density seems to appear close to the particles surface. In the case of protein, a homogenous distribution at  $t = 0$  was observed when microparticles were prepared in absence of vit E (Formulations A and C). However, when the oily additive was included in the formulation, zones of more intense fluorescence were clearly observed on the proximity of particle's surface. Comparing formulations prepared with different amounts of vitamin E (Formulations D and E), it can be observed that the higher the amount of vitamin included, the higher the intensity and thickness of the fluorescent ring. An increment in the amount of protein during the microparticle's preparation (Formulations E and F) led to a more density in fluorescence and a more definition in the protein halo close to the particles' surface. After 24h of release, microparticles prepared without vitamin E resulted less fluorescents than particles prepared with the same amount of protein but including vit E. The protein ring was scarcely visible in formulations D, E and F.



**Fig. 3:** Confocal microscopy images of fluorescently marked protein (HSA-FITC) and the oily additive (Vit E-TRITC-DHPE) distribution into the microspheres for the six formulations elaborated (A-F) at time 0 and 24 hours after release. Composition with both compounds is also included.

GDNF release profiles obtained for the different formulations showed the typical triphasic shape well described in literature<sup>13</sup>. In all cases, formulations were able to release GDNF for months, *condicio-sine-qua-non* to be useful in the treatment of chronic diseases in the back of the eye. Loaded active substances are progressively released from PLGA matrixes thanks to the homogeneous erosion underwent by the polymeric matrix in the release media<sup>14</sup>. In this condition, the distribution of the active compound and the presence of hydrophobic compounds on the matrix might modify the release profile.

### ***Influence of vit E on GDNF encapsulation and release***

GDNF loading in all cases was lower than expected, probably due to the loss of protein in the interphase during microspheres maturation. Comparing values obtained for formulations A (10 µg GDNF/0 µl Vit E) and B (10 µg GDNF/20 µl Vit E), it can be observed that the inclusion of 20 µl of the additive (Vit E) increased the percentage of encapsulated protein. This increment in GDNF encapsulation was also observed contrasting the protein loading values obtained for formulation C (20 µg GDNF/0 µl Vit E) and D (20 µg GDNF/20 µl Vit E). The presence of vitamin E in the droplet might reduce the protein mobility and hence increasing the protein entrapment during the microsphere hardening. This fact would explain the presence of a high density of protein forming a ring close to the surface of microparticles according to figure 3.

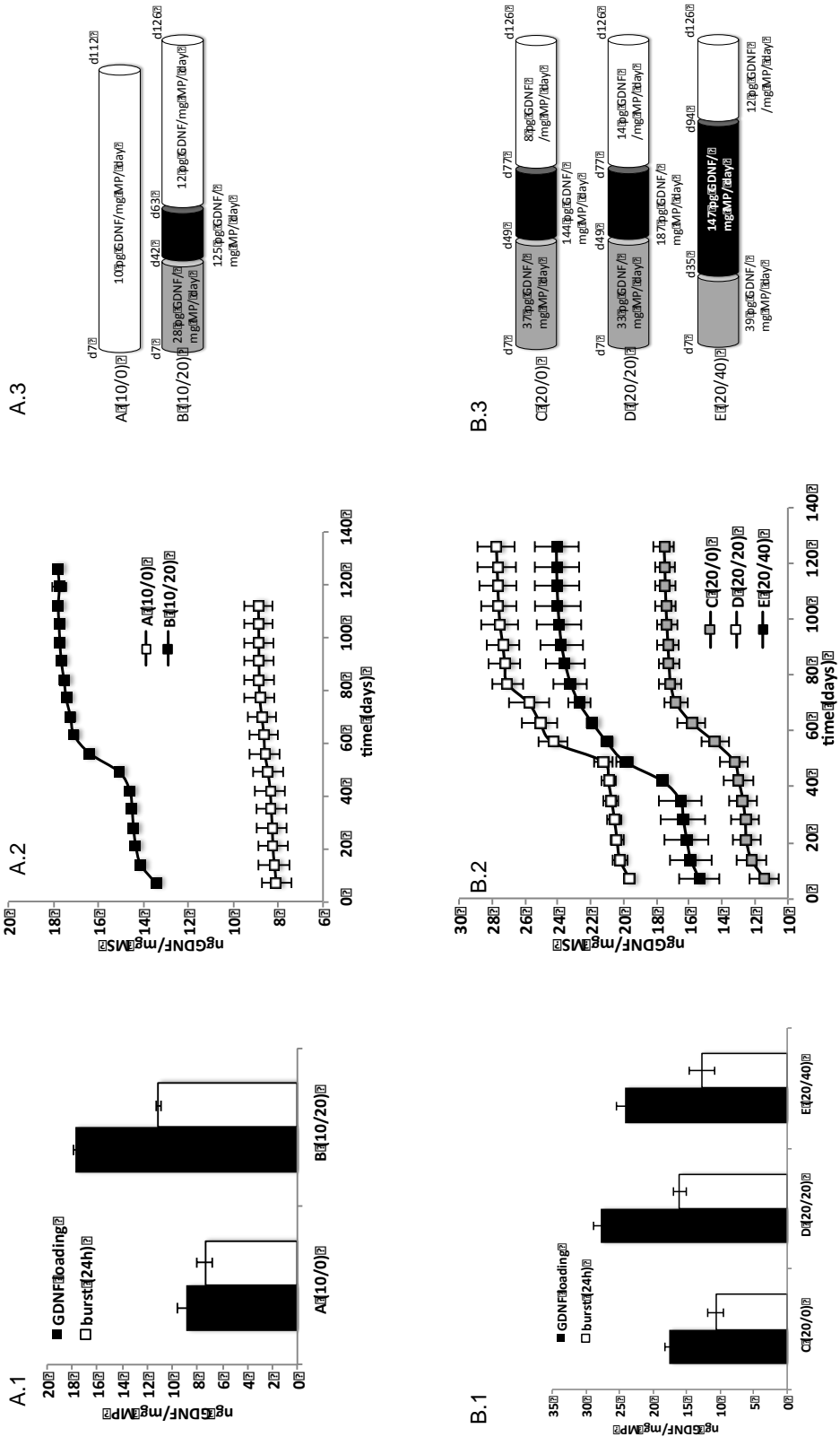
As shown in Fig. 4A and 4B, the presence of the oily additive (Vit E) affected not only the GDNF encapsulation percentage but also seems to influence the release profiles obtained. Firstly, the presence of vitamin E reduced the percentage of protein rapidly released from the microparticles. According to confocal images, the protein released in the first 24 hours for microparticles containing vitamin E was located in the ring close to the microparticles' surface. The reduction in this burst effect promoted by the inclusion of Vit E could be related with the difficulty of the release media to diffuse through the matrix pores, increasing the time needed for proteins to dissolve and diffuse from the polymer in presence of the oily additive.

The influence of the vit E on GDNF *in vitro* release was evaluated by comparing formulations prepared with the same amount of protein and different amounts of the oily additive. The GDNF release data of these formulations (A + B) and (C + D + E) are presented in Figs. 4A and 4B. After the initial burst (62.4 % formulation B, 60.5 % formulation C, 57.7% formulation D and 52.7% formulation E) a sustained triphasic release was observed for formulations B-E. According to figures 4.A.2, 4.A.3, 4.B.2 and 4.B.3, a first phase of slow release rate (28-39 pg GDNF/mg MP/day) was followed by a relatively rapid release rate phase II (125-187 pg GDNF/mg MP/day). Finally, the small amount of

remaining protein was steadily released (8-14 pg GDNF/mg MP/day) until the end of the assay. For formulation A (initial burst 83.4%), this triphasic form was not evident. For this formulation, the low amount of encapsulated protein was continuously released at a release rate coincident with the third phase. For better understanding, these values have been graphically represented in bars (Fig. 4A3 and 4B3).

The main influence of Vit E on the GDNF release rate was observed on the duration of the relatively rapid second phase. While for formulation C (20 µg GDNF/0 µl Vit E) and D (20 µg GDNF/20 µl Vit E) the second phase was observed at day 49 and lasted for 28 days. In the case of formulation E, prepared with more amount of oily additive (20 µg GDNF/40 µl Vit E), the second phase began earlier, at day 35, and was maintained for 59 days.

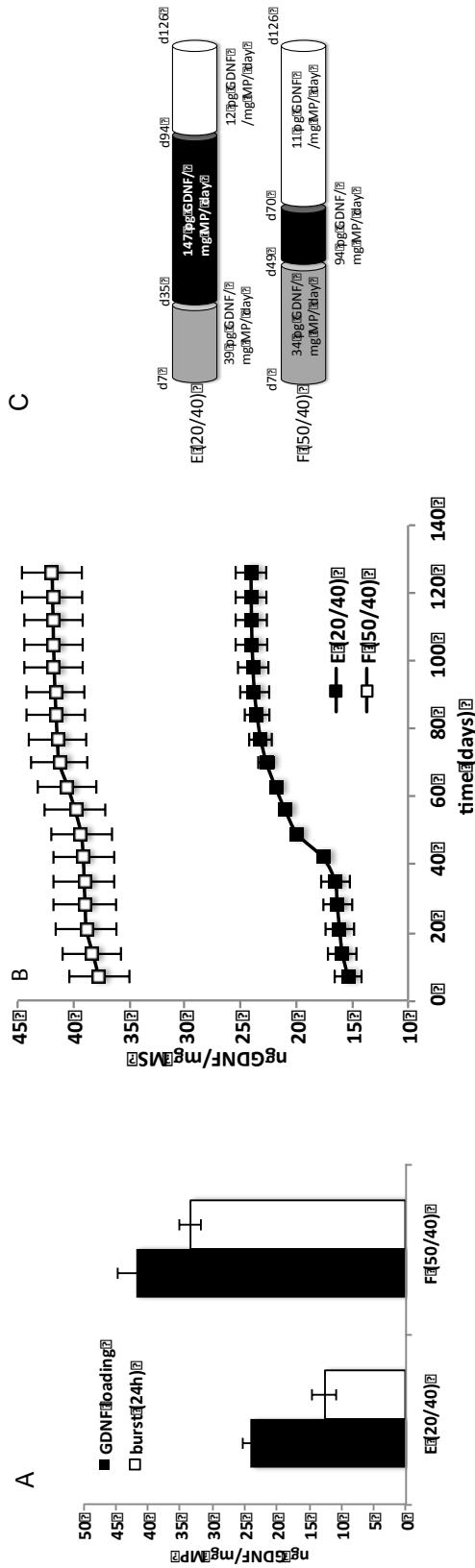
The results of formulation D is in agreement with previous, in which it was demonstrated that PLGA microparticles prepared including 20 µl of Vit E in the formulation, lost their shape and collapse between weeks 6 and 8 of the release assay, promoting an increment in the release rate<sup>5</sup>. On that basis, it can be argued that the inclusion in the formulation of more amount of oily additive would induce a faster collapse of the matrix structure and then a more rapid appearance of the second phase. This hypothesis might explain the behaviour observed for formulation E.



**Fig. 4:** **(A1)** GDNF loading (■) and GDNF released in the first 24 hours of release test (□) for formulation A (10 µg GDNF, 0 µl Vit E) and formulation B (10 µg GDNF, 20 µl Vit E); **(A2)** Cumulative amount of GDNF released from formulation A (10 µg GDNF, 0 µl Vit E) (■) and formulation B (10 µg GDNF, 20 µl Vit E) (□). Release media: PBS (pH 7.4) with 1.0% BSA; **(A3)** Schematic representation of the release rate for formulation A (10 µg GDNF, 0 µl Vit E) and formulation B (10 µg GDNF, 20 µl Vit E); **(B1)** GDNF loading (■) and GDNF released in the first 24 hours of release test (□) for formulation C (20 µg GDNF, 0 µl Vit E), formulation D (20 µg GDNF, 20 µl Vit E) and formulation E (20 µg GDNF, 40 µl Vit E); **(B2)** Cumulative amount of GDNF released from formulation C (20 µg GDNF, 0 µl Vit E) (■), formulation D (20 µg GDNF, 20 µl Vit E) (□) and formulation E (20 µg GDNF, 40 µl Vit E) (■). Release media: PBS (pH 7.4) with 1.0% BSA; **(B3)** Schematic representation of the release rate for formulation C (20 µg GDNF, 0 µl Vit E), formulation D (20 µg GDNF, 20 µl Vit E) and formulation E (20 µg GDNF, 40 µl Vit E).

#### ***Effect of the initial amounts of GDNF on its encapsulation and release***

As the final objective is to administrate the microspheres into the vitreous cavity, attempts were made to try to increase the protein loading on the PLGA microspheres. To this, formulation F including a high amount of GDNF (50 µg GDNF/40 µl Vit E) was elaborated. According to the results offered in this work, effectively, the inclusion of more amount of protein during the microparticles preparation led to a higher protein loading but most of the encapsulated protein was released in the first 24 hours (79.7%) (Fig. 5A). After that, the release profile was quite similar to those observed for microspheres prepared with less amount of GDNF and the same amount of Vit E (Formulation E, 20 µg GDNF/40 µl Vit E) (Figs. 5B and 5C).



**Fig. 5:** (A) GDNF loading (■) and GDNF released in the first 24 hours of release test (□) for formulation E (20 µg GDNF, 40 µl Vit E) and formulation F (50 µg GDNF, 40 µl Vit E); (B) Cumulative amount of GDNF released from formulation E (20 µg GDNF, 40 µl Vit E) (■) and formulation F (50 µg GDNF, 40 µl Vit E) (□). Release media: PBS (pH 7.4) with 1.0% BSA; (C) Schematic representation of the release rate for formulation E (20 µg GDNF, 40 µl Vit E) and formulation F (50 µg GDNF, 40 µl Vit E).

## CONCLUSIONS

The inclusion of an oily additive (vit E) in the inner phase during the microencapsulation of proteins in PLGA matrixes using the S/O/W emulsion solvent extraction-evaporation method promoted: (i) An increment in the protein loading, which appears mainly located forming a ring close to the particle surface; (ii) A reduction in the amount of protein rapidly released in the first 24 hours of the *in vitro* release assay and (iii) A modification of the release rate with more prolonged periods of relatively rapid release of protein from the PLGA matrix.

The inclusion of a higher amount of GDNF in the formulation increases protein loading and also the burst effect.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for financial support (MAT-2010-18242), UCM Research Group 920415 and RETICS net (RD07/0062/2002). Patricia Checa Casalengua and Cristina García Caballero thanks CAM (Spain) and FPI (MICIIN) BES-2011-048614 respectively by the fellowships granted. Authors are grateful to the technical SEM and confocal microscopy assistance of the Centro de Microscopía Electrónica Luis Bru (CAI, UCM).

## REFERENCES

1. Klocker N, Braunling F, Isenmann S, Bahr M. In vivo neurotrophic effects of GDNF on axotomized retinal ganglion cells. *Neuroreport* 1997;8:3439-3442.
2. Andrieu-Soler C, Aubert-Pouessel A, Doat M, et al. Intravitreal injection of PLGA microspheres encapsulating GDNF promotes the survival of photoreceptors in the rd1/rd1 mouse. *Mol Vis* 2005;11:1002-1011.

3. Ward MS, Khoobehi A, Lavik EB, Langer R, Young MJ. Neuroprotection of retinal ganglion cells in DBA/2J mice with GDNF-loaded biodegradable microspheres. *J Pharm Sci* 2007;96:558-568.
4. Jiang C, Moore MJ, Zhang X, Klassen H, Langer R, Young M. Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma. *Mol Vis* 2007;13:1783-1792.
5. Checa-Casalengua P, Jiang C, Bravo-Osuna I, et al. Retinal ganglion cells survival in a glaucoma model by GDNF/Vit E PLGA microspheres prepared according to a novel microencapsulation procedure. *J Control Release* 2011;156:92-100.
6. Engin KN, Yemisci B, Yigit U, Agachan A, Coskun C. Variability of serum oxidative stress biomarkers relative to biochemical data and clinical parameters of glaucoma patients. *Mol Vis* 2010;16:1260-1271.
7. Larrosa JM, Veloso AA, Jr., Leong FL, Refojo MF. Antiproliferative effect of intravitreal alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl-acid-succinate in a rabbit model of PVR. *Curr Eye Res* 1997;16:1030-1035.
8. Checa-Casalengua P, Jiang C, Bravo-Osuna I, et al. Preservation of biological activity of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) after microencapsulation and sterilization by gamma irradiation. *Submitted to International Journal of Pharmaceutics* 2012.
9. Martinez-Sancho C, Herrero-Vanrell R, Negro S. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of aciclovir: influence of fatty and non-fatty additives. *J Microencapsul* 2003;20:799-810.
10. Xu P, Gullotti E, Tong L, et al. Intracellular drug delivery by poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, revisited. *Mol Pharm* 2009;6:190-201.
11. Herrero-Vanrell R, Refojo MF. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;52:5-16.
12. Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, Krenzlin S, Siepmann J. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *Int J Pharm* 2006;314:198-206.
13. Morita T, Sakamura Y, Horikiri Y, Suzuki T, Yoshino H. Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant. *J Control Release* 2000;69:435-444.

14. Heller J. Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers. *Biomaterials* 1980;1:51-57.



**4.5 Robust cell integration from co-transplantation of biodegradable MMP2-PLGA microspheres with retinal progenitor cells.**

Jing Yao, Budd A. Tucker, Xinmei Zhang, Patricia Checa-Casalengua, Rocío Herrero-Vanrell, Michael J. Young.

Biomaterials 2011;32(4):1041-50



## ABSTRACT

The failure of the adult mammalian retina to regenerate can be partly attributed to the barrier formed by inhibitory extracellular matrix (ECM) and cell adhesion molecules, such as CD44 and neurocan, after degeneration. These molecules act to separate a sub-retinal graft from integrating into the host retina. It has been shown that matrix metalloproteinase 2 (MMP2) can promote host-donor integration by degrading these molecules. In order to enhance cellular integration and promote retinal repopulation, we co-transplanted biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres that have the ability to deliver active MMP2 with retinal progenitor cells (RPCs) to the sub-retinal space of adult retinal degenerative Rho-/-mice. Following delivery, significant degradation of CD44 and neurocan at the outer surface of the degenerative retina without disruption of the host retinal architecture was observed. Coincident with this, we observed a significant increase in the number of cells migrating beyond the barrier into the degenerative retina. No changes in the differentiation characteristics of RPCs were observed. Cells in the outer nuclear layer (ONL) could express the mature photoreceptor markers recoverin, make contacts with residual protein kinase C (PKC)-positive cells and express the ribbon synapse protein bassoon. Thus, co-transplantation of MMP2-PLGA microspheres with RPCs provides controlled release of active MMP2 to the site of retinal degeneration, stimulating inhibitory barrier removal and enhancing cell integration. This suggests a practical and effective strategy for retinal repair.

