

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



TESIS DOCTORAL

Nanosistemas basados en polímeros naturales para la vehiculización de tamoxifeno

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana María Martínez Relimpio

Directores

Irene Iglesias Peinado
M^a Dolores Blanco Gaitán

Madrid, 2014

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**



**NANOSISTEMAS BASADOS EN POLIMEROS NATURALES PARA
LA VEHICULIZACIÓN DE TAMOXIFENO**

ANA MARÍA MARTÍNEZ RELIMPIO

MADRID, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
DPTO. FARMACOGNOSIA Y FARMACOLOGÍA EXPERIMENTAL

FACULTAD DE MEDICINA
DPTO. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III



**NANOSISTEMAS BASADOS EN POLIMEROS NATURALES PARA
LA VEHICULIZACIÓN DE TAMOXIFENO**

Memoria presentada por:
ANA MARÍA MARTÍNEZ RELIMPIO
para la obtención del grado de Doctor

VºBº

Directores:

Dra. Irene Iglesias Peinado

Dra. Mª Dolores Blanco Gaitán

Madrid, 2013

IRENE IGLESIAS PEINADO, Profesora Titular del Departamento de Farmacognosia y Farmacología experimental de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y **MARÍA DOLORES BLANCO GAITÁN**, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN: que el presente Trabajo titulado: “Nanosistemas basados en polímeros naturales para la vehiculización de tamoxifeno”, llevado a cabo por Dña. **ANA MARÍA MARTÍNEZ RELIMPIO** ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Creemos que el mencionado Trabajo reúne las características necesarias para ser defendido ante un Tribunal para la obtención del grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Madrid a 26 de Noviembre de 2013.

Fdo.:
Dra. Irene Iglesias Peinado

Fdo.:
Dra. María Dolores Blanco Gaitán

“En el mundo de lo muy, muy pequeño, muchas cosas nuevas podrán suceder”

“Sólo a base de trabajar duro puede descubrirse algo”

Richard Feynman, padre de la Nanotecnología

Por fin ha llegado el momento...llevar a cabo este proyecto tan gratificante no habría sido posible sin la colaboración de una u otra forma de mucha gente, a la que me gustaría agradecer su apoyo a lo largo de todo este tiempo.

En primer lugar, quiero dar mi más sincero agradecimiento a mis directoras. A la Dra. Irene Iglesias, por su apoyo durante todos estos años, por tenerme siempre presente y darme la oportunidad de emprender este camino en un magnífico grupo de investigación. A la Dra. María Dolores Blanco, por el día a día, por su espíritu incansable de trabajo bien hecho, su gran calidad humana y profesional, y porque si no es por su colaboración e incansable ánimo habría arrojado la toalla en más de una ocasión...gracias por evitarlo y empujarme a seguir a pesar de las dificultades. Así mismo, gracias por permitirme llevar a cabo este trabajo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina que actualmente dirige.

A la Dra. Paulina Bermejo y a la Dra. Juana Benedí, Directora y Secretaria del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia, respectivamente, gracias por permitirme llevar a cabo este proyecto y colaborar en la docencia práctica en este departamento.

Al Dr. José María Teijón, Excelentísimo Académico, por contagiarme su amor por la enseñanza y por sus palabras siempre amables. Ha sido todo un placer para mí formar parte del grupo de investigación que codirige junto a la Dra. Blanco. Al Dr. Rafael Lozano, Ilustre Decano de la Facultad de Farmacia, por su ánimo y su apoyo aún cuando todo parecía complicarse más que lo que realmente me gustaría.

A la Dra. Ruth Cameron, por permitirme desarrollar mi estancia científica en el grupo de investigación que dirige en la Universidad de Cambridge. A todos mis compañeros de laboratorio allí, especialmente al Dr. José Araujo por hacerme todo mucho más fácil. Y principal y especialmente, a la Dra. Natalia Davidenko y al "compañero" Chris, por estar siempre dispuestos a ayudarme, acogerme tan cariñosamente bien y hacer que Cambridge no resultara tan "frío" como imaginaba.

A la Dra. Rosa Olmo y al Dr. César Teijón por su apoyo y ánimo a lo largo de estos años. A la Dra. Enriqueta Muñiz por su colaboración en la realización de los estudios histológicos, y por demostrarme su pasión por el "mundo microscópico". Al Dr. Jesús López por sus "manos" y dedicación, e instrucción en las técnicas inmunohistoquímicas.

Así mismo, quiero expresar mi agradecimiento a mis compañeras de laboratorio. A Nuria, Ana y Elena, por estar día a día, codo con codo, siempre al pie del cañón. A Marta y Sandra, por tantas sonrisas y tantos momentos buenos dentro y fuera del laboratorio; por vuestro apoyo incondicional cuando me flaqueaban las fuerzas. Espero seguir contando con vosotras muchos años.

También me gustaría agradecer a aquellos compañeros de ambos departamentos que han contribuido de alguna forma a hacer posible este trabajo: a Patricia, Luis, Irene y todos los profesores que me han ayudado a dar los primeros pasos en las prácticas; a Ángel, Carmen, Javi, Inés, M^a Ángeles y Cynthia, por los ratitos compartidos. Y especialmente a Verónica y a Carmen, porque puedo decir que “al final del pasillo he visto una luz”, y he tenido la suerte de descubrirlos como grandes compañeras, científicas, y sobre todo, amigas.

No quisiera olvidarme de todas las personas que, aunque fuera del ámbito científico, han estado siempre a mi lado y me han ayudado a crecer como persona. A Javi, por ser fundamental en mi vida, quererme y creer en mí (sé que a veces es difícil...). A mis padres, porque os debo todo lo que soy, y por confiar siempre en mí y mis proyectos. A mi hermana Mamen, porque ¿quién dijo que segundas partes nunca fueron buenas? A aquellos familiares que siempre me han demostrado estar ahí, en lo bueno y en lo malo, en especial a mi abuela por darme una lección de superación y amor por la vida. A mi segunda familia: Paco, Encarna y, especialmente, a Clara por quererme como una hermana desde el primer momento y hacerme sentir como en casa.

A mis amigas incondicionales: a María y a “Soti”, por seguir creciendo juntas; a mis Mosqueteras S.A, por los momentos incontables que hemos vivido, y porque a pesar de las largas distancias sigamos viviéndolos. A mis “farmacéuticos”: José por estar siempre ahí todos estos años y creer tanto en mí; Cris por ser como eres, y quererme como soy. Y Carlos por tener fuerzas para recuperar lo que creíamos perdido. A Rosa, por su magia. Gracias a todos por comprenderme siempre.

En definitiva, gracias a todos los que habéis aportado vuestro granito de arena para que haya podido llegar hasta aquí y hacerme sentir orgullosa de quién soy y del trabajo realizado. Este proyecto también es vuestro.