**KEYWORDS:** Progenitor cell, metalloproteinase, microsphere, drug delivery, retina

## INTRODUCTION

Age-related macular degeneration (AMD) and retinitis pigmentosa (RP) are two causes of irreversible blindness in which photoreceptor loss occurs. As the inner retinal circuitry remains intact until advanced stages of retinal degeneration, cell transplantation is one of the most feasible strategies of retinal repair. It has been shown that RPCs have the ability to migrate into and integrate with the host retina to form new connections and generate functional photoreceptors following transplantation into degenerative retina [1-3]. However, very low numbers of grafted cells are able to integrate into the ONL and differentiate into new photoreceptors. This is in part due to the barrier formed by inhibitory ECM and cell adhesion molecules associated with reactive gliosis after degeneration or injury.

CD44 and Neurocan are two inhibitory ECM and cell adhesion molecules. CD44, a hyaluronan-binding glycoprotein, and neurocan, a chondroitin sulfate proteoglycan, have been shown to inhibit cellular migration and neurite outgrowth in a variety of central nervous system (CNS) compartments. As with other CNS locations, CD44 and neurocan are both expressed in the adult normal retina: CD44 is found in the Müller cell apical processes, whereas neurocan is expressed at the level of the inter-photoreceptor matrix and in the nerve fiber layer. After degeneration or injury, the expression of these proteins is up-regulated at the outer surface of the retina by reactive glia and radial Müller cells. This tends to limit integration of a sub-retinal graft into the host retina [4-7].

In an attempt to alleviate this inhibition and promote integration, Kinouchi et al used adult mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin as the host and demonstrated that the transplanted cells integrated robustly into the host retina with distinct neuronal identity and appropriate neuronal projections [8]. This result suggested that removal of ECM barrier produced by reactive glial cells in the damaged host retina is important in encouraging the integration of grafted cells. DL-alpha-amino adipic acid, chondroitinase ABC and MMP2 have all been shown to have the ability to disrupt the outer limiting membrane or

degrade ECM molecules or their hyaluronan-binding targets, alleviating inhibition and allowing robust integration [9-11].

Our previous studies have shown that grafted RPCs can induce the host retina to increase MMP2 secretion, which resulted in proteolysis of CD44 and neurocan, allowing significantly increased neurite outgrowth across the border between abutting nondystrophic and rd1 retinas [4]. However, the endogenous level of MMP2 is clearly not enough to promote sufficient cell integration. We then transplanted RPCs/biodegradable MMP2-PLGA polymer constructs to adult retinal degenerative Rho<sup>-/-</sup> mice and found enhancement of cell integration *in vivo* [12].

Transplantation of RPCs/PLGA composite constructs without MMP2 loading can also significantly improve cellular survival and integration [13]. In order to exclude the influence of polymer scaffolds on cell integration and to allow for injection of the cells with MMP2 through small caliber pipette, we have developed biodegradable MMP2-PLGA microspheres with controlled delivery of active MMP2. We hypothesize that co-transplanting these microspheres with RPCs will result in controlled degradation of CD44 and neurocan without disrupting host retinal architecture, thereby enhancing RPC integration into the retina of degenerative hosts.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Rhodopsin-null C57Bl6 mice (Rho<sup>-/-</sup>, Peter Humphries, Trinity College, Dublin) were used as retinal degenerative recipient animals. Green fluorescent protein positive (GFP<sup>+</sup>) C57Bl6 mice (P0) were used as RPC donors (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). All experiments were performed according to the Schepens Eye Research Institute Animal Care and Use Committee and the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

## **MMP2 microspheres fabrication**

PLGA microspheres containing MMP2 were prepared by a water-oil-water solvent evaporation technique. Briefly, 20 ml of MMP2 solution (0.1 mg/ml, Calbiochem, Madison, WI, USA) was mixed by sonication (30 s) at low temperature (Sonicator XL, Head Systems, Iowa, USA) in a solution containing PLGA (20% w/v) (Resomer<sup>®</sup> 502, Resomer<sup>®</sup> 503, Boehringer Ingelheim, Pharma Co., Germany) dissolved in a mixture acetone:dimethyl chloride (20:80) to form a W<sub>1</sub>/O emulsion. This inner emulsion was added to 5 ml of poly (vinyl alcohol) (PVA) water (MilliQ<sup>®</sup>, Billerica, MA, USA) solution (2% w/v) and homogenized (Polytron<sup>®</sup> RECO, Kinematica GmbH PT 3000, Lucerna, Switzerland) at 9000 rpm for 1 min. The resulting W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub> emulsion was subsequently poured into 100 ml PVA (0.1% w/v, 72,000 g/ mol, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and continuously stirred for 3 h at room temperature to allow complete evaporation of the organic solvent. Once formed, microspheres were washed with MilliQ<sup>®</sup> water to eliminate the PVA and separated in different size fractions (2-10 μm, 10-20 μm and 20-40 μm) by filtration under vacuum conditions. Solid microspheres were frozen using a methanol/ice mixture and freeze-dried to obtain a free flowing powder. The dried microspheres were stored at -20 °C until use. Blank microspheres were fabricated in the same manner except that no MMP2 was loaded.

## **MMP2 microspheres characterization**

### ***Production yield percentage (PY%)***

PY% was calculated from the following equation where M<sub>T</sub> is the mass of each component in the formulation.

$$PY(\%) = M_T(\text{microspheres}) \times 100 / (M_T(\text{PLGA}) + M_T(\text{MMP2}))$$

### ***Morphological evaluation***

The morphology of the microspheres was observed by scanning electron microscopy (SEM, Jeol, JSM-6335F, Tokyo, Japan). Samples were gold sputter-coated before observation.

### ***Release study***

MMP2 microspheres and blank microspheres were prepared by adding 0.5 ml of PBS to 5 mg of microspheres in tubes pretreated with Sigmacote<sup>®</sup> (Sigma, St. Louis, MO, USA). The mixtures were then incubated at 37 °C on a shaker (Thermo, Waltham, MA, USA). At specific time points (1 h (H1), 8 h (H8), 1 day (D1), 3 days (D3), 5 days (D5), 10 days (D10) and 30 days (D30) after incubation), the mixture was centrifuged, and the supernatant was removed. Fresh PBS was added and the microspheres were returned to the shaker. The supernatant for each of the microspheres was frozen and stored at -80 °C for subsequent analysis using an MMP2 activity assay kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

### ***RPC isolation and culture***

Eyes from P0 GFP<sup>+</sup> mice were removed and placed in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). Neural retinas were carefully dissected away from the optic disc and ciliary marginal zone. Retinal tissue was minced and digested with 0.1% type 1 collagenase (Sigma) for 20 min at room temperature. Liberated cells were collected through a 100 µm mesh strainer, centrifuged at 1000 rpm for 5 min and re-suspended in neurobasal medium (NB; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF; Promega, Madison, WI, USA), 2% B-27 (Invitrogen), 1% N2 (Invitrogen), 100 µg/ml penicillin/streptomycin (Sigma), 2 mM L-glutamine (Sigma) and 2000 U nystatin (Sigma). Cells were transferred to a 6-well plate and cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. 0.5 ml of fresh medium was added to each well every 2 days. Primary neurospheres formed within the first 2 weeks in culture. These proliferating cultures were passaged 1:3 every 14 days.

## **Explant cultures**

The procedure used for retinal explants has been described previously [5,14]. Briefly, Adult Rho-/-mice were euthanized and eyes were enucleated immediately and placed in ice cold PBS. Neural retinas were dissected away from the optic disc and ciliary marginal zone, transferred to freshly prepared modified NB media and cut into four equal-sized pieces. Each piece of retina was mounted onto 0.4  $\mu\text{m}$  Millicell<sup>®</sup>-CM Organotypic porous culture well inserts (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) with its vitreal surface down, closest to the filter. Culture well inserts containing explants were placed into six-well culture plates. 2 ml of modified NB was added to each culture well. 1  $\mu\text{l}$  of MMP2 microspheres (5 ng/ml of released active MMP2) with or without RPCs ( $2 \times 10^4$  / $\mu\text{l}$ ) were put on the outer surface (sub-retinal) of each retinal explant, and incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 1-5 days.

## **Sub-retinal transplantation**

Mice were placed under general anesthesia with an intraperitoneal injection of ketamine (5 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), followed local anesthetization with 0.5% proparacaine (Accutome, Malvern, PA, USA) and dilation of the pupil with 1% tropicamide (Akorn, Lake forest, IL, USA). The temperature of the mice was maintained at 37 °C using a heating pad and heat lamp during surgery. Transplantation was performed under an operating microscope. The tip of a 30-gauge needle (BD) was inserted through the sclera into the intravitreal space to reduce intraocular pressure and then withdrawn. 1  $\mu\text{l}$  of MMP2 microspheres (5 ng/ml of released active MMP2) with or without RPCs ( $2 \times 10^5$  / $\mu\text{l}$ ) was inserted tangentially through the sclera into the sub-retinal space and injected slowly to produce a retinal detachment in the superior hemisphere around the injection site using a glass microneedle attached to a 50  $\mu\text{l}$  syringe (Hamilton, Reno, NV, USA) via polyethylene tubing. Following transplantation, mice were allowed to recover, returned to their normal housing and allowed to survive for 1 day-2 months post transplantation.

### **Semi-thin histology**

Enucleated eyes were fixed in 10% formalin for 48 h prior to dehydration and caste in rapid polymerizing methyl methacrylate (Technovit 7100, VWR, West Chester, PA, USA). Samples were removed, mounted on microtome chucks and semithin sectioning was performed. H&E staining was performed as per standard protocols.

### **Immunohistochemistry**

Enucleated eyes and explants were fixed in 4% paraformaldehyde for 12 h, and cryoprotected in 10%, followed by 30% sucrose for 12 h each at 4 °C. Eyes and explants were then embedded in Optimal Cutting Temperature Compound (Tissue-Tek, Miles Diagnostic Division, Elkhart, IN, USA), frozen on dry ice, and cryosectioned at 16 µm using a Minotome Plus (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC, USA). All samples were rinsed 3 times for 5 min each in PBS, blocked in PBS containing 10% goat serum, 3% BSA and 0.3% Triton-X for 1 h. After rinsing 1 time for 5 min in PBS, samples were incubated with the primary antibodies overnight at 4 °C in a humidified chamber: CD44 (BD, 1:500), neurocan (gift from Dr. Richard Margolis, Department of Pharmacology, NYU, 1:500), Laminin (Sigma, 1:400), glial fibrillary acidic protein (GFAP, Chemicon, Temecula, CA, USA, 1:400), green fluorescent protein (GFP, Abcam, Cambridge, MA, USA, 1:500), GFP (Chemicon, 1:500), recoverin (Chemicon, 1:500), rhodopsin (Chemicon, 1:100), PKC (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA, 1:100) and Bassoon (Thermo, 1:100). Normal serum was used for negative control. Sections were subsequently incubated in either Cy2 (1:100), Cy3 (1:300) or Cy5 (1:150)-conjugated secondary antibodies (Jackson Immunochem, West Grove, PA, USA). The nucleus was counter-stained with DAPI and sections were analyzed using confocal microscopy. Microscopic analysis was performed in such a way that exposure time, gain and depth of field remained constant between experimental conditions. Similarly, for each experiment all staining was performed at the same time using the same staining parameters.

## **TUNEL**

TUNEL staining was performed using an in situ cell death detection kit TMR red (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Every sample was counter-stained with DAPI and viewed under fluorescent microscopy.

## **Cell counting**

Cell counts presented in Fig. 6 were performed by counting the total number of cells that crossed the host retinal border in 10 randomly selected microscopic fields taken from each of 3 experimental samples. Thus, statistical analysis was based on counts from 30 microscopic fields.

## **Immunoblotting**

For Western blot analyses, retinas from retinal explants or transplanted eyes were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 0.02% NaN<sub>3</sub>), centrifuged, supernatants isolated and protein concentrations determined using a BCA protein assay (Pierce Chemicals, Rockford, IL, USA). Equivalent amounts of protein (30 µg) were subjected to SDS-PAGE (7% acrylamide), transferred to PVDF membrane and probed with the following antibodies: CD44s (Chemicon, 1:1000), neurocan (Abcam, 1:1000), and β-actin (Abcam, 1:5000). Blots were cut and re-probed sequentially, visualized with ECL reagents (NEN, Boston, MA, USA) and exposed to X-ray film (Kodak/Carestream Health, Bio Max Light Film, Rochester, NY, USA). Developed films were subsequently digitized and densitometrically analyzed using the Image J software (NIH image, each substrate was normalized against β-actin). Digital images of western blots were used to make composite figures with Adobe Photoshop® graphics software (Adobe Corp, Mountain View, CA, USA).

## **Statistical analysis**

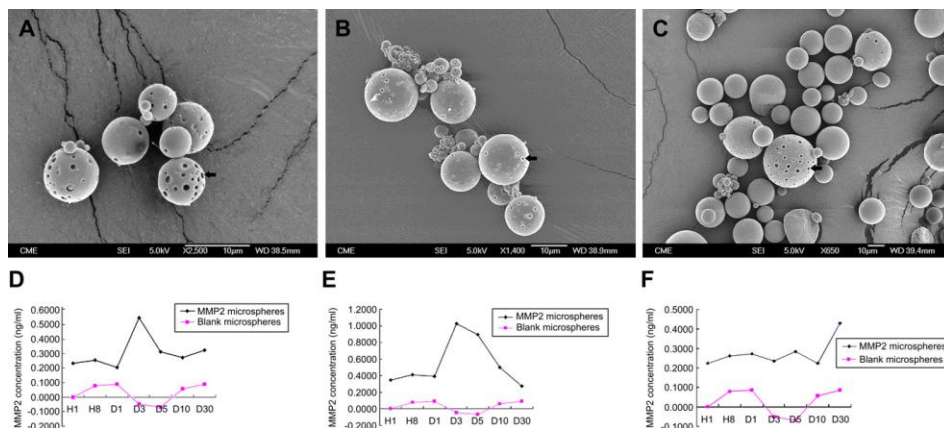
Each experiment was repeated 3 times using a minimum of 4 retinas per experimental condition. Where appropriate, data are plotted as mean ± SEM

and significance is noted only if  $p < 0.05$ , as determined by using one-way ANOVA with Tukey testing for post-hoc comparisons or standard students T-test.

## RESULTS

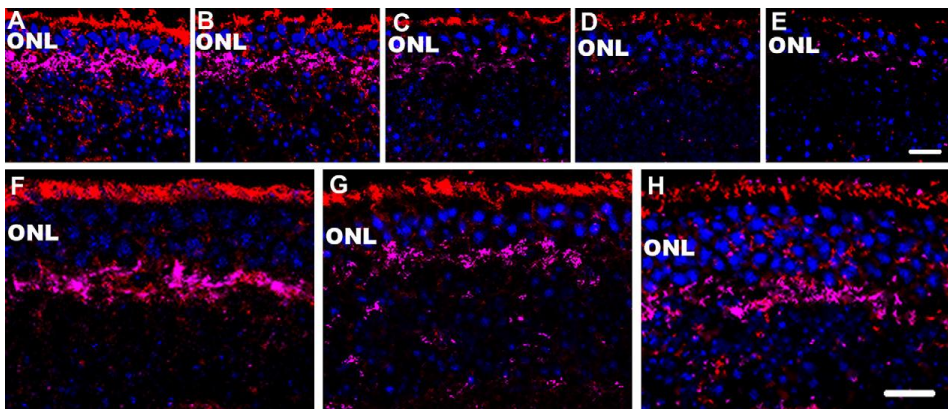
### Active MMP2 release

In order to achieve controlled release of active MMP2, we constructed PLGA microspheres containing MMP2. The microencapsulation method used in this study gave a production yield of 38%. After filtration, different size fractions (2-10  $\mu\text{m}$ , 10-20  $\mu\text{m}$  and 20-40  $\mu\text{m}$ ) were separated. Microspheres were spherical and showed some porosity on their surface (Fig. 1A-C, arrows). We hypothesized that MMP2 with appropriate release kinetics could degrade inhibitory ECM without disruption of host retina. The ideal release kinetics of active MMP2 for this study was an initial burst, lower release for one week, and then cessation of release. To select an ideal type of MMP2-PLGA microspheres to be used in this study, we performed a release study using a MMP2 activity assay kit *in vitro*. The MMP2 activity assay kit had the same sensitivity as Elisa, but it can also examine MMP2 in its active form. The results indicated that these microspheres had sustained delivery of active MMP2 from an initial burst up to 30 days. We found optimal release kinetics from the microspheres of 10-20  $\mu\text{m}$  from Resomer<sup>®</sup>502, as about 0.35 ng/ml of active MMP2 was released immediately following immersion of the microspheres in PBS (from H1 to D1). The maximum release of active MMP2 from this type of microspheres occurred at D3 and then began to decrease (Fig. 1E). The other size fractions from Resomer<sup>®</sup>502 showed lower maximum concentration than 10-20  $\mu\text{m}$  (Fig. 1D). The microspheres from Resomer<sup>®</sup>503 demonstrated delayed maximum release of active MMP2 (at D10 or D30) (Fig. 1F), which was not suitable for this study. These results collectively indicate that MMP2 can be loaded into, and released from the biodegradable PLGA microspheres via a water-oil-water solvent evaporation technique without enzymatic inactivation.



**Fig. 1.** Release of active MMP2 from biodegradable PLGA microspheres. A-C: Scanning electron microphotographs of MMP2-PLGA microspheres of different sizes and materials (A: 2-10  $\mu\text{m}$ , Resomer<sup>®</sup>502, B: 10-20  $\mu\text{m}$ , Resomer<sup>®</sup>502, C: 20-40  $\mu\text{m}$ , Resomer<sup>®</sup>503, arrow: porous structure). D-E: Release curve of corresponding MMP2-PLGA microspheres from H1 to D30 *in vitro*.

To determine the effective concentration of MMP2-PLGA microspheres, we injected different concentration of active MMP2 (10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml and 100 ng/ml) with HBSS as a control into the sub-retinal space of adult Rho-/- mice. Five days after injection, degradation of CD44 and neurocan could be seen with 25 ng/ml of active MMP2, clearly evident with 50 ng/ml and almost abolished with 100 ng/ml (Fig. 2A-E). Based upon previous observations, release kinetics and preliminary studies, we chose to test different concentration of MMP2-PLGA microspheres (5 ng/ml, 10 ng/ml of active MMP2) with blank microspheres as a control. Increased degradation of CD44 and neurocan at D5 could be seen in MMP2 group compared with control group. There seemed to be a little more obvious degradation of CD44 and neurocan with 10 ng/ml of active MMP2 than that with 5 ng/ml (Fig. 2F-H). However, there was no significant difference of cell integration between these two groups (data not shown). In order to reduce any adverse effect on the host retina, we opted to use the concentration of 5 ng/ml in the subsequent studies.

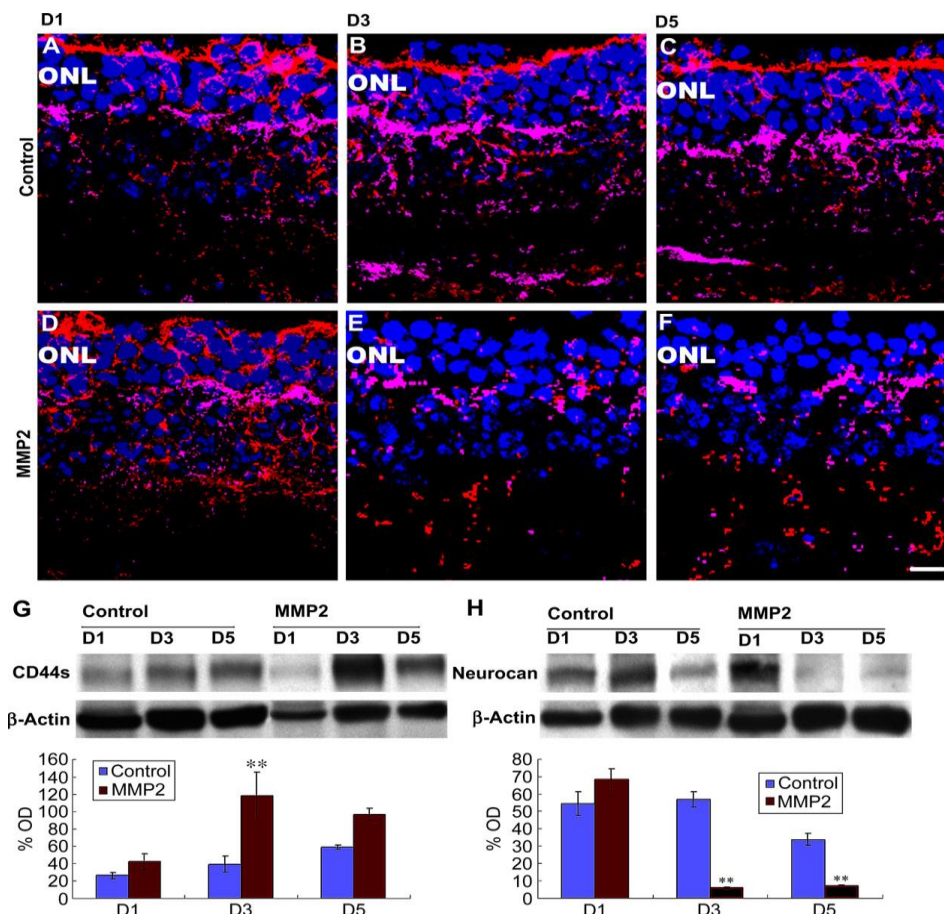


**Fig. 2.** Different concentration of active MMP2 induces degradation of CD44 and neurocan at the outer surface of adult Rho<sup>-/-</sup> mouse retina. A-E: 5 days after injection of active MMP2 into sub-retinal space (A: HBSS, B: 10 ng/ml MMP2, C: 25 ng/ml MMP2, D: 50 ng/ml MMP2, E: 100 ng/ml MMP2). F-H: 5 days after injection of MMP2-PLGA microspheres into sub-retinal space (F: blank microspheres, G: 5 ng/ml MMP2 microspheres, H: 10 ng/ml MMP2 microspheres). CD44-red, neurocan-pink, DAPI-blue. Scale bar: 15  $\mu$ m.

### Degradation of CD44 and neurocan

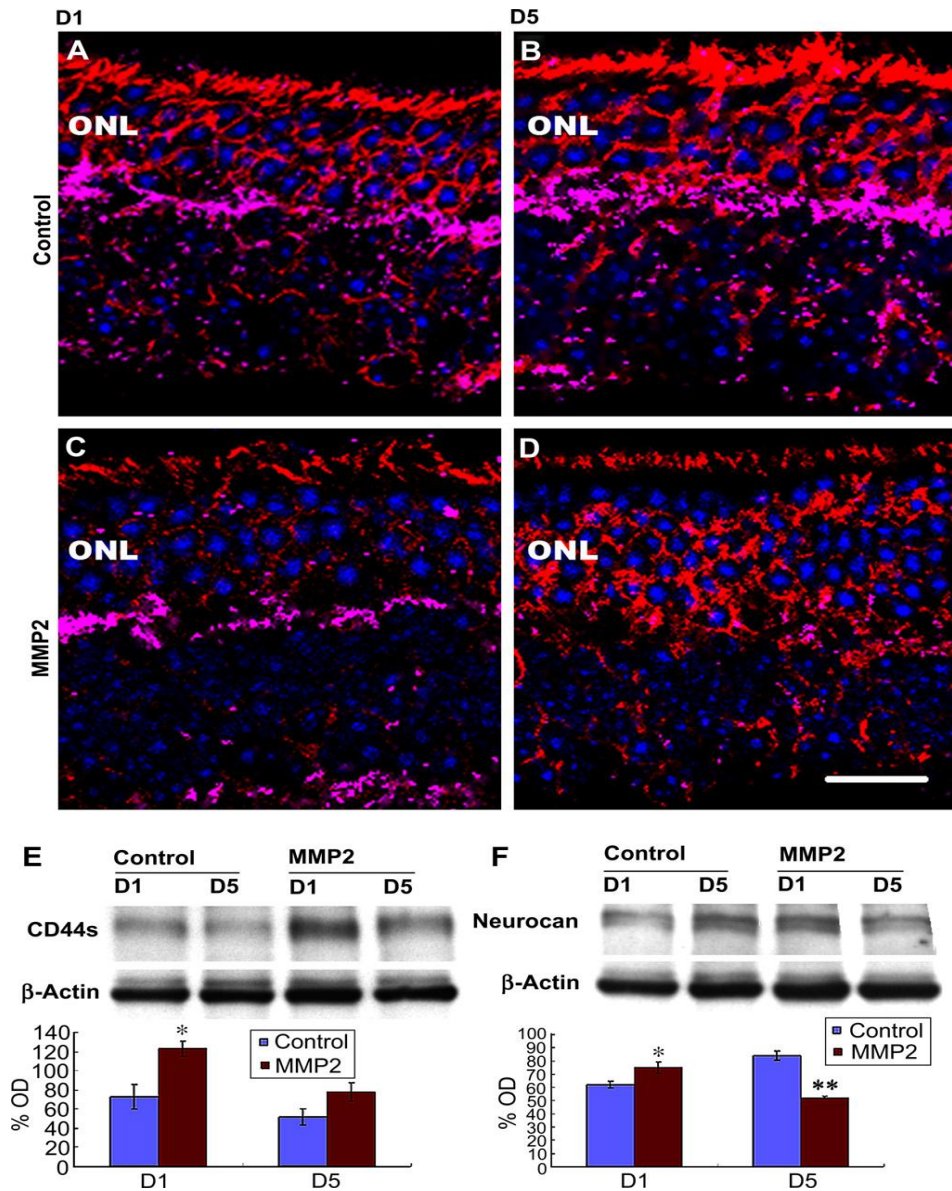
It has been shown previously that inhibitory ECM and adhesion molecules are expressed at the outer surface of the retina after injury or degeneration, which separated grafted cells from the host retina. In order to promote cell integration, removal of these proteins without further disruption of retinal architecture is important. Increased degradation of CD44 and neurocan has been observed from D3 to D7 with MMP2-PLGA polymer scaffolds *in vitro*, but whether MMP2-PLGA microspheres can also efficiently degrade these molecules in the same pattern *in vitro* is unknown. Moreover, it is unclear whether MMP2-PLGA microspheres have the same effect on these molecules *in vivo*. To address these questions, a series of *in vitro* retinal explants and *in vivo* sub-retinal injection were performed. After tissue harvesting, immunohistochemistry and western blotting directed against CD44 or CD44s (cleavage product of CD44) and neurocan were carried out. Retinal explants were performed by incubating MMP2 or blank microspheres on the outer surface of degenerative Rho<sup>-/-</sup> retinas

for 1 day, 3 days and 5 days. There was no significant difference in either protein between MMP2 group and control group at D1 postplanting, but a significant increase in CD44s (breakdown product of CD44) and a significant decrease in neurocan were observed in MMP2 group at D3. Unlike MMP2-PLGA polymer scaffolds, no further decrease in neurocan and even a decrease in CD44s at D5 were detected (Fig. 3G-H). Immunostaining for CD44 and neurocan at the outer surface of the degenerative retina in MMP2 group was slightly decreased at D1. An obvious decrease and almost abolishment of these proteins were observed in MMP2 group at D3 and D5 (Fig. 3A-F). These results were consistent with the release curve of this type of MMP2 microsphere. The highest concentration of active MMP2 at D3 resulted in most efficient degradation of CD44 and neurocan.



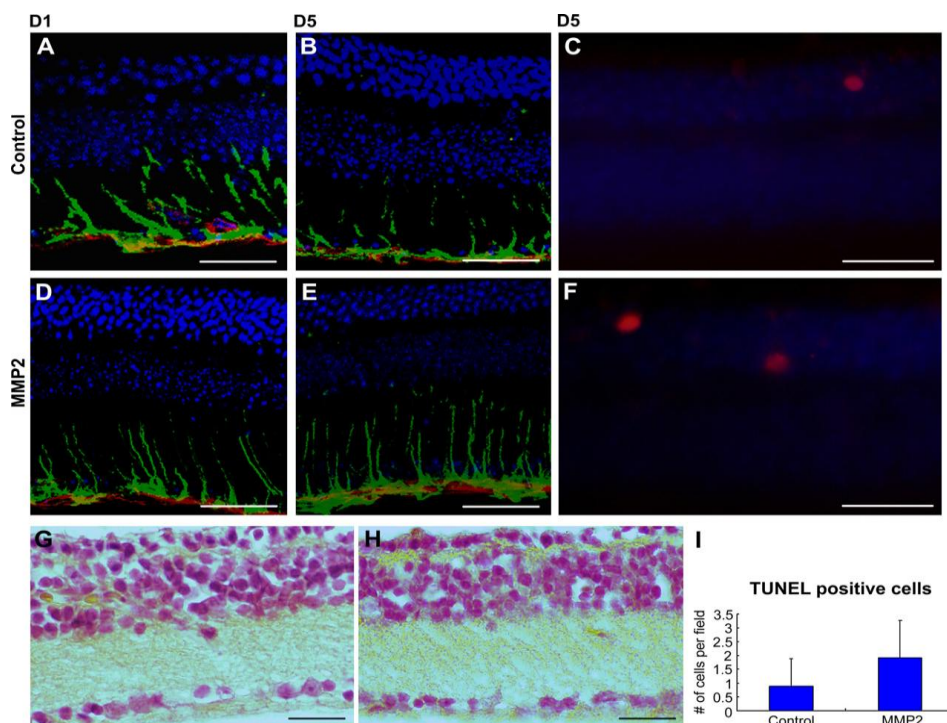
**Fig. 3.** Controlled release of active MMP2 from biodegradable MMP2-PLGA microspheres induces degradation of CD44 and neurocan at the outer surface of adult Rho-/-mouse retina *in vitro*. Retinal explants were cultured with blank microspheres (A-C) or MMP2 microspheres (D-F) for 1 day, 3 days and 5 days and then processed with immunohistochemistry (A-F, CD44-red, neurocan-pink, DAPI-blue) and western blotting (G: CD44s, H: neurocan). Scale bar: 10  $\mu$ m. \*\* $p < 0.001$ .

We next performed sub-retinal injections with MMP2 microspheres or blank microspheres into the sub-retinal space of adult Rho-/-mice to see whether these microspheres remained functional in the *in vivo* microenvironment. As immunohistochemistry demonstrated degradation of CD44 and neurocan at D5 *in vivo*, we sacrificed the animals 1 and 5 days after injection. A significant increase of CD44s was observed in MMP2 group at D1. At D5, the expression of CD44s in both groups was decreased and the difference was not significant. As for neurocan, an increase at D1 and then a significant decrease at D5 in MMP2 group were observed (Fig. 4E-F). Compared to control group, immunostaining demonstrated that the expression of neurocan and CD44 in MMP2 group was decreased at D1 and D5, but the degree was less than that seen *in vitro* (Fig. 4A-D). Thus, MMP2-PLGA microsphere can degrade the inhibitory ECM and adhesion molecules (CD44 and neurocan) *in vivo*. There were some differences between *in vitro* and *in vivo* results. It is speculated that the degradation of CD44 and neurocan by MMP2 microspheres induced *in vivo* regulation, perhaps by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), to prevent further degradation.



**Fig. 4.** Controlled release of active MMP2 from biodegradable PLGA microspheres induces degradation of CD44 and neurocan at the outer surface of adult Rho<sup>-/-</sup> mouse retina *in vivo*. Blank microspheres (A, B) or MMP2 microspheres (C, D) were injected into sub-retinal space for 1 day and 5 days. Retinas were collected and then processed with immunohistochemistry (A-D, CD44-red, neurocan-pink, DAPI-blue) and western blotting (E: CD44s, F: neurocan). Scale bar: 15  $\mu$ m. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .

It has been shown that increased MMP activity had the potential to induce apoptotic cell death, disruption of vasculature and induction of neovascularization [15-17]. Thus, to determine whether the concentration of active MMP2 delivered via these microspheres would negatively affect the host retina, a series of *in vivo* sub-retinal injection using MMP2 or blank microspheres were performed. More GFAP immunostaining was shown in MMP2 group at D1 and D5 compared with control group (Fig. 5A, B, D, E). However, no significant difference was seen between these two groups in laminin expression, which suggested that this concentration of MMP2 microspheres had no detrimental effect on basal lamina and/or retinal vasculature (Fig. 5A, B, D, E). There was a slight increase of TUNEL positive cells in MMP2 group 5 days after injection, but the difference was not significant (Fig. 5C, F, I). Moreover, as indicated by H&E staining, the thickness of host retina and laminar integrity were almost similar in both groups two months post-injection (Fig. 5G, H). Thus, the MMP2-PLGA microspheres used in this study can degrade CD44 and neurocan without further disruption of retinal architecture and/or RPC viability.



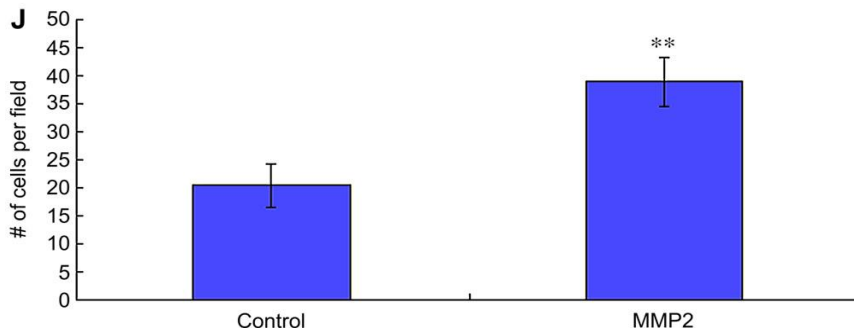
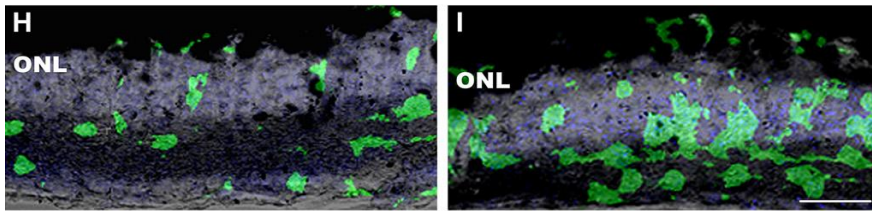
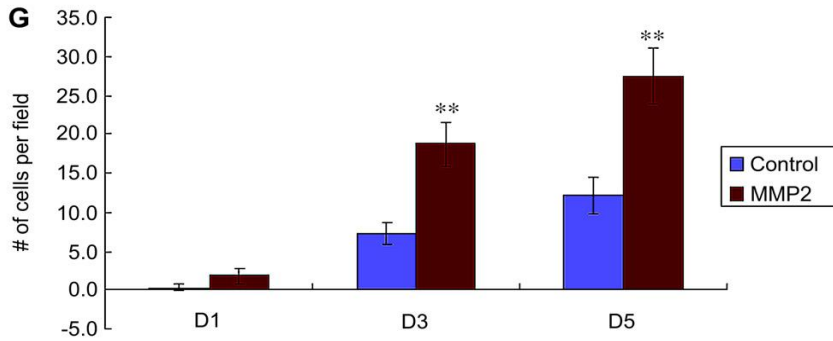
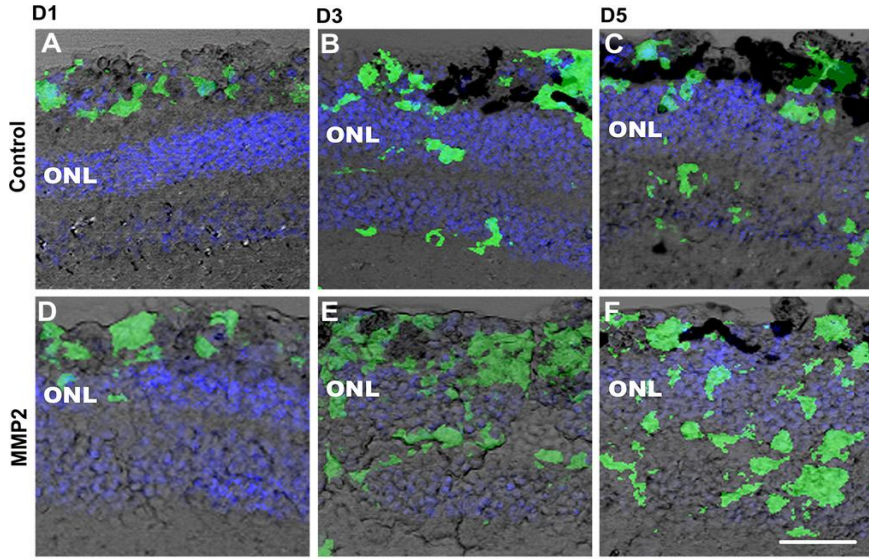
**Fig. 5.** Active MMP2 delivered via PLGA microspheres has no discernible detrimental effect on host retinal architecture. Blank microspheres (A, B, C, G, I) or MMP2 microspheres (D, E, F, H, I) were injected into sub-retinal space of adult Rho<sup>-/-</sup> mouse retina. Retinas were collected and then processed with immunohistochemistry (A, B, D, E, laminin-red, GFAP-green, DAPI-blue, 1 day and 5 days after injection), TUNEL (C, F, I, TUNEL-red, DAPI-blue, 5 days after injection), H&E (G, H, 2 months after injection). Scale bar: 30  $\mu$ m.