A todos, mil gracias.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	1
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	15
1. ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA NANOMEDICINA	17
1.1 Cáncer y nanomedicina	20
1.1.1 <i>Características fisiológicas de los tumores sólidos</i>	21
1.1.2 <i>Dianas terapéuticas en células cancerosas</i>	24
1.1.3 <i>Nuevos tratamientos anticancerosos basados en nanosistemas</i> ..	30
2. SISTEMAS POLIMÉRICOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA.....	31
2.1 Aplicación de las nanopartículas en cáncer.....	35
2.1.1 <i>Vectorización pasiva de las nanopartículas</i>	37
2.1.2 <i>Vectorización activa de las nanopartículas</i>	39
3. BIOMATERIALES	45
3.1 Biomateriales poliméricos	47
3.1.1 <i>Biomateriales poliméricos de origen natural</i>	48
3.1.2 <i>Biomateriales poliméricos de origen sintético</i>	54
4. PRINCIPALES MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS	55
4.1 Preparación de nanopartículas mediante técnicas de emulsión	56
4.2 Preparación de nanopartículas mediante interacciones poliméricas covalentes	58
4.3 Preparación de nanopartículas mediante interacciones poliméricas iónicas	59
4.4 Preparación de nanopartículas mediante autoensamblaje de macromoléculas	61
4.4.1 <i>Formación de complejos polielectrolíticos (PEC)</i>	61
4.4.2 <i>Ensamblaje de polímeros hidrofóbicamente modificados</i>	62
4.5 Preparación de nanopartículas mediante nanoprecipitación	62
OBJETIVOS / OBJECTIVES	65
METODOLOGÍA Y RESULTADOS.....	73

ARTÍCULO 1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ALGINATO Y ALBÚMINA TIOLADOS ESTABILIZADAS POR PUENTES

DISULFURO. EVALUACIÓN COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA [<i>Carbohydrate Polymers</i> , 83(3):1311-1321 (2011)]	77
ARTÍCULO 2. NANOPARTÍCULAS DE ALGINATO Y ALBÚMINA TIOLADOS CARGADAS CON TAMOXIFENO COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE ANTINEOPLÁSICOS [<i>Journal of Biomedical Materials Research PartA</i> , 100A(6):1467-1476 (2012)]	105
ARTÍCULO 3. EFICACIA PRECLÍNICA MEJORADA DEL TAMOXIFENO FORMULADO EN NANOPARTÍCULAS DE ALGINATO-CISTEÍNA/ALBÚMINA REDUCIDA [<i>International Journal of Pharmaceutics</i> , 436:574-581 (2012)].....	131
ARTÍCULO 4. NANOPARTÍCULAS BASADAS EN ALBÚMINA Y MEZCLAS ALBÚMINA/ALGINATO FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO FÓLICO COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE TAMOXIFENO. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN IN VITRO [<i>Pharmaceutical Research</i> , DOI 10.1007/s11095-013-1151-z (2013)]	157
ARTÍCULO 5. VECTORIZANDO EL TAMOXIFENO A TUMORES DE MAMA XENOGRAFT: EFICACIA PRECLINICA DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO FÓLICO BASADAS EN UNA COMBINACIÓN DE ALGINATO-CISTEÍNA/ALBÚMINA CON PUENTES DISULFURO REDUCIDOS [<i>Pharmaceutical Research</i> , DOI 10.1007/s11095-013-1247-5 (2013)].....	191
DISCUSIÓN.....	221
CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS.....	253
BIBLIOGRAFÍA	261

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- **BSA:** albúmina bovina sérica
- **BSA-SH:** albúmina bovina sérica modificada con puentes disulfuro reducidos
- **ALG:** alginato
- **ALG-CYS:** conjugado alginato-cisteína
- **TMX:** tamoxifeno
- **4-OH-TMX:** 4-hidroxitamoxifeno
- **FOL:** ácido fólico
- **NP:** nanopartículas
- **B-50-50 NP:** nanopartículas basadas en 50% ALG-CYS and 50% BSA-SH
- **C-70-30 NP:** nanopartículas basadas en 70% ALG-CYS and 30% BSA-SH
- **BSA-SH NP:** nanopartículas basadas en 100% BSA-SH
- **TMX-B-50-50 NP:** nanopartículas basadas en 50% ALG-CYS and 50% BSA-SH cargadas con tamoxifeno
- **TMX-C-70-30 NP:** nanopartículas basadas en 70% ALG-CYS and 30% BSA-SH cargadas con tamoxifeno
- **TMX-BSA-SH NP:** nanopartículas basadas en 100% BSA-SH cargadas con tamoxifeno
- **B-50-50-FOL NP:** nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico basadas en 50% ALG-CYS and 50% BSA-SH
- **C-70-30-FOL NP:** nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico basadas en 70% ALG-CYS and 30% BSA-SH
- **BSA-SH-FOL NP:** nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico basadas en 100% BSA-SH
- **TMX-B-50-50-FOL NP:** nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico basadas en 50% ALG-CYS and 50% BSA-SH cargadas con tamoxifeno
- **TMX-C-70-30-FOL NP:** nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico basadas en 70% ALG-CYS and 30% BSA-SH cargadas con tamoxifeno
- **TMX-BSA-SH-FOL NP:** nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico basadas en 100% BSA-SH cargadas con tamoxifeno
- **PBS:** tampón fosfato salino

- **NHS:** *N*-Hidroxisuccinimida
- **DCC:** *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **ER:** receptor de estrógenos
- **FR:** receptor de ácido fólico
- **MTT:** metiltiazol tetrazolio
- **NaOH:** hidróxido sódico
- **HCl:** ácido clorhídrico
- **EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- **KCl:** cloruro potásico
- **NaCl:** cloruro sódico
- **SDS:** dodecil sulfato sódico
- **FBS:** suero fetal bovino
- **s.c:** subcutáneo
- **i.v:** intravenoso
- **ANOVA:** análisis de la varianza

SUMMARY

❖ Introduction

The application of nanotechnology to biomedical and sanitary fields for prevention, diagnosis and treatment of diseases is achieving great scientific advances, and it has become one of the most important researching focuses in the recent years. Results obtained from several studies have provided new tools for facing various illnesses which incidence has been rising during the last decades, affecting especially the population of developed countries due to their increased expectancy of life.

Cancer is one of these kinds of diseases. It has been confirmed as one of the main death causes in developed countries, and it could become the illness with the highest morbidity and mortality indexes worldwide according to the estimations. In fact, 27 million of new cancer cases and 17 million of deaths have been foreseen for 2030. Additionally, this disease has an important social and economic impact, not only for the government institutions but also for the patients and society in general. Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer among European women. The application of early detection programs conducted by national health institutions has contributed to the reduction of mortality index and the increase of survival rate in patients affected by this disease. Although the exact mechanism which breast cancer is developed by has not been already established, hormonal regulation plays an important role in the majority of diagnosed cases. Thus, the regulation of estrogenic response by different mechanisms has been focused as one of the most common treatment strategies along several years.

Tamoxifen is a drug that belongs to selective estrogen receptor modulator family (SERMs), and it was approved by FDA in 1978 and 1998 for the treatment and prevention of hormone-dependent breast cancer, respectively. From its approval, it has showed very satisfactory results, but the development of undesirable side effects associated with long-term therapy makes necessary to establish an individualized therapy. Some of these serious effects can be considered as important limitations, such as the development of endometrial

cancer due to the agonist role of tamoxifen in the uterus, as well as its low water solubility which restricts the administration of the drug to few routes.

These limitations make tamoxifen a good candidate to be included into nanosystems which could vehiculize it through passive or active mechanisms in order to overcome some of the problems that current therapy presents, and also to achieve a more effective treatment. Indeed, some efforts have been carried out with this aim by several researching groups who included tamoxifen into nanoparticulated systems based on different synthetic and natural polymers.

❖ Objectives

The **main goal** of this work has been the *preparation, characterization and bio-evaluation of nanoparticulated systems based on natural polymers to be used as controlled release devices of tamoxifen*. Tamoxifen vehiculization through these kinds of systems based on natural polymers, in particular bovine serum albumin and alginate, pursues a new and improved therapeutic approach in breast cancer. This strategy is based on the rational and specific delivery of this drug to targeted tissues, either using passive or active mechanisms, and takes advantage of the good biocompatibility and biodegradability properties that these selected natural polymers offer.