### Retinal regeneration

It was hypothesized that degradation/removal of the inhibitory ECM and adhesion molecules from the outer surface of the degenerative retina, via controlled delivery of active MMP2, would enhance cellular migration/integration. To test this, a series of *in vitro* retinal explants combining RPCs with MMP2 microspheres/ blank microspheres were performed. No significant difference in the number of integrated RPCs could be detected at D1 post-plating between the MMP2 group and the control group (Fig. 6A, D, G). At

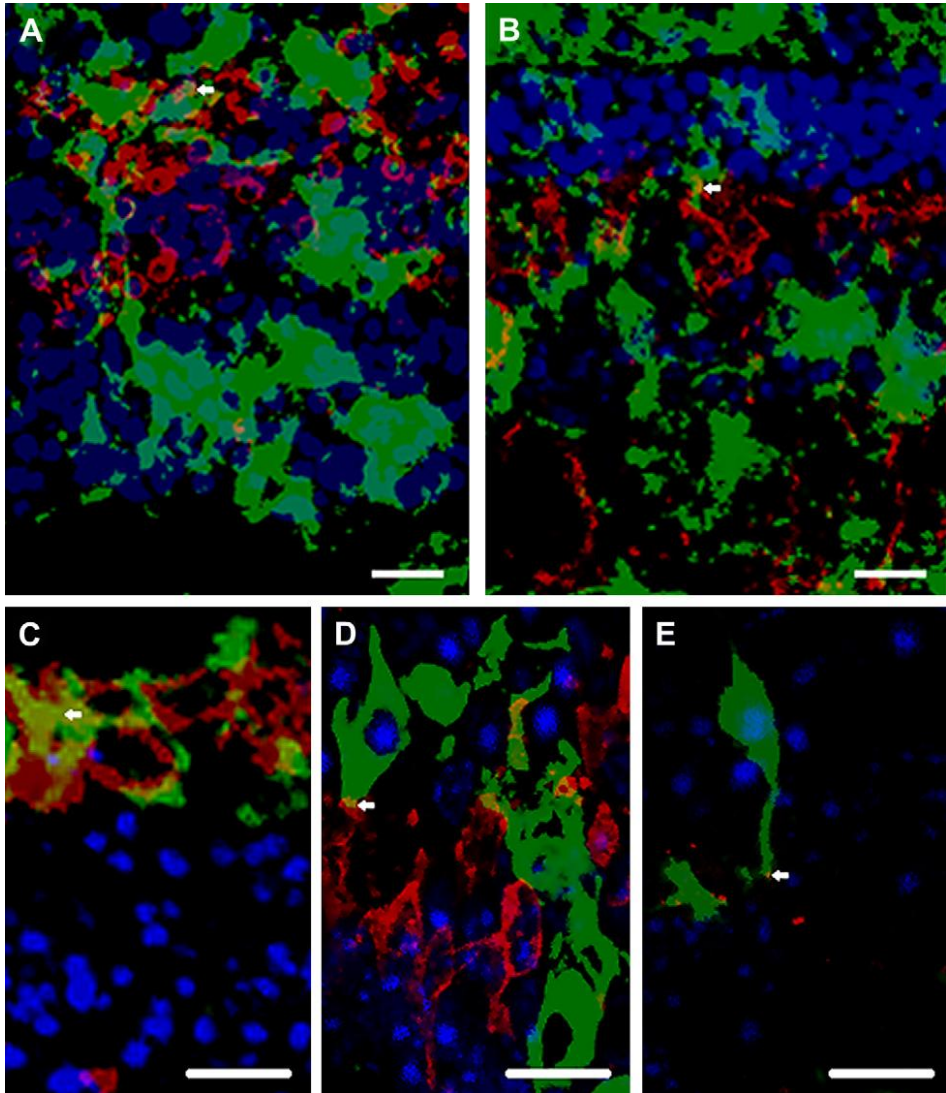
D3, a significant increase (approximately 3-fold) in RPC integration was observed in the MMP2 group as compared to the control group (Fig. 6B, E, G). A further significant increase in cellular integration was identified at D5 (approximately 2-fold) (Fig. 6C, F, G). The integrated RPCs took up residence in all retinal layers including the degenerative outer nuclear layer. The time point of these results was consistent with that of the degradation of inhibitory ECM and adhesion molecules. The highest degree of degradation at D3 resulted in most robust cell integration.

As reported above, there were some differences in the degradation of CD44 and neurocan between *in vitro* and *in vivo*. Less CD44 and neurocan were degraded *in vivo* than that *in vitro*. Although the MMP2 microspheres could enhance cellular integration *in vitro*, whether they could promote RPC integration *in vivo* was still unclear. To address it, sub-retinal co-transplantation of MMP2 microspheres/blank microspheres with RPCs was performed. Compared to the control group, a significant 2-fold increase in cellular integration was observed in the MMP2 group 3 weeks following injection into the sub-retinal space of the adult Rho<sup>-/-</sup> mice. Cells migrated extensively and took up residence in all retinal layers (Fig. 6H-J).



**Fig. 6.** Degradation of CD44 and neurocan via MMP2-PLGA microspheres enhances RPC integration into the adult Rho<sup>-/-</sup> mouse retina. Blank microspheres (A-C, H) or MMP2 microspheres (D-F, I) with RPCs were put on the outer surface of retinal explants for 1 day, 3 days and 5 days (A-F) or injected into sub-retinal space for 3 weeks (H-I). Retinas were collected and then processed with immunohistochemistry (A-F, H, I, GFP-green, DAPI-blue). The average number of cells that migrated beyond the outer limits was counted per microscopic field (G, J). Scale bar: 40  $\mu$ m. \*\*p < 0.001.

Although the above-mentioned results were promising, the concern remained as to whether MMP2 would have an adverse effect on cell differentiation [18]. We tested a series of retinal explants and sub-retinal co-transplantation of MMP2 microspheres/blank microspheres with RPCs. RPCs that migrated into the remaining ONL could express the pan-photoreceptor marker recoverin and some began to resemble photoreceptor cells with newly formed outer segments (Fig. 7A, C), but the rhodopsin-positive cells could not be detected in either 5-day retinal explants or 3 week sub-retinal transplantation (data not shown). Some of these cells were found to make contact with residual PKC-positive cells (Fig. 7B, D). Three weeks after transplantation, some even expressed the ribbon synapse protein bassoon (Fig. 7E). Thus, integrated cells assemble structural components of the spherule synapse, an essential requirement if they are to communicate with the inner retina [19]. These results suggested that RPCs delivered via the biodegradable MMP2-PLGA microspheres retained their ability to develop into photoreceptor phenotypes, aiding in repopulating the outer nuclear layer of retinal degenerative recipients.



**Fig. 7.** MMP2-PLGA microspheres do not change the differentiation of *RPC in vitro* and *in vivo*. MMP2 microspheres with RPCs were put on the outer surface of retinal explants for 5 days (A, B) or injected into sub-retinal space for 3 weeks (C-E). Retinas were collected and then observed by immunohistochemistry. GFP-green, DAPI-blue, recoverin-red (A, C, arrow shows recoverin-positive cell), PKC-red (B, D, arrow shows contact between grafted cell and PKC-positive cell), bassoon-red (E, arrow shows bassoon-positive structure). Scale bar: 10 μm.

## DISCUSSION

To achieve functional regeneration of a damaged retina in patients with AMD or RP via cell transplantation, more efficient cell delivery and integration is needed. Here we show that co-transplantation of biodegradable MMP2-PLGA microspheres with RPCs could enhance cellular integration via degradation of CD44 and neurocan at the outer surface of the degenerative retina without disruption of the retinal architecture. Moreover, cells in the ONL could express mature photoreceptor markers recoverin, make contacts with residual PKC-positive cells and express the ribbon synapse protein bassoon.

Transplantation of RPCs provides a promising approach for retinal repair. However, it has been limited by the low quantity of cell integration into the host retina. This is in part due to the deposition of inhibitory ECM and cell adhesion molecules, such as CD44 and neurocan, at the outer surface of the degenerative retina, which separates sub-retinal grafts from host retina [4-7]. Our previous studies have shown that MMP2, either secreted by host retina [4] or delivered via MMP2-PLGA polymer scaffolds [12] can promote host-donor integration by degrading these molecules. However, endogenous MMP2 is not sufficient to promote widespread cellular integration *in vivo*. Polymer scaffolds can increase cell integration by preventing cellular efflux and death [13], which may complicate analysis of the role of exogenous MMP2. In this study, we used PLGA microspheres as a vehicle to deliver active MMP2 and confirmed that MMP2 itself could induce a significant increase of cellular integration, coincident with a significant increase of degradation of CD44 and neurocan *in vitro* and *in vivo*.

We suggest that bolus injections of active MMP2 in solution would be short acting and likely diffuse from the injection site, resulting in a continuous decrease in enzymatic activity and eventual re-accumulation of inhibitory ECM and adhesion molecules, which is in fact aggravated in many progressive degenerative diseases. Moreover, a much higher concentration of active MMP2 would be needed to remove and prevent re-accumulation of these molecules by

single bolus injection or multiple injections. This would risk further disruption of the already compromised retina. The MMP2-PLGA microspheres have a continuously controlled delivery of active MMP2 up to 30 days. The release kinetics of the microspheres used in this study was an initial burst, followed by a peak at D3 and then cessation of release. With this curve, we hypothesized that the barrier would be degraded, allowing for cell integration, with minimal negative impact on the host retina. Over the course of our study, there was no discernible detrimental influence on the host retina when using 5 ng/ml of active MMP2. The maximum release of this type of microspheres occurred at D3, which resulted in maximum degradation of CD44 and neurocan, and robust enhancement of cell integration at the same time point *in vitro*. It is possible that most of the CD44 and neurocan at the outer surface of the degenerative retina were removed at D3, so no further degradation of these molecules could be detected at D5. Although a significant increase of cell integration could be observed at D5, the increase rate began to slow. These results are somewhat different from those using MMP2-PLGA polymer scaffolds [12], which may be due to their different release kinetics. Moreover, there were some differences between *in vitro* and *in vivo* results. It is speculated that *in vivo* regulation could balance ECM degradation and deposition. Naturally occurring TIMPs could inactivate MMP2 by binding to the catalytic site, thereby preventing further degradation of inhibitory ECM [20]. In spite of this, the concentration of active MMP2 delivered via the microspheres still degraded these inhibitory molecules and stimulated cellular integration.

Compared to bolus injections of active MMP2 in solution, both MMP2-PLGA microspheres and MMP2-PLGA polymer scaffolds have the ability to achieve precise graft placement and region-specific degradation of inhibitory ECM and adhesion molecules. With a much lower effective concentration, active MMP2 delivered via either of them has minimal disruption of the host retina. With their porous structure and non-laminar form, the space among the microspheres is more helpful for nutrient exchange between the retinal pigmented epithelial (RPE) and the neural retina. The MMP2-PLGA microspheres used in this study were only 10-20  $\mu\text{m}$  in diameter, thinner than the MMP2-PLGA polymer scaffolds, resulting in a shorter distance between the RPE and the neural retina.

Moreover, it is much easier to transplant the microspheres with RPCs than the RPCs/ MMP2-PLGA polymer constructs, as a syringe and small caliber needle can be used.

The photopigment rhodopsin-positive was not detected in the grafted cells. It may relate to the complete absence of rhodopsin expression in Rho-/-hosts or MMP2 or the polymeric delivery system may inhibit neuronal differentiation [18]. Interestingly, most of the integrated cell took residence in the inner nuclear layer instead of the outer nuclear layer. Previous studies have shown that in the apparent absence of injury cues for rod disease, the extensive migration of RPCs to the inner retina may reflect a response to downstream remodeling, including loss of rod bipolar cells [21,22]. In contrast, RPCs, when delivered via MMP2-PLGA polymer scaffolds could differentiate into rhodopsin-positive cells [12]. To achieve functional replacement, different cell types and delivery systems need to be investigated. It has been shown that delivery of photoreceptor precursors [1] and induced pluripotent stem cells [23] may facilitate differentiation into photoreceptors. A new polymer material, Poly (3-caprolactone) (PCL) has been shown to be well tolerated following sub-retinal transplantation [24]. Except promoting cell integration, PCL polymer scaffolds can enhance differentiation of RPCs by using microfabricated topographical cues [25]. We are now investigating the role of a novel 5  $\mu$ m-thick microfabricated PCL polymer scaffolds on cell survival and differentiation. Fabrication with MMP2 and/or other molecules that could direct cells towards a photoreceptor fate in this kind of PCL polymer scaffolds is a promising strategy for retinal repair.

## **CONCLUSIONS**

We have developed a drug delivery vehicle which provides controlled release of active MMP2. After delivering MMP2-PLGA microspheres, the inhibitory ECM and adhesion molecules deposited at the outer surface of the degenerative retina were degraded, resulting in enhancement of cellular integration without disruption of the host retina. Thus, microspheres provide a practical and

effective tool for retinal repair. Future work will likely involve cues to direct RPC differentiation towards photoreceptors.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Dr. P. Humphries (Trinity College, Dublin) for providing Rhodopsin-null mouse breeding pairs, and Dr. R. Margolis (New York University, New York) for providing Neurocan antibody. Financial support was provided by Lincy Foundation/ Discovery Eye Foundation, Research to Prevent Blindness, MAT 2007-6528, RETICS RD07/0062/2002, Research Group UCM 920415 (CG58/09) and the scholarship of Patricia Checa.

## **REFERENCES**

- [1] MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, Douglas RH, Salt TE, Akimoto M, et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 2006;444(7116):203-7.
- [2] Klassen H, Sakaguchi DS, Young MJ. Stem cells and retinal repair. *Prog Retin Eye Res* 2004;23(2):149-81.
- [3] Klassen HJ, Ng TF, Kurimoto Y, Kirov I, Shatos M, Coffey P, et al. Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(11):4167-73.
- [4] Zhang Y, Klassen HJ, Tucker BA, Perez MT, Young MJ. CNS progenitor cells promote a permissive environment for neurite outgrowth via a matrix metalloproteinase-2-dependent mechanism. *J Neurosci* 2007;27(17):4499-506.
- [5] Zhang Y, Caffé AR, Azadi S, van Veen T, Ehinger B, Perez MT, et al. Neuronal integration in an abutting-retinas culture system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(11):4936-46.
- [6] Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Honjo M, Kido N, Honda Y, et al. Upregulated expression of neurocan, a nervous tissue specific proteoglycan, in transient retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(9):2748-54.
- [7] Krishnamoorthy R, Agarwal N, Chaitin MH. Upregulation of CD44 expression in the retina during the rds degeneration. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;77(1):125-30.

- [8] Kinouchi R, Takeda M, Yang L, Wilhelmsson U, Lundkvist A, Pekny M, et al. Robust neural integration from retinal transplants in mice deficient in GFAP and vimentin. *Nat Neurosci* 2003;6(8):863-8.
- [9] West EL, Pearson RA, Tschernutter M, Sowden JC, Maclaren RE, Ali RR, et al. Pharmacological disruption of the outer limiting membrane leads to increased retinal integration of transplanted photoreceptor precursors. *Exp Eye Res* 2008;86(4):601-11.
- [10] Suzuki T, Akimoto M, Imai H, Ueda Y, Mandai M, Yoshimura N, et al. Chondroitinase ABC treatment enhances synaptogenesis between transplant and host neurons in model of retinal degeneration. *Cell Transpl* 2007;16(5):493-503.
- [11] Suzuki T, Mandai M, Akimoto M, Yoshimura N, Takahashi M. The simultaneous treatment of MMP-2 stimulants in retinal transplantation enhances grafted cell migration into the host retina. *Stem Cells* 2006;24(11):2406-11.
- [12] Tucker BA, Redenti SM, Jiang C, Swift JS, Klassen HJ, Smith ME, et al. The use of progenitor cell/biodegradable MMP2-PLGA polymer constructs to enhance cellular integration and retinal repopulation. *Biomaterials* 2010;31(1):9-19.
- [13] Tomita M, Lavik E, Klassen H, Zahir T, Langer R, Young MJ, et al. Biodegradable polymer composite grafts promote the survival and differentiation of retinal progenitor cells. *Stem Cells* 2005;23(10):1579-88.
- [14] Ogilvie JM, Speck JD, Lett JM, Fleming TT. A reliable method for organ culture of neonatal mouse retina with long-term survival. *J Neurosci Methods* 1999;87(1):57-65.
- [15] Dang AB, Tay BK, Kim HT, Nauth A, Alfonso-Jaume MA, Lovett DH, et al. Inhibition of MMP2/MMP9 after spinal cord trauma reduces apoptosis. *Spine* 2008;33(17):E576-9.
- [16] Johnson C, Sung HJ, Lessner SM, Fini ME, Galis ZS. Matrix metalloproteinase-9 is required for adequate angiogenic revascularization of ischemic tissues: potential role in capillary branching. *Circ Res* 2004;94(2):262-8.
- [17] Chintala SK, Zhang X, Austin JS, Fini ME. Deficiency in matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) protects against retinal ganglion cell death

after optic nerve ligation. *J Biol Chem* 2002;277(49):47461-8.