In order to achieve this general aim of the study, some specific objectives were set out:

1. Synthesis of nanoparticles based on albumin and alginate, previously modified by a thiolation process. Stabilization of nanoparticles through disulfide bond formation. Characterization of nanoparticulated systems by composition, size, morphology and thermal stability studies.
2. Tamoxifen loading into those obtained systems. Quantification of drug load values and study of *in vitro* drug release kinetics.
3. Folic acid attachment to these obtained systems in order to prepare targeted nanoparticles. Characterization of folate-targeted

nanoparticles, drug loading process and evaluation of *in vitro* drug release kinetics.

4. *In vitro* anticancer efficacy evaluation of nanoparticles against MCF-7 and T47D cells, human breast cancer cell lines, and HeLa cells, human ovarian cell line. Cell viability and uptake studies will be performed in order to evaluate the efficacy of the systems.
5. *In vivo* anticancer efficacy evaluation of nanoparticles in a breast tumour xenograft model developed in athymic mice. Tumour volume evaluation, tamoxifen biodistribution and histological studies will be performed.

❖ Results

Nanoparticles based on thiolated alginate (ALG-CYS) and disulfide bond reduced albumin (BSA-SH) have been synthesized by coacervation method and stabilized by disulfide bond formation. In order to optimize the synthesis, the influence of amount and proportion of reactants on nanoparticle characteristics has been studied. Results showed cubic shaped nanoparticles but with a certain spherical tendency. The size range was 42-388 nm; as the percentage of ALG-CYS increased in the particle, their morphology was less spherical and the size was larger. The presence of both reactants in the nanoparticles was determined by FTIR and confirmed by TGA. The ratio BSA-SH/ALG-CYS (0.49/1 - 1.23/1) in the particles was quantified by colorimetric methods. Nanoparticles were assayed as drug delivery systems by loading them with tamoxifen (TMX) (2-4 μg TMX/mg NP). According to drug extraction method, it seemed that the drug was superficially placed, and different types of interactions could be established between TMX and the systems depending on their composition. Maximum TMX release (23-61% of loaded TMX) took place between 7 and 75 h, and the amount of released TMX can be modulated with the percentage of ALG-CYS in the particle, being the BSA-SH the main responsible for the controlled release of the drug from the systems due to the strong interactions established between the drug and the protein.

Some of the variables of the drug-loading process were modified in order to optimize the content of drug included into the systems. The TMX load into the nanoparticles was optimized (4-6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ NP) by freeze-drying the systems before the loading procedure, and by using a more concentrated drug solution. Again, drug extraction and zeta potential results revealed a major superficial location of the drug in the systems. Maximum TMX release (45-52%) took place between 2 and 25 h. Cytotoxicity of unloaded nanoparticles in MCF-7 and HeLa cells was not observed, although a small decrease in viability took place at very high concentration of the systems and after several days of incubation. Cell uptake of nanoparticles occurred in both cell types and the presence of polysaccharide in the nanoparticle composition allowed a better interaction with cells to be achieved. The administration of 10 μM TMX by TMX-nanoparticles was effective in both cellular lines, and the effect of the drug-loaded systems on MCF-7 cell cycle showed the efficacy of the TMX loaded nanoparticles as controlled delivery systems.

After the *in vitro* characterization studies of these systems and according to the results, those nanoparticles formed by mixtures of ALG-CYS/BSA-SH were selected to be tested using an *in vivo* MCF-7 nude mice xenograft model. After the subcutaneous administration of the nanoparticles in the tumour surrounding area, an enhancement of the TMX antitumor activity was observed. The lowest tumour evolutions and tumour growth rates were observed in mice treated with TMX entrapped into the systems. Moreover, histological and immunohistochemical studies revealed that treatments with TMX-loaded nanoparticles showed the most regressive and less proliferative tumour tissues. TMX biodistribution studies determined that TMX-loaded nanoparticles caused more accumulation of the drug into the tumour site with undetectable levels of TMX in plasma, reducing the possibility of delivering TMX to other not-targeted organs and, consequently, developing possible side effects. Thus, these TMX nanoparticulate systems, using mechanisms of passive drug vehiculization, were capable to increase TMX efficacy, allowing new challenging strategies of therapy to be further studied.

After obtaining these good *in vitro* and *in vivo* results, the design of vectorized nanosystems based on these already characterized formulations was considered the next step. In order to obtain these devices, folic acid molecules were attached to the nanoparticle structure via amino groups of albumin. Folic acid (FOL) was successfully attached to nanoparticles (ranging between 79 and 170 μmol folate/g NP). Nanoparticles with 76-417 nm average size were obtained and loaded with TMX (4.2-7.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ NP). Zeta potential and drug extraction revealed major superficial placement of the drug, especially in the case of folate-attached systems based on mixtures ALG-CYS/BSA-SH. Drug release studies in the presence of surfactant showed a gradual release of the drug between 4-7h, which was complete in the case of systems based on mixtures ALG-CYS/BSA-SH. However, the amount of TMX released from the systems diminished to 3-5% of total TMX load in absence of surfactant. *In vitro* cell culture studies were performed using three cell lines (MCF-7, T47D and HeLa cells), which resulted positive in the expression of folate receptors. In general, unloaded folate-attached systems showed low cytotoxicity. Internalization of the systems was achieved and mediated by folate receptor, especially in the case of BSA NP-FOL. The administration of 10 μM TMX by TMX-FOL NP showed their efficacy as controlled TMX release systems, since the reduction of cell viability caused by the nanoparticles was more gradual than that one caused by TMX in dissolution.

These *in vitro* results showed the promising anticancer action of these new TMX-loaded folate-targeted systems, allowing a new administration route to be studied in order to improve current TMX therapy. Consequently, an *in vivo* study was next performed using a MCF-7 nude mice xenograft model, selecting the system that offered the best physicochemical properties for its intravenous administration, and taking into account the results obtained from the *in vitro* characterization. Thus, TMX-B-50-50-FOL NP were selected to be tested in this model, together with its non-functionalized analogue (TMX-B-50-50 NP), to study the role of folic acid in the active targeting of the systems to the tumour site after their intravenous administration.

According to the results from the study, TMX-folate-targeted nanoparticles caused tumour remission while free TMX or TMX-non-targeted nanoparticles could only stop the tumour development. Histological and immunohistochemical studies revealed that tumour tissues treated with folate-attached systems showed the most quiescent and disorganized structures. Additionally, lower levels of TMX in non-targeted organs were obtained when it was administered trapped into the nanoparticles than when it was free administered. Consequently, this study demonstrated that TMX-loaded folate-targeted systems were capable to reach tumour site to enhance the *in vivo* anticancer action of TMX, allowing a new administration route to be applied in order to overcome some of the current TMX therapy problems.

❖ Conclusions

- Nanoparticles based on different mixtures of previously modified alginate and albumin have been prepared and stabilized by the formation of disulphide bonds between both polymers by coacervation methodology. Individualized nanoparticles with an average size ranged between 42-388 nm have been obtained. The presence of BSA-SH in nanoparticle composition is necessary to form the systems, as well as the proportion of reactants is determinant in the final composition of these nanoparticles.
- TMX is successfully included into the nanoparticles (4-6 μg TMX/mg NP) by swelling the systems in an ethanolic dissolution of the drug, obtaining better drug load values, generally, when the nanoparticles are previously freeze-dried. Part of the drug is placed on the nanoparticle surface, which is characteristic of hydrophobic drugs.
- *In vitro* maximum drug release from the systems in the presence of the surfactant takes place between 2 and 75 h, and depends on the drug loading methodology and nanoparticle composition. This release occurs

in two differentiated steps: the first step, which is fast and where superficial drug is released, followed by a second and slower step, where BSA-SH plays an important role due to the strong interactions established between the drug and the protein. These interactions are the main responsible for the incomplete release of the drug from the systems.

- The functionalization of these systems with folic acid is successfully carried out, being the amount of folic acid attached to the nanoparticles higher when the proportion of BSA-SH in the composition increases. The average size of these systems is ranged between 76 and 417 nm, and an aggregation phenomenon is detected in the case of nanoparticles composed of BSA-SH exclusively. TMX loading amount obtained for these systems is very similar to that determined in the case of non-functionalized systems, and the partial localization of the drug on the surface of the nanoparticles is also observed. Additionally, *in vitro* TMX release from these nanoparticles occurs in two differentiated steps: a first fast step followed by a second slower step; this release is complete at 24 h. However, the presence of the surfactant in the release medium is determinant for the complete release of the drug from the nanoparticles.

- Cellular studies in MCF-7, HeLa and T47D cell lines show that unloaded nanoparticles, either functionalized or non-functionalized, are essentially cytocompatible. All the systems are capable to interact and to be internalized by the three cell lines, although the presence of the polysaccharide in the nanoparticle composition enhances this interaction. Folic acid functionalization of the systems allows a higher internalization of the systems to be achieved. The role of folate receptor is determinant for the penetration of BSA-SH-FOL NP, but not exclusive in the case of B-50-50-FOL NP. The gradual decrease on cell viability when the drug is administered by the polymeric systems confirms the *in vitro* efficacy of the formulations as controlled delivery systems.

- Subcutaneous and intravenous administration of the non-vectorized (B-50-50 NP y C-70-30 NP) and folic acid-vectorized systems (B-50-50-FOL NP), in an *in vivo* MCF-7 xenograft model developed in athymic nude mice causes the deceleration and, in the case of the folate attached system, the regression of tumours in a more significant way than the drug administered free in dissolution. Moreover, histological studies show a higher disorganization and less cellular division in those tumour tissues treated with the TMX-loaded nanoparticles. Additionally, the accumulation of the drug in non-targeted tissues is considerably reduced when the drug is administered trapped into nanoparticles. Thus, this study reveals the highest *in vivo* anticancer efficacy of the tamoxifen-loaded nanosystems against the administration of the non vehiculized drug.

INTRODUCCIÓN

1. ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA NANOMEDICINA

El término nanotecnología hace referencia a la habilidad de medir, diseñar y manipular las características únicas que ofrecen determinados materiales cuando son manejados en escalas nanométricas, generalmente entre 1 y 100 nm, con el objetivo de diseñar sistemas con funciones específicas atribuibles a su pequeño tamaño (Tibbals, 2010). Aunque la introducción de este novedoso concepto se produce en 1958 de la mano de Richard Feynman (Appenzeller, 1991), no es hasta mediados del siglo XX cuando la nanotecnología comienza a perfilarse como una de las áreas más importantes de la investigación. Desde ese momento, la nanotecnología ha servido de herramienta en áreas muy diversas, abarcando desde sistemas electrónicos y motores hasta su aplicación en medicina y biotecnología. Y es precisamente en estos dos últimos campos donde la nanotecnología ha demostrado tener un enorme potencial.

La aplicación de la nanotecnología, principalmente en el ámbito médico y biosanitario, ha supuesto una auténtica revolución. El impacto de las nuevas herramientas terapéuticas y de diagnóstico proporcionadas ha llevado a acuñar un nuevo término para referirse a esta nueva disciplina. El término “nanomedicina” ha sido definido por los Institutos Nacionales de Salud de mayor relevancia mundial para hacer referencia a la aplicación de la nanotecnología en la medicina, esencialmente en la detección, diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Moghimi et al., 2005; Zhang et al., 2008). De esta forma, la nanomedicina tiene por meta llevar a cabo un amplio estudio sobre como los materiales, herramientas y técnicas proporcionadas por la nanotecnología permiten ampliar los conocimientos sobre biomedicina y descubrir nuevos procedimientos para avanzar hacia una medicina más personalizada (Caruso et al., 2012).

El gran impacto de la nanotecnología en medicina se aprecia principalmente en tres áreas (Figura 1): técnicas analíticas y diagnósticas, tratamiento farmacológico y medicina regenerativa (Boulaiz et al., 2011).

a) Nuevas técnicas analíticas y de diagnóstico

Habitualmente, la mayoría de las técnicas actuales de diagnóstico permiten la detección de una enfermedad cuando ya está en fase avanzada. Las técnicas “nanodiagnósticas” se han desarrollado con el objetivo de aumentar la sensibilidad en el diagnóstico clínico y mejorar la detección de la enfermedad en fase temprana (Jain, 2003, 2005). Este campo de investigación abarca diversas técnicas *in vitro*, como el desarrollo de nanobiosensores (Singh et al., 2010), micromatrices (microarrays) para diagnóstico molecular (Jayapal and Melendez, 2006) y dispositivos “Lab-on-a-chip” (LOC), que integran varias funciones de laboratorio en un solo chip (Mark et al., 2010).

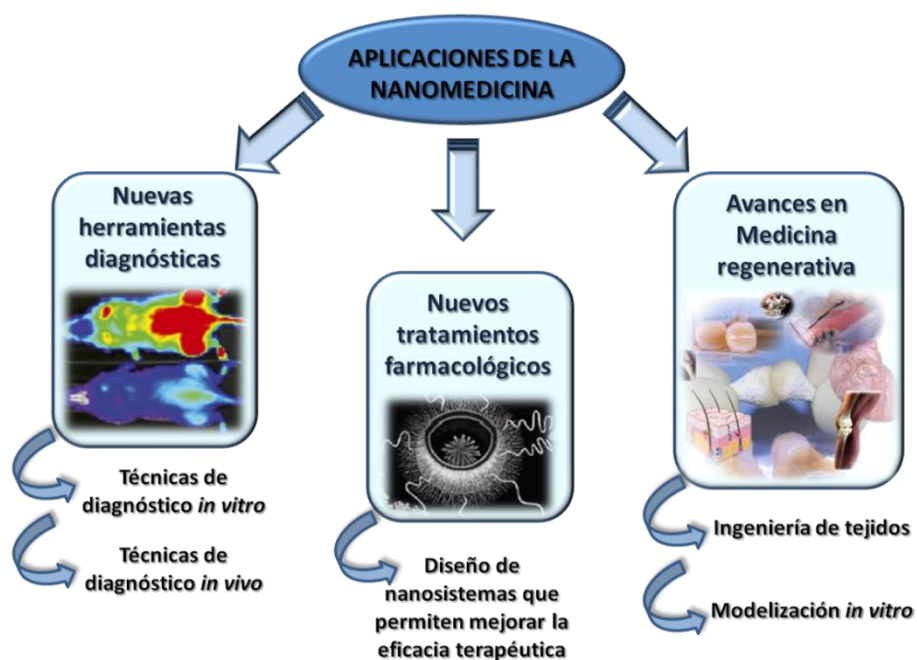


Figura 1. Principales áreas de aplicación de la nanomedicina.