[18] Young VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(12):931-44.

[19] tom Dieck S, Altmann WD, Kessels MM, Qualmann B, Regus H, Brauner D, et al. Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex. *J Cell Biol* 2005;168(5):825-36.

[20] Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(7):502-11.

[21] Marc RE, Jones BW, Watt CB, Strettoi E. Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(5):607-55.

[22] Peng YW, Hao Y, Petters RM, Wong F. Ectopic synaptogenesis in the mammalian retina caused by rod photoreceptor-specific mutations. *Nat Neurosci* 2000;3(11):1121-7.

[23] Hiram Y, Osakada F, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Ikeda H, et al. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett* 2009;458(3):126-31.

[24] Redenti S, Tao S, Yang J, Gu P, Klassen H, Saigal S, et al. Retinal tissue engineering using mouse retinal progenitor cells and a novel biodegradable, thinfilm poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanowire scaffold. *J Ocul Biol Dis Infor* 2008;1(1):19-29.

[25] Steedman MR, Tao SL, Klassen H, Desai TA. Enhanced differentiation of retinal progenitor cells using microfabricated topographical cues. *Biomed Micro-devices* 2010;12(3):363-9.

# DISCUSIÓN GENERAL



## 5 DISCUSIÓN GENERAL

Las enfermedades neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo son devastadoras y comprometen la visión de un gran número de pacientes. Representan un grupo de patologías de etiología multifactorial, generalmente crónicas, que cursan con un daño progresivo del nervio óptico y la pérdida de fotorreceptores y células ganglionares de la retina (CGR), ocasionando como consecuencia una alteración del campo visual, que si no se trata puede conducir a ceguera irreversible. Independientemente de su etiología, la terapia frente a este tipo de enfermedades tiene como objetivo el bloqueo de los mecanismos que desencadenan la degeneración del nervio óptico, por lo que una de las vías propuestas se orienta hacia la neuroprotección.

La neuroprotección se centra en la protección de neuronas susceptibles de sufrir “degeneración secundaria”, que ocurre en neuronas inicialmente no dañadas pero que acaban muriendo por exposición a agentes citotóxicos liberados por la muerte de las neuronas con daño axonal primario<sup>110</sup>. Basándose en estos hechos, la neuroprotección resulta útil incluso cuando se desconoce la causa inicial de la enfermedad y tiene como finalidad limitar y prevenir el daño y muerte neuronal.

El gran interés despertado por el uso de la terapia neuroprotectora en este tipo de patologías se ha materializado en los últimos años en el creciente número de investigadores dedicados a este campo. Los resultados positivos obtenidos en el tratamiento de otras alteraciones neuronales, como la enfermedad de Parkinson o Alzheimer<sup>231, 232</sup>, auguran buenos presagios para el uso de esta nueva estrategia en el tratamiento de las neuropatías oftálmicas. En el caso del glaucoma, la neuroprotección resultaría una terapia coadyuvante al control de la presión intraocular en pacientes con valores elevados de PIO y de elección en aquellos que cursan con valores normales de PIO.

Entre los agentes neuroprotectores susceptibles de ser administrados, los factores neurotróficos han resultado ser de los más interesantes, destacando entre ellos el Factor Neurotrófico Derivado de la línea celular Glial (GDNF) o el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF), que ya han demostrado promover la supervivencia de CGR dañadas<sup>28, 144, 148, 151</sup>. Sin embargo, la aplicabilidad de las terapias neuroprotectoras requiere el desarrollo de formas de administración que permitan el tratamiento eficaz de las zonas afectadas de la retina. En este sentido, la administración intravítrea parece la vía más directa y la que mejor puede controlar la cantidad de fármaco que llega a su lugar de acción, eliminando la mayor parte de efectos secundarios sistémicos<sup>14</sup>. No obstante, esta ruta no está exenta de problemas. Además de los riesgos inherentes a la utilización de una técnica invasiva como son las inyecciones intravítreas (cataratas, desprendimiento de retina, endoftalmitis, etc), otro inconveniente sería que la administración del fármaco tendría que hacerse en forma de bolus, lo que resulta insuficiente en el tratamiento de estas patologías crónicas que precisan concentraciones de la sustancia activa en el lugar de acción durante largos periodos de tiempo<sup>32</sup>.

Una vez descartada la administración frecuente de inyecciones intravítreas, debido a las complicaciones derivadas, se hace necesario el desarrollo de formulaciones capaces de proporcionar concentraciones terapéuticas del fármaco en su lugar de acción por periodos prolongados de tiempo. Con este objetivo, los sistemas microparticulares biodegradables de liberación controlada se están convirtiendo en una de las alternativas más interesantes destinadas a este fin, ya que pueden administrarse en forma de suspensión como una inyección convencional y desaparecen del lugar de acción una vez ejercido el efecto.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha basado en el diseño de varias formulaciones de microesferas biodegradables cargadas con agentes neuroprotectores destinadas a su administración intraocular para el tratamiento de patologías neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo. Además, se ha procedido a la esterilización y a la evaluación del posible efecto antiangiogénico de las nuevas

formulaciones. El trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral ha sido objeto de cuatro publicaciones científicas y varias presentaciones a congresos (comunicaciones orales y en panel) recogidas en el apartado de divulgación científica.

El primer trabajo que se recoge en esta memoria está basado en el diseño de una formulación de microesferas biodegradables de PLGA cargadas con el agente neuroprotector GDNF y con vitamina E. Teniendo en cuenta las características del principio activo que se pretende encapsular (compleja estructura, fácil degradación, alto peso molecular, etc), el primer objetivo fue desarrollar un método de microencapsulación para mantener tanto la integridad de la proteína como su actividad biológica durante el proceso de elaboración de las micropartículas y su posterior liberación.

El método empleado para la fabricación de las microesferas se basó en la técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A, que a lo largo de la memoria se designará como S/O/A 2. La novedad que presentó el método fue el hecho de que la proteína no se trató previamente a su encapsulación y permaneció siempre en su estado sólido. Para ello, se propuso un método de dispersión de la sustancia activa en condiciones poco agresivas, que consistió en su sonicación empleando baja potencia y baja temperatura durante un tiempo muy corto (30 seg). Además, de forma adicional, se incorporó un aditivo oleoso (Vit E) a la fase interna de la emulsión. Este recurso tecnológico se utilizó con el fin de aportar una mayor protección de la proteína durante el proceso de fabricación y una liberación más prolongada de la misma. La vitamina E también posee propiedades antioxidantes y antiproliferativas que resultan de gran interés como terapia combinada a la administración de agentes neuroprotectores. Desde el punto de vista terapéutico, la vitamina E actúa como secuestrador de radicales libres en los procesos de estrés oxidativo implicados en los mecanismos de muerte celular<sup>169, 233</sup>, además su actividad antiproliferativa podría evitar algunos riesgos derivados de las inyecciones intravítreas como es la retinopatía proliferativa<sup>180</sup>.

Las microesferas obtenidas mediante este proceso de fabricación se caracterizaron *in vitro* mediante el estudio de su morfología, tamaño de partícula, distribución de los componentes en el interior de las partículas, eficacia de encapsulación, perfil de liberación del agente neuroprotector y comportamiento de las microesferas en el medio de liberación. La morfología estudiada por microscopía electrónica de barrido permitió observar partículas esféricas, bien definidas y con algunos poros en la superficie de las mismas, debido fundamentalmente a la presencia de Vit E en la fase orgánica de la emulsión, que provoca una lenta difusión del disolvente orgánico durante la maduración de las micropesferas. El tamaño de partícula se optimizó con el objetivo de conseguir microesferas de un tamaño adecuado para su administración en forma de suspensión, por vía intravítrea, empleando agujas convencionales (27-34G) y a la vez, con un tamaño óptimo que permitiera una liberación controlada del principio activo durante periodos prolongados de tiempo<sup>31</sup>. Así, se prepararon microesferas a partir de 20 µg de GDNF y 20 µl de vitamina E con un tamaño medio próximo a los 20 µm.

La distribución de los componentes en el interior de las partículas fue determinada por microscopía confocal, empleando una proteína modelo marcada con isotiocianato de fluoresceína (BSA-FITC) y un fosfolípido fluorescente (DHPE-TRITC, dihexadecanoil-glicero-fosfoetanolamina marcado con tetrametilrodamina). En ambos casos, se observó una distribución no homogénea de los componentes (proteína y vitamina) en el interior de las microesferas, con una mayor proporción de fluorescencia en la superficie de las partículas, denotando que ambos compuestos se sitúan mayoritariamente en esa zona.

Tanto la eficacia de encapsulación como el perfil de liberación del GDNF fueron determinados mediante la cuantificación de la proteína empleando la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), previa validación de la misma cumpliendo los parámetros preestablecidos de linealidad, exactitud y precisión.

Las condiciones para la realización de los ensayos de liberación *in vitro* de la proteína, fueron optimizadas teniendo en cuenta la inestabilidad que presentan

estas macromoléculas. Se emplearon tubos eppendorf® especiales de baja unión a proteínas para evitar la adhesión del GDNF a los tubos. Además, con el objetivo de evitar los fenómenos de agregación proteica, que surgen durante la liberación de proteínas debido a la tendencia adherente de éstas a la superficie del PLGA, se ensayaron diferentes proporciones de albúmina como transportador (0%, 0,1% y 1%), en el tampón fosfato isotónico (PBS, pH 7,4) que compuso el medio de cesión<sup>186, 195</sup>. La cantidad total del producto biológico liberado al final del ensayo de cesión ( $27,8 \pm 1,8$  ng GDNF/mg MSs), empleando en el medio de liberación 1% de albúmina sérica bovina (BSA), coincidió con el resultado obtenido en el ensayo de eficacia de encapsulación ( $25,4 \pm 2,9$  ng GDNF/mg MSs), indicando, por tanto, que esta concentración de transportador era óptima para llevar a cabo el ensayo de cesión. Como consecuencia, el medio de cesión compuesto por PBS, pH 7,4 isotonicado con NaCl y 1% de BSA fue seleccionado para estudios posteriores. La liberación de GDNF a partir de las microesferas se prolongó hasta las 19 semanas dando lugar a un perfil trifásico, típico en los sistemas de liberación controlada elaborados con PLGA<sup>202</sup>. Por último, se evaluó el comportamiento de las micropartículas en el medio de cesión. Mediante microscopía electrónica de barrido se observó que las partículas empezaron a erosionarse y perder su forma inicial en la sexta semana del ensayo de liberación, encontrándose completamente aglomeradas en la octava semana del estudio.

Una vez comprobadas las propiedades generales de las microesferas, se determinó la actividad biológica de la proteína mediante el estudio del efecto neuroprotector del GDNF en las células donde ejerce su acción (fotorreceptores y células ganglionares de la retina (CGR)). Estos bioensayos se realizaron tanto al final del proceso de microencapsulación como después de la liberación de la proteína. Los datos obtenidos pusieron de manifiesto que la muerte de fotorreceptores disminuía al administrar diferentes cantidades de GDNF exógeno o contenido en las micropartículas (10, 25 y 50 ng), obteniéndose mejores resultados empleando los sistemas de liberación controlada. Por otro lado, se demostró que el GDNF continuó en su forma activa una vez liberado de las partículas, lo que se puso en evidencia con un incremento en la supervivencia de CGR cuando se pusieron en contacto estas

células con diferentes medios de cesión procedentes de distintos tiempos del ensayo de liberación.

Los estudios de eficacia *in vivo* permitieron analizar el efecto neuroprotector de la formulación en un modelo animal de glaucoma, ratas macho con elevada PIO, conseguida mediante la inyección de una solución hipertónica en la vena episcleral. La administración de microesferas (0,025 mg) cargadas con GDNF y Vit E (0,64 ng GDNF/ ojo) incrementó la supervivencia de CGR ( $51,6 \pm 3,2/\text{mm}$ ), comparado con la administración de una cantidad equivalente de GDNF ( $22,8 \pm 3,2/\text{mm}$ ), vitamina E ( $21,9 \pm 2,4/\text{mm}$ ) o microesferas blanco ( $20,8 \pm 2,1/\text{mm}$ ), que fue determinada mediante el recuento de células Anti-NeuN + en la capa de células ganglionares 11 semanas después de su inyección. Del mismo modo, el tratamiento con microesferas cargadas con GDNF y Vit E, incrementó la supervivencia axonal (72,68%) comparado con el resto de tratamientos, GDNF (36,58%), vitamina E (30,65%) y microesferas blanco (28,96%). Es importante destacar que la cantidad total de GDNF contenida en las microesferas administradas (0,64 ng de GDNF en 0,025mg de MS) resultó eficaz durante al menos 77 días. Además, teniendo en cuenta la lenta velocidad de liberación de GDNF durante las 3-7 semanas (0,8 pg/día), se puede asegurar que incluso cantidades muy pequeñas de este agente neuroprotector mantenidas a lo largo de tiempo resultan eficaces en el modelo de glaucoma empleado, confirmando así una de las hipótesis de trabajo.

En definitiva, los resultados obtenidos en este primer trabajo nos llevan a establecer el interés de esta formulación en el futuro tratamiento de patologías degenerativas que afectan a la retina. Sin embargo, al igual que todas las preparaciones que pretendan ser administradas por vía intraocular, esta formulación debe cumplir unos requerimientos de esterilidad. Por este motivo, en la segunda etapa del trabajo de investigación se estudió la influencia del proceso de esterilización en la formulación anteriormente desarrollada. Además, con el objetivo de estudiar la relación entre el estado físico de la proteína en la formulación y su actividad biológica tras el proceso de esterilización, se evaluaron tres técnicas de microencapsulación distintas (A/O/A, S/O/A 1 y S/O/A 2).

Así, en el segundo trabajo experimental se prepararon tres formulaciones de microesferas de PLGA cargadas de GDNF incorporando la proteína al estado sólido o disuelto en la fase interna de la emulsión. Posteriormente, todas ellas fueron esterilizadas con el objetivo de cumplir los requisitos necesarios de esterilidad para su administración por vía parenteral. Teniendo en cuenta las propiedades particulares de los compuestos que forman las microesferas y las complicaciones que se pueden derivar de los métodos generales de esterilización, la radiación gamma con una dosis de 25 kGy fue el método seleccionado para esterilizar las micropartículas<sup>60, 61, 217</sup>. Además, debido a que la radiación gamma induce fenómenos de ionización que pueden provocar alteraciones tanto en el polímero como en la proteína encapsulada<sup>61, 222</sup> y que estos efectos pueden ser incrementados por el aumento de temperatura que generan las propias radiaciones en las muestras<sup>63</sup>, éstas fueron esterilizadas a temperatura ambiente, pero también protegidas del incremento de temperatura con hielo seco (-78°C), con el fin de estudiar el efecto de la temperatura durante la esterilización.

Para elaborar las formulaciones se combinaron diferentes estrategias tecnológicas con el objeto de conseguir una mayor protección del producto biotecnológico durante su encapsulación y posterior esterilización. Así, se emplearon tres métodos distintos basados en la técnica de extracción-evaporación del disolvente (A/O/A, S/O/A 1 y S/O/A 2 (incluyendo Vit E)), que permitieron encapsular GDNF incorporado inicialmente disuelto o al estado sólido. En el método A/O/A, la proteína se disolvió y se incorporó a la formulación en su estado molecular, mientras que en el segundo método, S/O/A 1, la sustancia activa fue incorporada al estado sólido en la solución polimérica. Además, se estudió la variante de la técnica S/O/A empleada en el primer trabajo experimental, S/O/A 2, que incluyó Vit E en la fase interna de la emulsión. En este método se preparó una suspensión inicial del agente neuroprotector en el vehículo oleoso (Vit E). Posteriormente, dicha suspensión se incorporó a la solución orgánica de PLGA. Para determinar la influencia de los diferentes métodos de microencapsulación y la posterior esterilización en las propiedades de las microesferas desarrolladas, se seleccionaron una serie

de parámetros y técnicas asociadas para la caracterización *in vitro* de estas formulaciones, incluyendo el estudio de la actividad biológica del factor neuroprotector en células de la retina. Esta parte del estudio se llevó a cabo durante una estancia en el Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School, Harvard University, Boston en colaboración con el Dr. Michael Young.

El primer parámetro evaluado fue la morfología, que se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido. En todos los casos se obtuvieron partículas esféricas. Sin embargo, en función del método de microencapsulación empleado la morfología de las microesferas resultó diferente. El método A/O/A dio lugar a partículas con poros grandes mientras que con el método S/O/A 1 se obtuvieron partículas con una superficie lisa. Cuando la Vit E fue incorporada en la fase orgánica de la emulsión, S/O/A 2, las microesferas presentaron algunos poros de pequeño tamaño en su superficie. En cuanto al tamaño de partícula, determinado mediante la técnica de difracción láser, se obtuvieron tamaños en el rango de 19-26  $\mu\text{m}$  para todas las formulaciones.

La eficacia de encapsulación del GDNF en las distintas formulaciones, determinada mediante la técnica de ELISA, fue superior para el método A/O/A ( $30,0 \pm 0,9\%$ ) que para el método S/O/A 1 ( $23,4 \pm 0,5\%$ ). Sin embargo, la incorporación de la Vit E en la fase interna de la emulsión, S/O/A 2, incrementó la cantidad de proteína encapsulada ( $30,4 \pm 1,1\%$ ), igualándose a la conseguida por el método de doble emulsión. Los ensayos de liberación *in vitro* de la proteína dieron lugar a perfiles trifásicos en las tres formulaciones. De forma adicional, empleando la técnica de GPC (*Gel Permeation Chromatography*) se estudió la evolución del peso molecular del polímero a lo largo del ensayo de cesión, partiendo de un peso molecular inicial de  $35076,8 \pm 292,4$  g/mol y obteniéndose un peso molecular crítico de  $13445,5 \pm 566,4$  g/mol a los 28 días del inicio del estudio.