Así mismo, se han desarrollado nuevas técnicas de diagnóstico por imagen *in vivo* basadas en nanosistemas portadores de sondas fluorescentes o con características físico químicas específicas que han permitido mejorar y completar los resultados obtenidos por las técnicas ya existentes, extrayendo datos a nivel

molecular que permiten tanto la identificación de las causas de la enfermedad de forma temprana como una exhaustiva monitorización de cada fase del proceso. Algunos ejemplos de estas técnicas son la tomografía por emisión de positrones (PET), bioluminiscencia, tomografía basada en fluorescencia (FMT) o microscopía confocal láser de barrido, entre otras (Weissleder and Pittet, 2008). De forma paralela, la nanotecnología también ha desarrollado agentes de contraste mucho más selectivos que permiten una mejora en la sensibilidad de estas técnicas de diagnóstico por imagen, tales como “puntos cuánticos” (quantum dots, QDs) o nanopartículas de oro (Delehanty et al., 2012; Ruedas-Rama et al., 2012).

El desarrollo e investigación de estas nuevas técnicas diagnósticas se ha convertido en una prioridad para la nanomedicina, ya que permitiría obtener herramientas de estudio indispensables en enfermedades como el cáncer, cardiovasculares y neurodegenerativas.

b) Desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos

El desarrollo de la nanotecnología en el ámbito farmacológico ha permitido la aparición de una serie de nanosistemas que protegen, vehiculizan y, en algunos casos, dirigen los fármacos hacia sus dianas terapéuticas, permitiendo una mejora de la eficacia del tratamiento farmacológico. De esta forma se optimizan las formulaciones farmacéuticas y se reduce la aparición de efectos adversos. El impacto de la nanotecnología en el campo farmacológico será desarrollado y analizado en mayor profundidad en el segundo epígrafe de esta introducción.

c) Medicina regenerativa y modelización

La nanotecnología ofrece muchas expectativas en el campo de la ingeniería de tejidos, permitiendo el diseño de nuevas estrategias que contribuyen a la mejora, reparación o reemplazamiento de la función orgánica o tisular dañada mediante la aplicación de nanomateriales (Verma et al., 2011). La idea principal es diseñar una matriz artificial extracelular o “andamio” biocompatible (scaffold) sobre la que cultivar las células y promover su crecimiento mediante la recreación de un microambiente celular similar al presente *in vivo*. Para ello, la

nanotecnología diseña sistemas de liberación de factores de crecimiento y otros compuestos que permiten promover el crecimiento celular, que son incorporados a estos “andamios”, permitiendo pasar del cultivo celular en dos dimensiones a uno tridimensional. Las posibilidades que esta nueva tecnología ofrece son muy variadas, pero principalmente destaca su aplicación en la regeneración de tejidos, como el óseo o epitelial, donde se han observado ya muy buenos resultados (Wong and Liu, 2012).

Otra de las aplicaciones más importantes es la modelización de tumores *in vitro*. La experimentación con animales es cada vez más restringida, con lo que es necesario el desarrollo de nuevas herramientas de cribado que proporcionen mejores predicciones sobre la posible eficacia *in vivo* de las nuevas formulaciones, y que permitan seleccionar más específicamente los sistemas antes de ser estudiados en animales. El cultivo de líneas celulares cancerígenas sobre estas estructuras tridimensionales promueve un mejor crecimiento, una mayor diferenciación y un metabolismo celular más próximo al que se produce *in vivo* (Mitra et al., 2012). Esto puede permitir la evaluación de nuevas formulaciones de fármacos antitumorales en cultivos tridimensionales, constituyendo un paso intermedio entre los cultivos celulares bidimensionales y los estudios *in vivo* (Shin et al., 2013), lo que reduciría sensiblemente el número de animales a emplear en los estudios *in vivo*.

1.1 Cáncer y nanomedicina

El cáncer se ha convertido en una de las principales causas de mortalidad en países desarrollados, y se estima que se convierta en la enfermedad con mayor morbilidad y mortalidad en las próximas décadas en las distintas regiones del mundo, independientemente de su situación económica (Bray et al., 2012). De acuerdo a las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que el cáncer será responsable de 84 millones de muertes producidas entre 2005 y 2015 (Danhier et al., 2010); concretamente, 1.283.101 de muertes por cáncer fueron estimadas en la Unión Europea en el año 2012 (Malvezzi et al., 2012).

La incidencia de esta enfermedad es diferente en varones y mujeres, detectándose diferentes tipos de cáncer y número de casos en función del género. La incidencia es ligeramente superior en varones que en mujeres, siendo el de pulmón, colorrectal y próstata los tipos de cáncer más diagnosticados en el caso de los varones, y el de mama, colorrectal y pulmón los más frecuentes en mujeres (Sociedad Española de Oncología Médica, www.seom.org).

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado en mujeres, siendo su segunda causa de muerte en Estados Unidos, estimando 226.870 nuevos casos para 2012 (Ma and Jemal, 2013), y continúa siendo la primera causa de muerte por cáncer en mujeres europeas. La edad de máxima incidencia está por encima de los 50 años, pero aproximadamente un 6% se diagnostica en mujeres menores de 35 años (Sociedad Española de Oncología Médica, www.seom.org). Los programas de detección precoz establecidos han permitido una mayor detección de la enfermedad en fase temprana, logrando disminuir la tasa de mortalidad y prolongando la supervivencia de la población (Sant et al., 2009). En Europa, el pronóstico es relativamente bueno con una supervivencia a 5 años del 77% (Sociedad Española de Oncología Médica, www.seom.org). En España, la supervivencia global a los 5 años del diagnóstico de este tipo de tumor se eleva a un 82,8%, lo que nos sitúa por encima de la media europea (Proyecto EURO CARE-4, Asociación Española contra el Cáncer, www.aecc.es).

Aunque se ha avanzado mucho en cuanto a la prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer, es necesario profundizar en la fisiopatología de esta enfermedad para conseguir una terapia efectiva, que consiga sobrepasar las numerosas limitaciones que tienen los tratamientos actuales.

1.1.1 Características fisiológicas de los tumores sólidos

La carcinogénesis es un proceso múltiple en el que participan alteraciones genéticas y epigenéticas que conllevan a una transformación progresiva de las células normales en células malignas. Estas células adquieren un potencial de

división anormal y descontrolada, junto con la capacidad de invadir y provocar metástasis en otros tejidos (Djojotubro et al., 2003; Hernandez-Vargas et al., 2006).

Los procesos de proliferación celular están regulados por gran variedad de moléculas que desencadenan cascadas de señalización intracelular que activan o reprimen los genes responsables de estos procesos. Cuando existe un desequilibrio en la regulación de estos procesos proliferativos, las células comienzan a crecer de forma anormal e incontrolada (Fingar and Blenis, 2004). Si esto sucede, se produce un incremento de los requerimientos nutricionales celulares así como un aumento de los productos derivados del metabolismo celular.

En tumores con un tamaño comprendido entre 1-2 mm³, los nutrientes y el oxígeno pueden llegar a las células a través de mecanismos de difusión simple, por lo que serán altamente dependientes de este aporte para su evolución. Sin embargo, cuando el tumor supera este tamaño, las células localizadas en la zona central del tumor comienzan a necrosarse debido al insuficiente aporte de nutrientes, y comienza una fase de hipoxia celular. Para afrontar esta situación, el tumor secreta una serie de factores que estimularán el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que le proporcionen el aporte nutritivo necesario para seguir creciendo. Este proceso es conocido con el nombre de angiogénesis (Brannon-Peppas and Blanchette, 2004).

El proceso angiogénico está controlado por un equilibrio entre factores activadores e inhibidores del mismo (Bergers and Benjamin, 2003). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) juega un papel regulador muy importante en este proceso, estimulando la proliferación, migración e invasión del endotelio (Figura 2). Además, también favorece la permeabilización de los capilares sanguíneos para conseguir una rápida extravasación de la proteína plasmática en los tejidos (Bae et al., 2011).