Posteriormente, se determinó el efecto de la radiación gamma (con y sin protección frente al aumento de temperatura) en las características de las microesferas elaboradas por los tres métodos de encapsulación mediante el estudio de los parámetros anteriormente descritos. Así, tanto en la morfología

como en el tamaño de partícula de las tres formulaciones no se observaron cambios después de la esterilización (con y sin hielo seco). Sin embargo, sí se produjeron modificaciones en la proteína contenida en las microesferas y cuantificada por ELISA tras su extracción, incluso cuando las formulaciones se esterilizaron en presencia de hielo seco, observándose una reducción del 68% con respecto a la cantidad de GDNF contenida antes de la exposición a la radiación gamma en la formulación elaborada por el método A/O/A, mientras que en los métodos S/O/A 1 y S/O/A 2 la reducción fue de un 40%.

Respecto a los perfiles de liberación de GDNF, éstos mantuvieron su forma trifásica después de la esterilización (tanto en presencia como en ausencia de hielo seco). No obstante, el efecto *burst* aumentó en las tres formulaciones. Comparando los distintos métodos empleados en la fabricación de las microesferas, la técnica S/O/W 2 ofreció mejores resultados. La velocidad de liberación de la proteína disminuyó en la primera fase para las partículas elaboradas por los métodos A/O/A y S/O/A 1, mientras que quedó prácticamente inalterada cuando se empleó el método S/O/A 2. Adicionalmente, la determinación del peso molecular del PLGA tras el proceso de esterilización con protección frente al aumento de temperatura puso de manifiesto una reducción del mismo desde  $35076,8 \pm 292,4$  g/mol a  $28441,0 \pm 279,3$  g/mol, siendo muy similar en microesferas esterilizadas sin hielo seco.

Al tratarse de sistemas de liberación controlada que contienen productos biotecnológicos y están destinados a una administración intravítrea, es necesario asegurar la actividad biológica de la proteína después de su encapsulación y posterior esterilización, para lo cual se evaluó la integridad estructural y la bioactividad del agente neuroprotector. En este sentido, se realizaron ensayos de electroforesis que demostraron la existencia de bandas correspondientes a la proteína nativa (25-37 kDa) y bandas adicionales debidas a la presencia de monómeros (15-20 kDa), lo que indicaría la existencia de cambios estructurales de la proteína. Sin embargo, no podemos asegurar que estas modificaciones observadas sean consecuencia de los procesos de microencapsulación y esterilización, puesto que las soluciones de GDNF empleadas se obtuvieron a partir de la extracción del agente neuroprotector

contenido en las microesferas con un disolvente orgánico (diclorometano) que podría alterar la estructura de la proteína<sup>206</sup>.

Los resultados más relevantes se obtuvieron al determinar la actividad biológica del factor neurotrófico después de su encapsulación, esterilización y posterior liberación, que fue evaluada en cultivos primarios de células retinianas para cada una de las tres formulaciones desarrolladas. Así, se ensayaron las mismas cantidades de GDNF, cuantificadas por ELISA en el medio de liberación, para cada condición de trabajo y método de microencapsulación empleado: 250 pg para las microesferas sin esterilizar, 70 pg para las microesferas esterilizadas a baja temperatura (-78°C) y 5 pg para las microesferas esterilizadas a temperatura ambiente. En todos los casos, el porcentaje de supervivencia de células retinianas fue superior para las partículas elaboradas con el método S/O/A 2, comparado con los obtenidos mediante las técnicas A/O/A y S/O/A 1, hecho que se relaciona con una mayor protección de la estructura nativa de la proteína debido al empleo del factor neuroprotector al estado sólido y la inclusión del antioxidante. Además, para cada una de las formulaciones, se obtuvieron mejores resultados cuando la esterilización se llevó a cabo con la adición de hielo seco para evitar el incremento de temperatura. También es importante destacar que incluso pequeñas cantidades de GDNF (5 pg) resultaron activas en el incremento de la supervivencia de células de la retina comparado con el medio control (BSS).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que la inclusión de la proteína al estado sólido combinada con la adición de vitamina E en el método S/O/A 2, resultó ser el más apropiado para la encapsulación del GDNF y la posterior esterilización de los sistemas particulares desarrollados, demostrando la actividad biológica de la proteína liberada mediante el incremento en la supervivencia de células de la retina (antes y después de la esterilización), incluso para pequeñas cantidades de GDNF.

Una vez evaluada la utilidad de los nuevos sistemas de liberación controlada en el tratamiento de patologías neurodegenerativas y establecidas las mejores

condiciones para su esterilización, el objetivo del tercer trabajo experimental fue la evaluación del posible efecto antiangiogénico de la combinación del agente neurotrófico y la vitamina E encapsulados en las microesferas. Estos sistemas podrían resultar útiles en el futuro tratamiento de patologías vasculares retinianas como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE exudativa) o la retinopatía diabética (RD proliferativa) que cursan con neovascularización.

Para el desarrollo de este trabajo se prepararon dos formulaciones de microesferas de PLGA empleando la técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A 2 anteriormente descrita. La primera formulación se fabricó a partir de una suspensión de GDNF y Vit E, la segunda incluyó también el agente neurotrófico BDNF. De forma adicional, se prepararon microesferas que sólo contenían polímero o polímero y vitamina E siguiendo el mismo procedimiento. Posteriormente, las formulaciones desarrolladas se esterilizaron a baja temperatura por radiación gamma (dosis de 25 kGy).

La caracterización *in vitro* de las microesferas esterilizadas se llevó a cabo mediante el estudio de su morfología, tamaño de partícula, eficacia de encapsulación y perfil de liberación de los agentes neuroprotectores. Las partículas obtenidas fueron esféricas, con un tamaño próximo a las 25  $\mu\text{m}$  y cantidades de  $14,4 \pm 1,2$  ng GDNF/mg MSs y  $109,3 \pm 0,2$   $\mu\text{g}$  Vit E/mg MSs para la formulación GDNF/Vit E y  $29,8 \pm 3,2$  ng GDNF/mg MSs,  $14,6 \pm 1,9$  ng BDNF/mg MSs y  $193,3 \pm 3,3$   $\mu\text{g}$  Vit E/mg MSs para la formulación GDNF/BDNF/VitE. Las formulaciones desarrolladas permitieron la liberación sostenida de los agentes neurotróficos durante 84 días, presentando una cesión inicial elevada de los agentes neuroprotectores del orden de ng/mg MSs.

La tolerancia *in vitro* de los sistemas biodegradables elaborados se determinó utilizando la técnica MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide), un ensayo colorimétrico que mide la actividad enzimática de las células tras ser expuestas a distintas cantidades de microesferas de

cada formulación (40 y 80 µg). Las líneas celulares empleadas fueron células endoteliales humanas de cordón umbilical (*Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC*) y células del epitelio pigmentario de la retina (*Adult human retinal pigment epithelial cells, ARPE-19*), observándose en ambos casos la ausencia de toxicidad de las preparaciones con valores de viabilidad próximos al 100%.

Una vez demostrada la ausencia de citotoxicidad de las formulaciones en las líneas celulares ensayadas, se evaluó el efecto antiangiogénico de los componentes encapsulados en las microesferas (GDNF, BDNF y Vit E). Para ello, se llevó a cabo un ensayo que permitió monitorizar la formación de capilares en células endoteliales (HUVEC) incluidas en una matriz artificial (Matrigel®). Esta matriz está compuesta por una mezcla gelatinosa de proteínas, similar al ambiente extracelular de los tejidos, y se usa normalmente como sustrato en el cultivo de células endoteliales puesto que permite el crecimiento celular en forma de red, tal y como sucede en los estadios finales de la angiogénesis. La formulación de microesferas (40 and 80 µg) cargadas con GDNF y vitamina E empleadas en el ensayo, demostraron inhibir la formación de nuevos capilares sanguíneos utilizando como control negativo una solución de BSS, indicando la actividad antiangiogénica de las formulaciones ensayadas. Es importante destacar, que la adición de BDNF a las microesferas no aumenta el efecto antiangiogénico observado para la combinación de GDNF y Vit E. Sin embargo, la incorporación de este agente podría resultar útil como neuroprotector ya que se ha demostrado que la administración de este factor junto con GDNF tienen un efecto neuroprotector parcialmente aditivo<sup>212, 230</sup>. La terapia conjunta anti-VEGF y agentes neuroprotectores podría resultar una estrategia terapéutica muy prometedora tal y como indican algunos autores<sup>234</sup>.

Además es necesario señalar, que las microesferas que tan solo contienen vitamina E también han demostrado inhibir el proceso antiangiogénico en las células endoteliales.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, las microesferas de PLGA cargadas con agentes neuroprotectores en combinación con el agente antioxidante (vitamina E) podrían resultar una estrategia, alternativa o complementaria, interesante en el tratamiento de la neovascularización coroidal asociada a diversas retinopatías crónicas como la DMAE o la RD.

El desarrollo de formulaciones como las que se han propuesto en esta Tesis Doctoral requiere la puesta a punto del método de microencapsulación y la optimización de la formulación. Para ello, previamente a estos tres trabajos de investigación presentados se llevaron a cabo ensayos preliminares de encapsulación del factor neuroprotector (GDNF) y el agente oleoso (Vitamina E) en microesferas biodegradables de PLGA. Parte de estos resultados han sido recogidos en un artículo corto (*note*).

El objetivo de estos estudios preliminares fue evaluar el efecto de la adición de vitamina E en la encapsulación del agente neurotrófico así como en la modulación de su liberación y en la distribución de ambos componentes (proteína y aditivo oleoso) en las microesferas, para seleccionar la combinación proteína/vitamina E más favorable. Con este fin, se elaboraron varias formulaciones de microesferas utilizando distintas cantidades del producto biotecnológico y del aceite, empleando la técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A 2 anteriormente descrita. Este método se basa en la preparación de una suspensión inicial de la proteína en el aceite y su posterior incorporación en la disolución orgánica polimérica.

La caracterización *in vitro* de las microesferas se llevó a cabo mediante el estudio del tamaño de partícula, la morfología, eficacia de encapsulación y perfil de liberación del agente neuroprotector. Además, se estudió la distribución de ambos componentes (proteína y aditivo) en el interior de la matriz polimérica y la estructura interna de las partículas.

El método de microencapsulación desarrollado en este trabajo se optimizó para obtener un tamaño de partícula de las microesferas que permita su administración en forma de suspensión, mediante una inyección convencional,

empleando las agujas que normalmente se utilizan en administraciones intravítreas (27-34G)<sup>31</sup>. Así, en todas las formulaciones elaboradas se obtuvieron microesferas con un tamaño medio próximo a las 20  $\mu\text{m}$ .

La morfología estudiada por microscopía electrónica de barrido permitió observar partículas esféricas y bien definidas en todos los casos. Como se indicó anteriormente, la presencia o ausencia del aditivo oleoso modificó la apariencia de las mismas. Las microesferas elaboradas sin vitamina E presentaron una superficie lisa. Por el contrario, se observaron poros superficiales de pequeño tamaño cuando el aceite fue incorporado a la fase interna de la emulsión.

La estructura interna de las microesferas fue evaluada mediante microscopía confocal, añadiendo a la formulación un marcador fluorescente (rojo nilo) con elevada afinidad por el PLGA<sup>235</sup>. Los resultados obtenidos permiten observar sistemas matriciales típicos de microesferas elaboradas mediante la técnica de extracción-evaporación del disolvente, con algunos poros grandes que atraviesan la matriz polimérica y poros más pequeños en la superficie cuando se incorpora vitamina E a la formulación.

También se estudió por microscopía confocal la distribución de los componentes (proteína y aditivo oleoso) en el interior de las partículas. Para la realización de estos ensayos fue necesario tanto el empleo de una proteína modelo como el de un lípido fluorescente, puesto que ninguno de los dos componentes (GDNF y vitamina E) existen en el mercado marcados con fluorescencia. Así, se prepararon las seis diferentes formulaciones combinando distintas cantidades de albúmina sérica humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (HSA-FITC) y vitamina E acompañada de dihexadecanoil-glicero-fosfoetanolamina marcado con tetrametilrodamina (DHPE-TRITC) que presenta afinidad por compuestos oleosos. Los resultados obtenidos demostraron que el aceite se encontró homogéneamente distribuido por toda la matriz polimérica, aunque parece apreciarse una mayor intensidad de fluorescencia en la superficie de las partículas. La proteína se distribuyó de forma homogénea en aquellas formulaciones que no incluían vitamina E. Sin embargo, cuando el

agente oleoso fue incorporado a las microesferas la señal fluorescente de la proteína se intensificó en la superficie de las partículas formando un anillo. Después de que estas formulaciones fueran puestas en contacto con medio de cesión durante 24 h, se pudo observar una disminución en la fluorescencia en las formulaciones preparadas sin vitamina E y una casi completa desaparición del anillo en aquellas que se elaboraron con distintas cantidades de aceite.

En cuanto a la cesión del agente neuroprotector a partir de las microesferas, en todas las formulaciones desarrolladas se obtuvieron perfiles trifásicos y en todos los casos la liberación de GDNF se llevó a cabo durante varios meses. La composición de las distintas formulaciones y la distribución de los componentes en la matriz polimérica influyeron en el perfil de liberación y en la eficacia de encapsulación del factor neuroprotector. Así, la incorporación de vitamina E en las formulaciones incrementó la eficacia de encapsulación, disminuyó la cantidad de proteína liberada en las primeras 24 horas y consiguió modular la liberación de GDNF incrementando la duración de la segunda fase de cesión, donde la proteína es liberada a mayor velocidad.

En definitiva, los resultados obtenidos en este trabajo nos permitieron seleccionar la formulación elaborada con 20 µg de proteína y 20 µl de aditivo oleosos en 200 mg de PLGA, como la más adecuada para el desarrollo de los estudios posteriores.

Como se comentó anteriormente en el apartado de *Objetivos y Planteamiento* (Pág. 83), el origen de esta tesis hay que buscarlo en un trabajo previo llevado a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Michael J. Young. En este trabajo se procedió a la encapsulación de MMP2 (metaloproteinasa 2) en partículas biodegradables de PLGA para su inyección subretiniana.

Para conseguir una implantación efectiva de células de la retina es necesaria la ruptura de la barrera formada por la matriz extracelular inhibitoria y las moléculas de adhesión celular, como el CD44 y el neurocan. Se sabe que la MMP2 puede degradar estos componentes promoviendo la integración de las células retinianas. Por tanto, en este trabajo se evaluó la implantación conjunta

de células progenitoras de la retina (CPR) junto a sistemas capaces de liberar progresivamente MMP2.

Este trabajo requería el desarrollo de microesferas porosas que permitieran una liberación *burst* elevada (adecuada para el momento inicial de la implantación), seguida de una cesión posterior más prolongada. Para ello, se prepararon 2 formulaciones empleando la técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión A/O/A. La primera de ellas fue elaborada con PLGA Resomer® 502 (Peso molecular = 14000 g/mol), mientras que para la segunda se empleó PLGA Resomer® 503 (Peso molecular = 35000 g/mol). Ambas formulaciones se separaron en diferentes fracciones granulométricas (2-10 µm; 10-20 µm y 20-40 µm).

La caracterización *in vitro* de las microesferas se llevó a cabo mediante el estudio del tamaño de partícula, la morfología, eficacia de encapsulación y perfil de liberación del agente neuroprotector utilizando las técnicas anteriormente descritas.

En base a los resultados *in vitro* obtenidos, la formulación elaborada con PLGA Resomer® 502 con un tamaño de partícula comprendido entre 10-20 µm se seleccionó para su posterior implantación con CPR, ya que ofreció un perfil de liberación con una cesión rápida inicial seguida de una cesión más lenta durante una semana, perfil buscado para el posterior estudio *in vivo*.

La implantación subretiniana de la formulación seleccionada junto a las células progenitoras de la retina, promovieron una degeneración significativa de CD44 y neurocan en la superficie externa de la retina, que resultó en un incremento de la integración celular sin alterar la retina huésped. Esta prueba de concepto demostró que las microesferas desarrolladas ofrecieron una herramienta útil y efectiva para la reparación de daño retiniano.

Los resultados obtenidos en este trabajo dieron pie a plantearse la microencapsulación de otras proteínas de interés farmacológico en el tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior del ojo.

# CONCLUSIONES



## 6 CONCLUSIONES

1. La técnica de microencapsulación desarrollada en este trabajo resulta útil para la encapsulación de productos biotecnológicos y su posterior liberación controlada durante varios meses, manteniéndose su actividad biológica.
2. La formulación de microesferas desarrollada en este trabajo ha demostrado su eficacia en un modelo animal de glaucoma durante al menos 11 semanas. La administración de este tipo de preparados como una inyección convencional resultaría de utilidad como herramienta terapéutica en patologías neurodegenerativas oculares crónicas, en las que se necesitan concentraciones de la sustancia activa mantenidas a lo largo del tiempo.
3. La combinación de distintos recursos tecnológicos como son la utilización de la proteína al estado sólido, la inclusión de antioxidantes en la formulación y la exposición a la radiación gamma a baja temperatura, resulta útil en la protección de los compuestos biológicos ensayados durante la esterilización del producto.
4. Las microesferas biodegradables cargadas con GDNF y vitamina E han demostrado inhibir la angiogenesis en estudios *in vitro* llevados a cabo con células endoteliales. La combinación de agentes neurotróficos y antioxidantes en los sistemas biodegradables desarrollados podría resultar una estrategia interesante, como coadyuvante o alternativa, a la terapia anti-VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial) en patologías crónicas, como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o la retinopatía diabética (RD), en las que está implicada la neovascularización.
5. La terapia combinada de agentes neuroprotectores y antioxidantes incluidos en la formulación resulta una estrategia de interés en el tratamiento de patologías crónicas de origen multifactorial en cuya patogénesis están implicados diversos mecanismos.



# BIBLIOGRAFÍA



---

**7 BIBLIOGRAFÍA**

1. Honrubia F. *Oftalmología General*. Zaragoza: EbroLibro SL; 2001:p. 19-38.
2. Sobotta J, Reinhard P. *Atlas de anatomía humana. Madrid Panamericana*; 2006.
3. Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK. Ocular drug delivery. *AAPS J* 2010;12:348-360.
4. Yasukawa T, Ogura Y, Tabata Y, Kimura H, Wiedemann P, Honda Y. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res* 2004;23:253-281.
5. Geroski DH, Edelhauser HF. Drug delivery for posterior segment eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:961-964.
6. Eljarrat-Binstock E, Pe'er J, Domb AJ. New techniques for drug delivery to the posterior eye segment. *Pharm Res* 2010;27:530-543.
7. Thrimawithana TR, Young S, Bunt CR, Green C, Alany RG. Drug delivery to the posterior segment of the eye. *Drug Discov Today* 2011;16:270-277.
8. Hughes PM, Olejnik O, Chang-Lin JE, Wilson CG. Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:2010-2032.
9. Gaudana R, Jwala J, Boddu SH, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharm Res* 2009;26:1197-1216.
10. Del Amo EM, Urtili A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. *Drug Discov Today* 2008;13:135-143.
11. Urtili A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:1131-1135.
12. Hosoya K, Lee VH, Kim KJ. Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;60:227-240.
13. Kompella UB, Kadam RS, Lee VH. Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Ther Deliv* 2010;1:435-456.

14. Shah SS, Denham LV, Elison JR, et al. Drug delivery to the posterior segment of the eye for pharmacologic therapy. *Expert Rev Ophthalmol* 2010;5:75-93.
15. Janoria KG, Gunda S, Boddu SH, Mitra AK. Novel approaches to retinal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2007;4:371-388.
16. Ranta VP, Urtti A. Transscleral drug delivery to the posterior eye: prospects of pharmacokinetic modeling. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:1164-1181.
17. Raghava S, Hammond M, Kompella UB. Periocular routes for retinal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2004;1:99-114.
18. Kompella UB, Bandi N, Ayalasomayajula SP. Subconjunctival nano- and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1192-1201.
19. Weijtens O, Feron EJ, Schoemaker RC, et al. High concentration of dexamethasone in aqueous and vitreous after subconjunctival injection. *Am J Ophthalmol* 1999;128:192-197.
20. Ghatge D, Brooks W, McCarey BE, Edelhauser HF. Pharmacokinetics of intraocular drug delivery by periocular injections using ocular fluorophotometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2230-2237.
21. Viores SA. Anecortave (Alcon Laboratories). *IDrugs* 2005;8:327-334.
22. Van de Moere A, Sandhu SS, Kak R, Mitchell KW, Talks SJ. Effect of posterior juxtасcleral triamcinolone acetonide on choroidal neovascular growth after photodynamic therapy with verteporfin. *Ophthalmology* 2005;112:1896-1903.
23. Alhassan MB, Kyari F, Ejere HO. Peribulbar versus retrobulbar anaesthesia for cataract surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;CD004083.
24. Scalinci SZ, Scorolli L, Corradetti G, et al. Potential role of intravitreal human placental stem cell implants in inhibiting progression of diabetic retinopathy in type 2 diabetes: neuroprotective growth factors in the vitreous. *Clin Ophthalmol* 2011;5:691-696.

25. Siqueira RC, Messias A, Voltarelli JC, Scott IU, Jorge R. Intravitreal injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells for hereditary retinal dystrophy: A Phase I Trial. *Retina* 2011;31:1207-1214.
26. Myung JS, Aaker GD, Kiss S. Treatment of noninfectious posterior uveitis with dexamethasone intravitreal implant. *Clin Ophthalmol* 2010;4:1423-1426.
27. Rechtman E, Stalmans I, Glovinsky J, et al. The effect of intravitreal bevacizumab (Avastin) on ocular pulse amplitude in neovascular age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol* 2011;5:37-44.
28. Jiang C, Moore MJ, Zhang X, Klassen H, Langer R, Young M. Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma. *Mol Vis* 2007;13:1783-1792.
29. Veloso AA, Jr., Zhu Q, Herrero-Vanrell R, Refojo MF. Ganciclovir-loaded polymer microspheres in rabbit eyes inoculated with human cytomegalovirus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:665-675.
30. Jaissle GB, Ulmer A, Henke-Fahle S, Fierlbeck G, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Suppression of melanoma-associated neovascularization by bevacizumab. *Arch Dermatol* 2008;144:525-527.
31. Herrero-Vanrell R, Refojo MF. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;52:5-16.
32. Jager RD, Aiello LP, Patel SC, Cunningham ET, Jr. Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. *Retina* 2004;24:676-698.
33. Weiner AL, Gilger BC. Advancements in ocular drug delivery. *Vet Ophthalmol* 2010;13:395-406.
34. Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J Drug Deliv* 2011;86:3734.
35. Elorza B, Elorza MA, Sainz MC, Chantres JR. Comparison of particle size and encapsulation parameters of three liposomal preparations. *J Microencapsul* 1993;10:237-248.
36. Smolin G, Okumoto M, Feiler S, Condon D. Idoxuridine-liposome therapy for herpes simplex keratitis. *Am J Ophthalmol* 1981;91:220-225.
37. Zhang R, He R, Qian J, Guo J, Xue K, Yuan YF. Treatment of experimental autoimmune uveoretinitis with intravitreal injection of tacrolimus

(FK506) encapsulated in liposomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:3575-3582.

38. Camelo S, Lajavardi L, Bochot A, et al. Ocular and systemic bio-distribution of rhodamine-conjugated liposomes loaded with VIP injected into the vitreous of Lewis rats. *Mol Vis* 2007;13:2263-2274.

39. Bochot A, Fattal E, Boutet V, et al. Intravitreal delivery of oligonucleotides by sterically stabilized liposomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:253-259.

40. Short BG. Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations. *Toxicol Pathol* 2008;36:49-62.

41. Wu XS, Wang N. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: biodegradation. *J Biomater Sci Polym Ed* 2001;12:21-34.

42. Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 1996;17:103-114.

43. Park TG. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials* 1995;16:1123-1130.

44. Wu XS. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: Part III. Drug delivery application. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2004;32:575-591.

45. Khoobehi B, Stradtman MO, Peyman GA, Aly OM. Clearance of sodium fluorescein incorporated into microspheres from the vitreous after intravitreal injection. *Ophthalmic Surg* 1991;22:175-180.

46. Giordano GG, Chevez-Barrios P, Refojo MF, Garcia CA. Biodegradation and tissue reaction to intravitreal biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic)acid microspheres. *Curr Eye Res* 1995;14:761-768.

47. Hsu J. Drug delivery methods for posterior segment disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2007;18:235-239.

48. Moritera T, Ogura Y, Yoshimura N, et al. Biodegradable microspheres containing adriamycin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:3125-3130.

49. Barcia E, Herrero-Vanrell R, Diez A, Alvarez-Santiago C, Lopez I, Calonge M. Downregulation of endotoxin-induced uveitis by intravitreal injection

of polylactic-glycolic acid (PLGA) microspheres loaded with dexamethasone. *Exp Eye Res* 2009;89:238-245.

50. Ward MS, Khoobehi A, Lavik EB, Langer R, Young MJ. Neuroprotection of retinal ganglion cells in DBA/2J mice with GDNF-loaded biodegradable microspheres. *J Pharm Sci* 2007;96:558-568.

51. Xu J, Wang Y, Li Y, et al. Inhibitory efficacy of intravitreal dexamethasone acetate-loaded PLGA nanoparticles on choroidal neovascularization in a laser-induced rat model. *J Ocul Pharmacol Ther* 2007;23:527-540.

52. Amrite AC, Ayalasomayajula SP, Cheruvu NP, Kompella UB. Single periocular injection of celecoxib-PLGA microparticles inhibits diabetes-induced elevations in retinal PGE<sub>2</sub>, VEGF, and vascular leakage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1149-1160.

53. de Kozak Y, Andrieux K, Villarroja H, et al. Intraocular injection of tamoxifen-loaded nanoparticles: a new treatment of experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur J Immunol* 2004;34:3702-3712.

54. Moritera T, Ogura Y, Honda Y, Wada R, Hyon SH, Ikada Y. Microspheres of biodegradable polymers as a drug-delivery system in the vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:1785-1790.

55. Giordano GG, Refojo MF, Arroyo MH. Sustained delivery of retinoic acid from microspheres of biodegradable polymer in PVR. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2743-2751.

56. He Y, Liu Y, Wang J, et al. Cyclosporine-loaded microspheres for treatment of uveitis: in vitro characterization and in vivo pharmacokinetic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3983-3988.

57. Gomes Dos Santos AL, Bochot A, Fattal E. Intraocular delivery of oligonucleotides. *Curr Pharm Biotechnol* 2005;6:7-15.

58. Cardillo JA, Souza-Filho AA, Oliveira AG. Intravitreal Bioerudivel sustained-release triamcinolone microspheres system (RETAAC). Preliminary report of its potential usefulness for the treatment of diabetic macular edema. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2006;81:675-677, 679-681.

59. Martinez-Sancho C, Herrero-Vanrell R, Negro S. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of aciclovir: influence of fatty and non-fatty additives. *J Microencapsul* 2003;20:799-810.

60. Hausberger AG, Kenley RA, DeLuca PP. Gamma irradiation effects on molecular weight and in vitro degradation of poly(D,L-lactide-CO-glycolide) microparticles. *Pharm Res* 1995;12:851-856.
61. Montanari L, Costantini M, Signoretti EC, et al. Gamma irradiation effects on poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Control Release* 1998;56:219-229.
62. Herrero-Vanrell R, Ramirez L, Fernandez-Carballido A, Refojo MF. Biodegradable PLGA microspheres loaded with ganciclovir for intraocular administration. Encapsulation technique, in vitro release profiles, and sterilization process. *Pharm Res* 2000;17:1323-1328.
63. Fernandez-Carballido A, Puebla P, Herrero-Vanrell R, Pastoriza P. Radiosterilisation of indomethacin PLGA/PEG-derivative microspheres: protective effects of low temperature during gamma-irradiation. *Int J Pharm* 2006;313:129-135.
64. Yasukawa T, Tabata Y, Kimura H, Ogura Y. Recent advances in intraocular drug delivery systems. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2011;5:1-10.
65. Yasukawa T, Ogura Y, Kimura H, Sakurai E, Tabata Y. Drug delivery from ocular implants. *Expert Opin Drug Deliv* 2006;3:261-273.
66. Bourges JL, Bloquel C, Thomas A, et al. Intraocular implants for extended drug delivery: therapeutic applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:1182-1202.
67. Choonara YE, Pillay V, Danckwerts MP, Carmichael TR, du Toit LC. A review of implantable intravitreal drug delivery technologies for the treatment of posterior segment eye diseases. *J Pharm Sci* 2010;99:2219-2239.
68. Fischer N, Narayanan R, Loewenstein A, Kuppermann BD. Drug delivery to the posterior segment of the eye. *Eur J Ophthalmol* 2010;21:20-26.
69. Kuno N, Fujii S. Biodegradable intraocular therapies for retinal disorders: progress to date. *Drugs Aging* 2010;27:117-134.
70. Lee SS, Hughes P, Ross AD, Robinson MR. Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. *Pharm Res* 2010;27:2043-2053.
71. Hashizoe M, Ogura Y, Takanashi T, Kunou N, Honda Y, Ikada Y. Biodegradable polymeric device for sustained intravitreal release of ganciclovir in rabbits. *Curr Eye Res* 1997;16:633-639.

- 
72. Miyamoto H, Ogura Y, Hashizoe M, Kunou N, Honda Y, Ikada Y. Biodegradable scleral implant for intravitreal controlled release of fluconazole. *Curr Eye Res* 1997;16:930-935.
73. Morita Y, Ohtori A, Kimura M, Tojo K. Intravitreal delivery of dexamethasone sodium m-sulfobenzoate from poly(DL-lactic acid) implants. *Biol Pharm Bull* 1998;21:188-190.
74. Sakurai E, Nozaki M, Okabe K, Kunou N, Kimura H, Ogura Y. Scleral plug of biodegradable polymers containing tacrolimus (FK506) for experimental uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4845-4852.
75. Kuppermann BD, Loewenstein A. Drug delivery to the posterior segment of the eye. *Dev Ophthalmol* 2010;47:59-72.
76. Peng YJ, Kau YC, Wen CW, Liu KS, Liu SJ. Solvent-free biodegradable scleral plugs providing sustained release of vancomycin, amikacin, and dexamethasone--an in vivo study. *J Biomed Mater Res A* 2010;94:426-432.
77. Peng YJ, Wen CW, Chiou SH, Liu SJ. Sustained release of ganciclovir and foscarnet from biodegradable scleral plugs for the treatment of cytomegalovirus retinitis. *Biomaterials* 2010;31:1773-1779.
78. Palakurthi NK, Correa ZM, Augsburger JJ, Banerjee RK. Toxicity of a biodegradable microneedle implant loaded with methotrexate as a sustained release device in normal rabbit eye: a pilot study. *J Ocul Pharmacol Ther* 2011;27:151-156.
79. Klein R, Cruickshanks KJ, Nash SD, et al. The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors. *Arch Ophthalmol* 2010;128:750-758.
80. Klein R, Chou CF, Klein BE, Zhang X, Meuer SM, Saaddine JB. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. *Arch Ophthalmol* 2011;129:75-80.
81. Zhang K, Hopkins JJ, Heier JS, et al. Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:6241-6245.
82. James B, Chew C, Bron A. Lecture notes on ophthalmology. Malden, MA: Blackwell publishing; 2003:p115-134.

83. Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res* 2004;23:561-577.
84. Keane PA, Tufail A, Patel PJ. Management of neovascular age-related macular degeneration in clinical practice: initiation, maintenance, and discontinuation of therapy. *J Ophthalmol* 2011;75:2543.
85. Sánchez JG, Anton A, Gómez AC, et al. Neuroprotección y glaucoma. Madrid: Editores Médicos, S.A.; 2002:p. 71-88.
86. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006;90:262-267.
87. Schuman JS. Antiglaucoma medications: a review of safety and tolerability issues related to their use. *Clin Ther* 2000;22:167-208.
88. Kanski J. *Oftalmología Clínica*. Madrid: Elsevier; 2005:195-275.
89. Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:764-774.
90. Wang N, Zeng M, Ruan Y, et al. Protection of retinal ganglion cells against glaucomatous neuropathy by neurotrophin-producing, genetically modified neural progenitor cells in a rat model. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:1394-1400.
91. Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, et al. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4357-4365.
92. Clement-Casado F. *Oftalmología*. Madrid: Luzán 5, S.A de Ediciones; 1994 p.279-294.
93. Villarreal M, Ciudin A, Hernandez C, Simo R. Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy. *World J Diabetes* 2010;1:57-64.
94. Yanai R, Thanos A, Connor KM. Complement involvement in neovascular ocular diseases. *Adv Exp Med Biol* 2012;946:161-183.
95. Kimoto K, Kubota T. Anti-VEGF Agents for Ocular Angiogenesis and Vascular Permeability. *J Ophthalmol* 2012;85:2183.

96. Nishikiori N, Osanai M, Chiba H, et al. Glial cell-derived cytokines attenuate the breakdown of vascular integrity in diabetic retinopathy. *Diabetes* 2007;56:1333-1340.
97. Dantas A. Tratado de neurooftalmología. Barcelona: Editorial JIMS; 1985;p.1303-1394.
98. Stieger K, Lorenz B. Gene therapy for vision loss -- recent developments. *Discov Med* 2010;10:425-433.
99. Berson EL. Nutrition and retinal degenerations. Vitamin A, taurine, ornithine, and phytanic acid. *Retina* 1982;2:236-255.
100. Dalkara D, Kolstad KD, Guerin KI, et al. AAV mediated GDNF secretion from retinal glia slows down retinal degeneration in a rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 2011;19:1602-1608.
101. Leonard KC, Petrin D, Coupland SG, et al. XIAP protection of photoreceptors in animal models of retinitis pigmentosa. *PLoS One* 2007;2:e314.
102. Sahni JN, Angi M, Irigoyen C, Semeraro F, Romano MR, Parmeggiani F. Therapeutic challenges to retinitis pigmentosa: from neuroprotection to gene therapy. *Curr Genomics* 2011;12:276-284.
103. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies - disease mechanisms and therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 2011;30:81-114.
104. Fraser JA, Biousse V, Newman NJ. The neuro-ophthalmology of mitochondrial disease. *Surv Ophthalmol* 2010;55:299-334.
105. Chinnery P, Majamaa K, Turnbull D, Thorburn D. Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;CD004426.
106. Newman NJ, Biousse V, David R, et al. Prophylaxis for second eye involvement in leber hereditary optic neuropathy: an open-labeled, nonrandomized multicenter trial of topical brimonidine purite. *Am J Ophthalmol* 2005;140:407-415.
107. Aloe L. Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. *Trends Cell Biol* 2004;14:395-399.
108. Baltmr A, Duggan J, Nizari S, Salt TE, Cordeiro MF. Neuroprotection in glaucoma - Is there a future role? *Exp Eye Res* 2010;91:554-566.

109. Cheung W, Guo L, Cordeiro MF. Neuroprotection in glaucoma: drug-based approaches. *Optom Vis Sci* 2008;85:406-416.
110. Ritch R. Complementary therapy for the treatment of glaucoma: a perspective. *Ophthalmol Clin North Am* 2005;18:597-609.
111. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
112. Nickells RW, Zack DJ. Apoptosis in ocular disease: a molecular overview. *Ophthalmic Genet* 1996;17:145-165.
113. McKinnon SJ. Glaucoma, apoptosis, and neuroprotection. *Curr Opin Ophthalmol* 1997;8:28-37.
114. Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 1957;58:193-201.
115. Lipton SA. Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx* 2004;1:101-110.
116. Dahlmann-Noor AH, Vijay S, Limb GA, Khaw PT. Strategies for optic nerve rescue and regeneration in glaucoma and other optic neuropathies. *Drug Discov Today* 2010;15:287-299.
117. Hare W, WoldeMussie E, Lai R, et al. Efficacy and safety of memantine, an NMDA-type open-channel blocker, for reduction of retinal injury associated with experimental glaucoma in rat and monkey. *Surv Ophthalmol* 2001;45 Suppl 3:S284-289; discussion S295-286.
118. Osborne NN. Recent clinical findings with memantine should not mean that the idea of neuroprotection in glaucoma is abandoned. *Acta Ophthalmol* 2009;87:450-454.
119. Tsuda K. Neuroprotective effects of MK-801 and catecholamine release in the central nervous system. *Stroke* 2004;35:e96.
120. Russelakis-Carneiro M, Silveira LC, Perry VH. Factors affecting the survival of cat retinal ganglion cells after optic nerve injury. *J Neurocytol* 1996;25:393-402.
121. Chaudhary P, Ahmed F, Sharma SC. MK801-a neuroprotectant in rat hypertensive eyes. *Brain Res* 1998;792:154-158.