A través de factores activadores, como el VEGF, se desarrolla la nueva vasculatura del tumor que va a presentar marcadas diferencias respecto a los vasos sanguíneos existentes en los tejidos sanos. Esta neovasculatura asociada a los tumores presenta una elevada tortuosidad y densidad, heterogenicidad, y deficiencias en los pericitos endoteliales que llevan a la aparición de espacios intercelulares comprendidos entre 100 nm y 2 μ m en función de los distintos tipos de tumor (Hobbs et al., 1998).

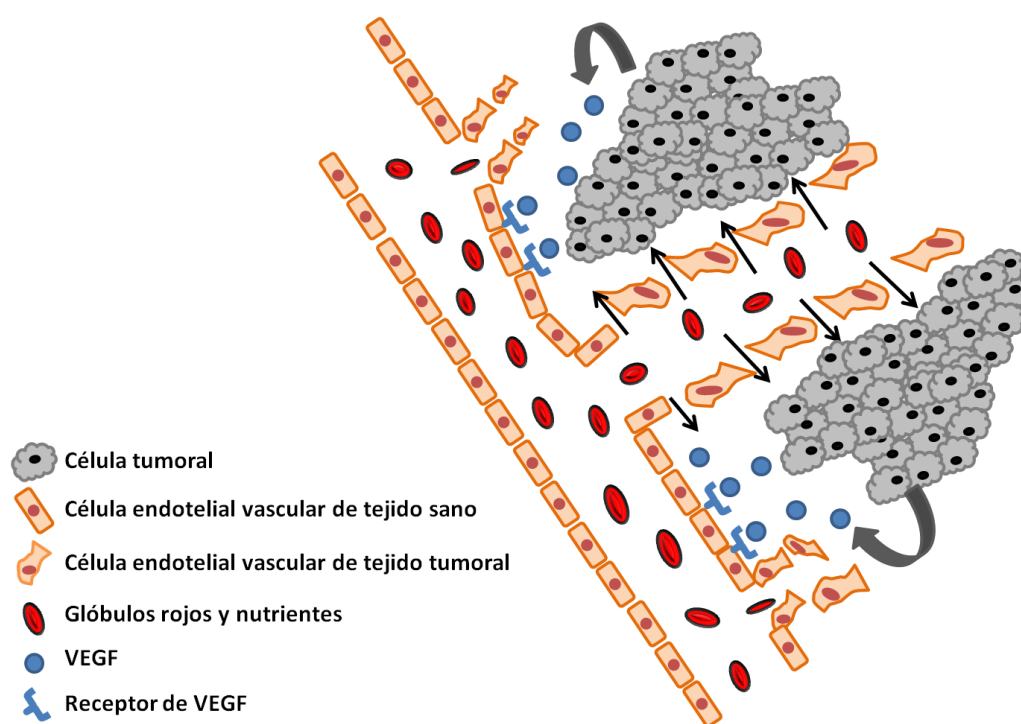


Figura 2. Desarrollo del proceso angiogénico en un tumor sólido promovido por la liberación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Además de este débil sistema vascular, este tipo de tumores se caracteriza por presentar un pobre e ineficiente drenaje linfático. Este proceso de drenaje resulta imprescindible para mantener las funciones celulares normales (Bozkir and Saka, 2005). Recientemente, se ha descubierto el papel de determinados factores mediadores en el proceso de creación de vasos linfáticos que están

implicados directamente en este proceso (VEGF-C y VEGF-D), lo que conduce a una mayor capacidad de metástasis del tumor (Danquah et al., 2011).

La combinación del débil sistema vascular junto con este sistema linfático poco funcional lleva a la acumulación de contenidos vasculares en el tumor, resultando en una elevación de la presión del fluido intersticial (IFP), siendo más destacable este fenómeno en el centro del tumor (Jain, 1987). Como consecuencia de la coexistencia de estos factores se produce el fenómeno conocido como efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR).

Finalmente, debido a la débil vasculatura presente en estos tumores, se produce una reducción del flujo sanguíneo y, con ello, de los niveles de oxígeno. Esto tiene como consecuencia la aparición de condiciones hipóxicas en las que se favorece un metabolismo celular anaeróbico y una acidosis extracelular en el tejido tumoral como consecuencia de la elevada producción de ácido láctico y CO₂. Se ha detectado una disminución del pH extracelular en tejidos tumorales que alcanza valores entre 6 y 7, cuando en tejidos sanos tiene un valor de 7,4 (Cardone et al., 2005; Danquah et al., 2011).

Por tanto, todas estas características de las células tumorales y de los tumores sólidos (débil vasculatura, pobre drenaje linfático, retención favorecida y acidosis extracelular) deben ser consideradas para el desarrollo de nuevas terapias anticancerosas que permitan un tratamiento más eficaz en este tipo de tumores.

1.1.2 Dianas terapéuticas en células cancerosas

El principal objetivo en la lucha contra el cáncer es el desarrollo de tratamientos que produzcan la remisión y/o paliación de esta enfermedad. Actualmente, la terapia anticancerosa está basada principalmente en métodos quirúrgicos, para la resección total o parcial de los tumores, así como en radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e inmunoterapia, para la erradicación de focos microscópicos de células cancerosas. Generalmente, la elección terapéutica conlleva la combinación de varios de estos tratamientos para

obtener la mayor efectividad posible. Sin embargo, estas modalidades terapéuticas tienen numerosas limitaciones que pretenden ser superadas gracias a la aplicación de la nanotecnología.

Gracias a la investigación, se han producido numerosos avances sobre el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de un tumor, tales como receptores o mediadores en cascadas de señalización, cuya sobreexpresión o desregulación está presente en las células cancerosas. Esto les convierte en posibles dianas farmacológicas que se podrían emplear para el diseño de nuevos agentes terapéuticos que actuarían de forma selectiva sobre las células afectadas, y en menor medida sobre las células sanas.

En función del tipo de cáncer, se han detectado diferentes posibles dianas terapéuticas implicadas en las diferentes fases del desarrollo del tumor, que se describen brevemente a continuación teniendo en cuenta los tipos de neoplasias más frecuentes.

- Cáncer de pulmón

Existen dos tipos principales de cáncer de pulmón: de células no pequeñas y de células pequeñas o microcítico. Probablemente, el carcinoma de células no pequeñas se origina en las células epiteliales, mientras el cáncer de células pequeñas se piensa que se origina en las neuronas o en las células productoras de hormonas (Sociedad Española de Oncología Médica, www.seom.org).

En el cáncer de células no pequeñas se han identificado diferentes vías de señalización que median en procesos como la angiogénesis y crecimiento de tumor. Es el caso del receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R) (Belani et al., 2012; Pallis et al., 2009). VEGFR, EGFR y IGF-1R son receptores con actividad tirosina-quinasa intrínseca, que activan cascadas de señalización intracelular que finalizan con la activación o inhibición de procesos de proliferación celular (Baselga, 2001; Lopez-Calderero et al., 2010).

La sobreexpresión de estos receptores es muy común en este tipo de tumor aunque frecuentemente no se encuentran alterados de forma aislada, lo que afectaría una única ruta de señalización, sino que suelen producirse mutaciones a varios niveles. Además, se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad (Pirker et al., 2009). Por ello, lo ideal sería la combinación de varias terapias dirigidas a diferentes dianas terapéuticas para obtener un resultado eficaz en el tratamiento de este tipo de cáncer (Custodio et al., 2012).

- Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal ocupa el segundo lugar en incidencia en los países occidentales, después del cáncer de pulmón en el hombre y del cáncer de mama en la mujer. Además, supone aproximadamente el 10-15% de todos los cánceres, y en un elevado porcentaje de casos se presenta con metástasis en el hígado cuando se diagnostica (Sociedad Española de Oncología Médica, www.seom.org).

Se han identificado algunas dianas terapéuticas implicadas en procesos de proliferación celular en este tipo de cáncer, como el EGFR y el factor de crecimiento del endotelio vascular tipo A (VEGF-A), sobre las cuales ya se está actuando junto a los tratamientos convencionales (Tsuji, 2012). Sin embargo, las últimas investigaciones se centran en nuevas dianas terapéuticas como microARNs (miRNA) o ARNs no codificantes y genes de multirresistencia a fármacos (MDR1, MRP1 and ABCG2), que podrían ser responsables de la ineficacia de muchos tratamientos por promover el desarrollo de mecanismos de resistencia a los mismos (Dallas et al., 2009; Holleman et al., 2011).

- Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en la mujer y la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. En cuanto a sus causas, no están del todo claras aún aunque factores como la edad, los antecedentes familiares o la terapia hormonal sustitutiva juegan un papel importante en su desarrollo. Tiene una

naturaleza muy heterogénea debido a que están implicados tanto mecanismos genéticos como moleculares que derivan en diferentes perfiles clínicos.

En general, un 70% de los casos se pueden clasificar como cánceres de mama dependientes de estrógenos (ER+), hormonas que estimulan la división de células mamarias así como también mantienen la densidad ósea y previenen la formación de ateromas plaquetarios (Althuis et al., 2004; Pelekanou and Leclercq, 2011). Por otra parte, un 20-30% de los casos se desarrollan por mecanismos independientes de estas hormonas (ER-), cuyo pronóstico suele ser peor (Carey et al., 2006).

En función de esta clasificación, se distinguen diferentes dianas terapéuticas para poder hacer frente al desarrollo de esta enfermedad, cuyo estudio y prevención data de mediados del siglo XX (Figura 3).

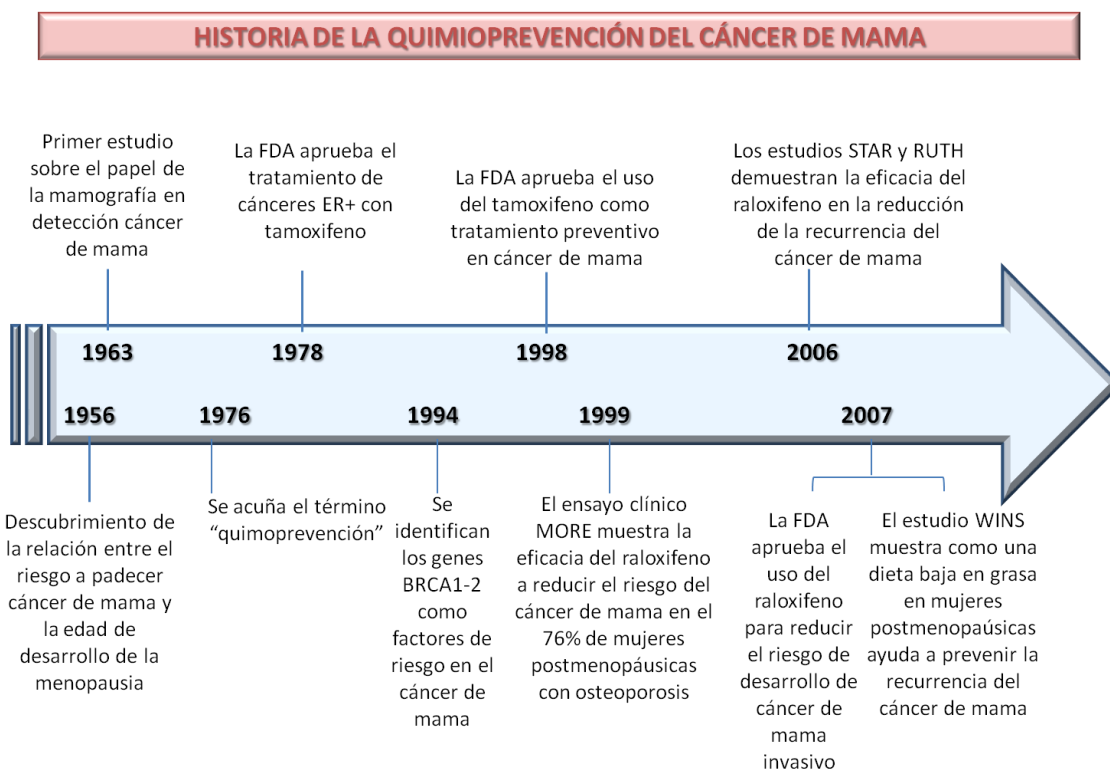


Figura 3. Historia del tratamiento "quimiopreventivo" del cáncer de mama (Cazzaniga and Bonanni, 2012)

En el caso de cánceres de mama ER+, las dianas principales frente a las que dirigir los tratamientos farmacológicos son el receptor de estrógenos y la enzima aromatasa.

- Los fármacos moduladores del receptor de estrógenos (SERMs) se han usado en el tratamiento del cáncer de mama por su efecto antagonista sobre los receptores de estrógenos localizados en el tejido mamario, aunque también presentan acción agonista en los receptores de localización uterina. Entre ellos, el tamoxifeno (TMX) (Figura 4) lleva administrándose desde hace más de 30 años como agente quimiopreventivo en el desarrollo y recurrencia de la neoplasia mamaria (Clarke, 2008).

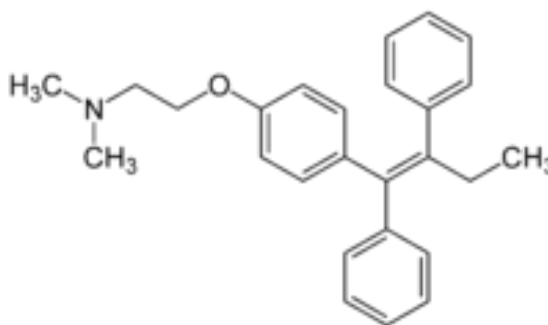


Figura 4. Estructura química del tamoxifeno.

Sin embargo, a pesar de sus buenos resultados en la prevención del desarrollo de esta enfermedad, presenta numerosos efectos adversos graves como incrementar el riesgo al desarrollo de cáncer endometrial y accidentes trombóticos, entre otros (Fisher et al., 1998), lo que hace que su administración deba considerarse de forma individualizada. Además del tamoxifeno, el raloxifeno se emplea también en la prevención de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas, mostrando un menor riesgo de

desarrollo de cáncer endometrial y accidentes trombóticos (Sporn et al., 2004).

- Del mismo modo que ocurre con los elevados niveles de estrógenos, los altos niveles de aromatasa, enzima que participa en la síntesis de estrógenos, se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. Por tanto, los inhibidores de esta enzima contribuirían también a disminuir el desarrollo tumoral de la glándula mamaria (Vogel, 2011).