122. Osborne NN, Chidlow G, Layton CJ, Wood JP, Casson RJ, Melena J. Optic nerve and neuroprotection strategies. *Eye (Lond)* 2004;18:1075-1084.
123. Orsucci D, Mancuso M, Ienco EC, Logerfo A, Siciliano G. Targeting Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration by Means of Coenzyme Q10 and its Analogues. *Curr Med Chem* 2011;18:4053-4064.
124. Nakajima Y, Inokuchi Y, Nishi M, Shimazawa M, Otsubo K, Hara H. Coenzyme Q10 protects retinal cells against oxidative stress in vitro and in vivo. *Brain Res* 2008;1226:226-233.
125. Hirooka K, Tokuda M, Miyamoto O, Itano T, Baba T, Shiraga F. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) provides a neuroprotective effect on retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Curr Eye Res* 2004;28:153-157.
126. Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. *J Neurochem* 2000;74:2268-2277.
127. Agorastos A, Huber CG. The role of melatonin in glaucoma: implications concerning pathophysiological relevance and therapeutic potential. *J Pineal Res* 2011;50:1-7.
128. Kilic E, Hermann DM, Isenmann S, Bahr M. Effects of pinealectomy and melatonin on the retrograde degeneration of retinal ganglion cells in a novel model of intraorbital optic nerve transection in mice. *J Pineal Res* 2002;32:106-111.
129. Guo L, Salt TE, Luong V, et al. Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13444-13449.
130. Tezel G, Hernandez R, Wax MB. Immunostaining of heat shock proteins in the retina and optic nerve head of normal and glaucomatous eyes. *Arch Ophthalmol* 2000;118:511-518.
131. Ishii Y, Kwong JM, Caprioli J. Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1982-1992.
132. Danesh-Meyer HV. Neuroprotection in glaucoma: recent and future directions. *Curr Opin Ophthalmol* 2011;22:78-86.

133. Kurihara T, Ozawa Y, Ishida S, Okano H, Tsubota K. Renin-Angiotensin system hyperactivation can induce inflammation and retinal neural dysfunction. *Int J Inflam* 2012;2012:581695.
134. Ha SK, Moon E, Ju MS, et al. 6-Shogaol, a ginger product, modulates neuroinflammation: A new approach to neuroprotection. *Neuropharmacology* 2012.
135. Kipnis J, Yoles E, Porat Z, et al. T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7446-7451.
136. Bakalash S, Kessler A, Mizrahi T, Nussenblatt R, Schwartz M. Antigenic specificity of immunoprotective therapeutic vaccination for glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3374-3381.
137. Schori H, Kipnis J, Yoles E, et al. Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3398-3403.
138. Laengle UW, Markstein R, Pralet D, Seewald W, Roman D. Effect of GLC756, a novel mixed dopamine D1 receptor antagonist and dopamine D2 receptor agonist, on TNF-alpha release in vitro from activated rat mast cells. *Exp Eye Res* 2006;83:1335-1339.
139. Johnson EC, Guo Y, Cepurna WO, Morrison JC. Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: lessons from rat glaucoma models. *Exp Eye Res* 2009;88:808-815.
140. Qu J, Wang D, Grosskreutz CL. Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma. *Exp Eye Res* 2010;91:48-53.
141. Perez MT, Caminos E. Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci Lett* 1995;183:96-99.
142. Vecino E, Garcia-Crespo D, Garcia M, Martinez-Millan L, Sharma SC, Carrascal E. Rat retinal ganglion cells co-express brain derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor TrkB. *Vision Res* 2002;42:151-157.
143. Minckler DS, Bunt AH, Johanson GW. Orthograde and retrograde axoplasmic transport during acute ocular hypertension in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:426-441.

- 
144. Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, et al. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3460-3466.
145. Mey J, Thanos S. Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res* 1993;602:304-317.
146. Ji JZ, Elyaman W, Yip HK, et al. CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats: the possible involvement of STAT3 pathway. *Eur J Neurosci* 2004;19:265-272.
147. Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1632-1636.
148. Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:489-500.
149. Chen H, Weber AJ. BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:966-974.
150. Chidlow G, Wood JP, Casson RJ. Pharmacological neuroprotection for glaucoma. *Drugs* 2007;67:725-759.
151. Koeberle PD, Ball AK. Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy. *Vision Res* 1998;38:1505-1515.
152. Chen ZY, He ZY, He C, Lu CL, Wu XF. Human glial cell-line-derived neurotrophic factor: a structure-function analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:692-696.
153. Haniu M, Hui J, Young Y, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor: selective reduction of the intermolecular disulfide linkage and characterization of its disulfide structure. *Biochemistry* 1996;35:16799-16805.
154. Hui JO, Chow DT, Markell D, et al. Identification of Asp95 as the site of succinimide formation in recombinant human glial cell line-derived neurotrophic factor. *Arch Biochem Biophys* 1998;358:377-384.

155. Wordinger RJ, Lambert W, Agarwal R, Liu X, Clark AF. Cells of the human optic nerve head express glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and the GDNF receptor complex. *Mol Vis* 2003;9:249-256.
156. Eketjall S, Fainzilber M, Murray-Rust J, Ibanez CF. Distinct structural elements in GDNF mediate binding to GFRalpha1 and activation of the GFRalpha1-c-Ret receptor complex. *EMBO J* 1999;18:5901-5910.
157. Lucini C, Maruccio L, Patrino M, Martinello T, Mascarello F, Castaldo L. Glial cell line-derived neurotrophic factor expression in the retina of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett* 2007;429:156-160.
158. Aubert-Pouessel A, Venier-Julienne MC, Clavreul A, et al. In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres. *J Control Release* 2004;95:463-475.
159. Andrieu-Soler C, Aubert-Pouessel A, Doat M, et al. Intravitreal injection of PLGA microspheres encapsulating GDNF promotes the survival of photoreceptors in the rd1/rd1 mouse. *Mol Vis* 2005;11:1002-1011.
160. Politi LE, Rotstein NP, Carri NG. Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: additive protection with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:3008-3015.
161. O'Leary PD, Hughes RA. Design of potent peptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 2003;278:25738-25744.
162. Koennings S, Sapin A, Blunk T, Menei P, Goepferich A. Towards controlled release of BDNF--manufacturing strategies for protein-loaded lipid implants and biocompatibility evaluation in the brain. *J Control Release* 2007;119:163-172.
163. Barbacid M. Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1995;766:442-458.
164. Lambert WS, Clark AF, Wordinger RJ. Effect of exogenous neurotrophins on Trk receptor phosphorylation, cell proliferation, and neurotrophin secretion by cells isolated from the human lamina cribrosa. *Mol Vis* 2004;10:289-296.
165. Fletcher JM, Morton CJ, Zwar RA, Murray SS, O'Leary PD, Hughes RA. Design of a conformationally defined and proteolytically stable circular mimetic of brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 2008;283:33375-33383.

166. Whitmire W, Al-Gayyar MM, Abdelsaid M, Yousufzai BK, El-Remessy AB. Alteration of growth factors and neuronal death in diabetic retinopathy: what we have learned so far. *Mol Vis* 2011;17:300-308.
167. Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC. The combined effect of brain-derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2967-2971.
168. Lewis GP, Linberg KA, Geller SF, Guerin CJ, Fisher SK. Effects of the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor in an experimental model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1530-1544.
169. Engin KN, Engin G, Kucuksahin H, Oncu M, Guvener B. Clinical evaluation of the neuroprotective effect of alpha-tocopherol against glaucomatous damage. *Eur J Ophthalmol* 2007;17:528-533.
170. Lien EL, Hammond BR. Nutritional influences on visual development and function. *Prog Retin Eye Res* 2011;30:188-203.
171. Stahl W, Sies H. Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002;15:291-296.
172. Sparrow JR, Vollmer-Snarr HR, Zhou J, et al. A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells. Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E-epoxide formation. *J Biol Chem* 2003;278:18207-18213.
173. Tanito M, Yoshida Y, Kaidzu S, et al. Acceleration of age-related changes in the retina in alpha-tocopherol transfer protein null mice fed a Vitamin E-deficient diet. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:396-404.
174. Engin KN, Yemisci B, Yigit U, Agachan A, Coskun C. Variability of serum oxidative stress biomarkers relative to biochemical data and clinical parameters of glaucoma patients. *Mol Vis* 2010;16:1260-1271.
175. Pasantes-Morales H, Quiroz H, Quesada O. Treatment with taurine, diltiazem, and vitamin E retards the progressive visual field reduction in retinitis pigmentosa: a 3-year follow-up study. *Metab Brain Dis* 2002;17:183-197.
176. van Leeuwen R, Boekhoorn S, Vingerling JR, et al. Dietary intake of antioxidants and risk of age-related macular degeneration. *JAMA* 2005;294:3101-3107.
177. Bursell SE, Clermont AC, Aiello LP, et al. High-dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:1245-1251.

178. van Rooij J, Schwartzberg SG, Mulder PG, Baarsma SG. Oral vitamins C and E as additional treatment in patients with acute anterior uveitis: a randomised double masked study in 145 patients. *Br J Ophthalmol* 1999;83:1277-1282.
179. Williams DL. Oxidative stress and the eye. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008;38:179-192, vii.
180. Larrosa JM, Veloso AA, Jr., Leong FL, Refojo MF. Antiproliferative effect of intravitreal alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl-acid-succinate in a rabbit model of PVR. *Curr Eye Res* 1997;16:1030-1035.
181. Beck LR, Cowsar DR, Lewis DH, et al. A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone. *Fertil Steril* 1979;31:545-551.
182. Zolnik BS, Burgess DJ. Evaluation of in vivo-in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres. *J Control Release* 2008;127:137-145.
183. Zhou XL, He JT, Du HJ, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of recombinant human erythropoietin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2012;33:137-144.
184. Karal-Yilmaz O, Serhatli M, Baysal K, Baysal BM. Preparation and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres using a double emulsion/solvent evaporation technique. *J Microencapsul* 2011;28:46-54.
185. de Boer R, Knight AM, Spinner RJ, Malessy MJ, Yaszemski MJ, Windebank AJ. In vitro and in vivo release of nerve growth factor from biodegradable poly-lactic-co-glycolic-acid microspheres. *J Biomed Mater Res A* 2010;95:1067-1073.
186. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release* 2003;90:261-280.
187. Bilati U, Allemann E, Doelker E. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;59:375-388.
188. Baras B, Benoit MA, Gillard J. Parameters influencing the antigen release from spray-dried poly(DL-lactide) microparticles. *Int J Pharm* 2000;200:133-145.

189. Ghalanbor Z, Korber M, Bodmeier R. Improved lysozyme stability and release properties of poly(lactide-co-glycolide) implants prepared by hot-melt extrusion. *Pharm Res* 2010;27:371-379.
190. Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release* 2008;125:193-209.
191. Andreas K, Zehbe R, Kazubek M, et al. Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification techniques: investigation for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 2011;7:1485-1495.
192. Li Z, Li L, Liu Y, et al. Development of interferon alpha-2b microspheres with constant release. *Int J Pharm* 2011;410:48-53.
193. Formiga FR, Pelacho B, Garbayo E, et al. Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model. *J Control Release* 2010;147:30-37.
194. Wang F, Song YL, Li CX, et al. Sustained release of insulin-like growth factor-1 from poly(lactide-co-glycolide) microspheres improves osseointegration of dental implants in type 2 diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2010;640:226-232.
195. van de Weert M, Hennink WE, Jiskoot W. Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharm Res* 2000;17:1159-1167.
196. Perez C, Castellanos IJ, Costantino HR, Al-Azzam W, Griebenow K. Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers. *J Pharm Pharmacol* 2002;54:301-313.
197. Ye M, Kim S, Park K. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *J Control Release* 2010;146:241-260.
198. Tobio M, Nolley J, Guo Y, McIver J, Alonso MJ. A novel system based on a poloxamer/PLGA blend as a tetanus toxoid delivery vehicle. *Pharm Res* 1999;16:682-688.
199. Carrasquillo KG, Carro JC, Alejandro A, Toro DD, Griebenow K. Reduction of structural perturbations in bovine serum albumin by non-aqueous microencapsulation. *J Pharm Pharmacol* 2001;53:115-120.

200. Leach WT, Simpson DT, Val TN, et al. Uniform encapsulation of stable protein nanoparticles produced by spray freezing for the reduction of burst release. *J Pharm Sci* 2005;94:56-69.
201. Yuan W, Wu F, Guo M, Jin T. Development of protein delivery microsphere system by a novel S/O/O/W multi-emulsion. *Eur J Pharm Sci* 2009;36:212-218.
202. Morita T, Sakamura Y, Horikiri Y, Suzuki T, Yoshino H. Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant. *J Control Release* 2000;69:435-444.
203. Lagarce F, Garcion E, Faisant N, et al. Development and characterization of interleukin-18-loaded biodegradable microspheres. *Int J Pharm* 2006;314:179-188.
204. Han Y, Tian H, He P, Chen X, Jing X. Insulin nanoparticle preparation and encapsulation into poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres by using an anhydrous system. *Int J Pharm* 2009;378:159-166.
205. Bao W, Zhou J, Luo J, Wu D. PLGA microspheres with high drug loading and high encapsulation efficiency prepared by a novel solvent evaporation technique. *J Microencapsul* 2006;23:471-479.
206. Jiskoot W, Randolph TW, Volkin DB, et al. Protein instability and immunogenicity: roadblocks to clinical application of injectable protein delivery systems for sustained release. *J Pharm Sci* 2012;101:946-954.
207. Pisal DS, Kosloski MP, Balu-Iyer SV. Delivery of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 2010;99:2557-2575.
208. Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J* 2006;8:E501-507.
209. Martinez-Sancho C, Herrero-Vanrell R, Negro S. Vitamin A palmitate and aciclovir biodegradable microspheres for intraocular sustained release. *Int J Pharm* 2006;326:100-106.
210. Herrero-Vanrell R, Refojo M. Intravitreal microsphere drug delivery and method of preparation U.S. Patent # 5,718,922
211. Klocker N, Cellerino A, Bahr M. Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of brain-derived

- neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells In vivo. *J Neurosci* 1998;18:1038-1046.
212. Koeberle PD, Ball AK. Neurturin enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo: combined effects with glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 2002;110:555-567.
213. Fan W, Crawford R, Xiao Y. The ratio of VEGF/PEDF expression in bone marrow mesenchymal stem cells regulates neovascularization. *Differentiation* 2011;81:181-191.
214. Haribalaganesh R, Sheikpranbabu S, Banumathi E, Gurunathan S. Pigment epithelium-derived factor inhibits erythropoietin-induced retinal endothelial cell angiogenesis by suppression of PI3K/Akt pathway. *Exp Eye Res* 2010;90:726-733.
215. Al Haushey L, Bolzinger MA, Bordes C, Gauthier JY, Briancon S. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. *Int J Pharm* 2007;344:16-25.
216. Checa-Casalengua P, Tucker BA, Molina-Martinez IT, Young MJ, Bravo-Osuna I, R. HV. Release rate of GDNF from PLGA microspheres for the treatment of neural degenerative diseases. Influence of Vitamin E addition. *ARVO* 2010;51:4514.
217. Bittner B, Mader K, Kroll C, Borchert HH, Kissel T. Tetracycline-HCl-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres prepared by a spray drying technique: influence of gamma-irradiation on radical formation and polymer degradation. *J Control Release* 1999;59:23-32.
218. Shameem M, Lee H, Burton K, Thanoo BC, Deluca PP. Effect of gamma-irradiation on peptide-containing hydrophilic poly (d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *PDA J Pharm Sci Technol* 1999;53:309-313.
219. Carrascosa C, Espejo L, Torrado S, Torrado JJ. Effect of gamma-sterilization process on PLGA microspheres loaded with insulin-like growth factor-I (IGF-I). *J Biomater Appl* 2003;18:95-108.
220. Dorati R, Genta I, Montanari L, et al. The effect of gamma-irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin. *J Control Release* 2005;107:78-90.

221. Igartua M, Hernandez RM, Rosas JE, Patarroyo ME, Pedraz JL. Gamma-irradiation effects on biopharmaceutical properties of PLGA microspheres loaded with SPf66 synthetic vaccine. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;69:519-526.
222. Jain S, Malyala P, Pallaoro M, et al. A two-stage strategy for sterilization of poly(lactide-co-glycolide) particles by gamma-irradiation does not impair their potency for vaccine delivery. *J Pharm Sci* 2011;100:646-654.
223. Zbikowska HM, Nowak P, Wachowicz B. Protein modification caused by a high dose of gamma irradiation in cryo-sterilized plasma: protective effects of ascorbate. *Free Radic Biol Med* 2006;40:536-542.
224. Akkus O, Belaney RM, Das P. Free radical scavenging alleviates the biomechanical impairment of gamma radiation sterilized bone tissue. *J Orthop Res* 2005;23:838-845.
225. Sassa Y, Hata Y. Antiangiogenic drugs in the management of ocular diseases: Focus on antivascular endothelial growth factor. *Clin Ophthalmol* 2010;4:275-283.
226. Stewart EA, Samaranayake GJ, Browning AC, Hopkinson A, Amoaku WM. Comparison of choroidal and retinal endothelial cells: characteristics and response to VEGF isoforms and anti-VEGF treatments. *Exp Eye Res* 2011;93:761-766.
227. Jeganathan VS. Anti-angiogenesis drugs in diabetic retinopathy. *Curr Pharm Biotechnol* 2011;12:369-372.
228. Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, et al. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors. *PLoS One* 2008;3:e3554.
229. Brar VS, Sharma RK, Murthy RK, Chalam KV. Bevacizumab neutralizes the protective effect of vascular endothelial growth factor on retinal ganglion cells. *Mol Vis* 2010;16:1848-1853.
230. Yan Q, Wang J, Matheson CR, Urich JL. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurobiol* 1999;38:382-390.
231. Siegel GJ, Chauhan NB. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;33:199-227.

232. Jollivet C, Aubert-Pouessel A, Clavreul A, et al. Striatal implantation of GDNF releasing biodegradable microspheres promotes recovery of motor function in a partial model of Parkinson's disease. *Biomaterials* 2004;25:933-942.
233. Engin KN. Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Mol Vis* 2009;15:855-860.
234. Tombran-Tink J. PEDF in angiogenic eye diseases. *Curr Mol Med* 2010;10:267-278.
235. Xu P, Gullotti E, Tong L, et al. Intracellular drug delivery by poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, revisited. *Mol Pharm* 2009;6:190-201.