En el caso de los tumores ER-, se han identificado una gran variedad de dianas terapéuticas. Entre ellas destacan: a) receptores nucleares (receptor del ácido retinoico, de vitamina D y activador de la proliferación de peroxisomas, PPAR); b) receptores de membrana y mecanismos de señalización intracelular (EGFR y receptor del factor endotelial humano, HER); c) agentes antiinflamatorios y antioxidantes (enzima ciclooxygenasa tipo 2, COX-2); d) agentes promotores de la angiogénesis (VEGF); e) moduladores de ADN (genes BRCA-1 y BRCA-2). Muchas de estas dianas han sido de reciente descubrimiento, y su investigación permitirá avanzar en el tratamiento de cánceres de mama independientes de hormona cuyo pronóstico, generalmente, suele ser peor (Cazzaniga and Bonanni, 2012).

- Cáncer de próstata

El cáncer de la próstata es una enfermedad que se desarrolla principalmente en varones de edad avanzada, y que actualmente se trata principalmente mediante cirugía (prostatectomía radical) y radioterapia, a veces acompañada de tratamientos hormonales para favorecer la supresión androgénica.

Las dianas terapéuticas frente a las que poder actuar en este tipo de cáncer son la enzima 17- α -hidroxilasa (participe en la síntesis de testosterona), la familia de receptores del factor endotelial (EGFR y HER) y el antígeno específico de la membrana prostática (PSMA) (Blanco et al., 2012).

1.1.3 *Nuevos tratamientos anticancerosos basados en nanosistemas*

La nanotecnología se ha convertido en una herramienta esencial en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. En las últimas décadas, su desarrollo e investigación ha sido el tema central de numerosos proyectos de investigación estatales, publicaciones científicas y patentes. Sin embargo, sólo una pequeña parte de los nanosistemas investigados llegan a alcanzar la fase clínica y son posteriormente comercializados (Sarker and Workman, 2007).

Recientemente, la FDA ha aprobado algunos de estas nanomedicinas para su uso en la terapia contra el cáncer (Duncan and Gaspar, 2011). De ellas, la mayoría corresponden a formulaciones lipídicas y liposómicas, así como sistemas nanoparticulados y poliméricos.

- Entre los sistemas lipídicos ya aprobados por la FDA destacan: Doxil®/Caelyx® y Myocet®, vehículos lipídicos de doxorubicina con aplicación en varios tipos de cáncer, principalmente el cáncer de mama; Depocyt®, vesículas liposómicas que contienen citarabina también aplicadas en diferentes tipos de cáncer; Daunoxome®, aplicado en el sarcoma de Kaposi asociado al VIH y que vehiculiza la daunorubicina.
- Entre los sistemas poliméricos destacan combinaciones polímero-proteína como: el Zinostatin®, aplicado en carcinoma hepatocelular basado en un copolímero de estireno y ácido maleico para la vehiculización del neocarzinostatin; Oncaspar®, un conjugado de L-asparaginasa pegilada usado en el tratamiento de leucemia linfocítica aguda.
- Entre los sistemas nanoparticulados aprobados por la FDA se encuentran: Zevalin®, BEXXAR® y Mylotarg®, conjugados basados en anticuerpos monoclonales para la terapia de diferentes tipos de cáncer; el recién comercializado Abraxane®, nanopartículas de albúmina que

permiten la vehiculización de paclitaxel para el tratamiento de cáncer de mama.

Además de esta serie de nanofármacos que tienen aplicación en la terapia anticancerosa, existen otros muchos aprobados por la FDA que se emplean en enfermedades como diabetes, artritis reumatoide o infecciones fúngicas, así como herramientas para el diagnóstico por imagen. Existe una gran cantidad de nuevas formulaciones aún en estudios clínicos que se espera den buenos resultados y puedan ser también aprobados por la FDA para su uso en diferentes terapias (Duncan and Gaspar, 2011).

2. SISTEMAS POLIMÉRICOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA

La mejora de la eficacia de los actuales tratamientos farmacológicos es una de las áreas en las que más se ha centrado la nanomedicina. El objetivo de la aplicación de las herramientas nanotecnológicas es desarrollar agentes terapéuticos de tamaño nanométrico que permitan conseguir la administración localizada del fármaco de forma más específica en su diana farmacológica, para aumentar la efectividad del tratamiento y disminuir la aparición de posibles efectos adversos (Leucuta, 2012).

La actividad de un compuesto farmacéutico por sí misma no es suficiente para asegurar una correcta terapia, sino que va a depender en gran medida de su forma de dosificación. Es necesario que el principio activo llegue a su diana terapéutica con una determinada concentración, y que esta concentración se mantenga durante un periodo de tiempo adecuado para llevar a cabo la terapia con éxito.

El problema que presentan los sistemas convencionales de administración de medicamentos es el pobre control de las concentraciones de dichas sustancias, lo que provoca que se alternen periodos de toxicidad, si la concentración supera la máxima tolerable (CMT), y de ineficacia, en el caso de no alcanzar la

concentración mínima eficaz (CME) (Figura 5) (Freiberg and Zhu, 2004). Sin embargo, la administración de fármacos mediante sistemas de liberación controlada permite mantener durante tiempos controlados y prolongados la concentración del principio activo dentro del nivel óptimo sin llegar a alcanzar niveles tóxicos e ineficaces (Figura 5).

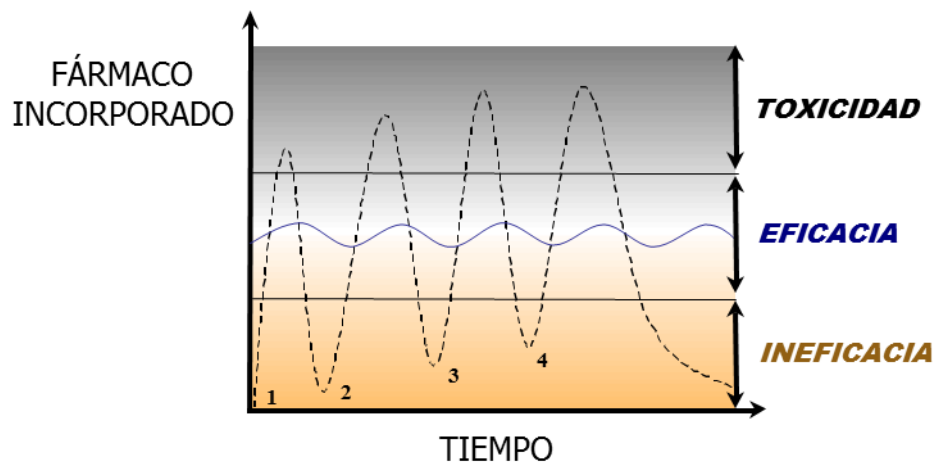


Figura 5. Comparación de un sistema de liberación controlada (línea azul continua) con un tratamiento convencional de cuatro dosis sucesivas (línea discontinua).

Con el objetivo de conseguir estas mejoras terapéuticas, la nanotecnología ha desarrollado una serie de “nanovehículos” o “nanofármacos” poliméricos que incrementan la biodisponibilidad del principio activo, permitiendo la administración de dosis más bajas y minimizando la aparición de efectos adversos habituales en la terapia convencional, con el fin último de mejorar la calidad de vida del paciente (Vizirianakis, 2011). Además, permiten controlar los parámetros farmacocinéticos y prolongar la vida media del fármaco en el organismo, ya que lo protegen de la degradación posterior a su administración (Kim et al., 2009).

Aunque en un principio los primeros dispositivos de liberación controlada se diseñaron para mantener perfiles constantes de liberación, actualmente la investigación está más centrada en su vectorización o direccionalización hacia tejidos o células diana. Para ello, se han diseñado una gran variedad de sistemas, desde implantes, geles, cápsulas o sistemas micro y nanoparticulados (Allen and Cullis, 2004).

De todos ellos, los sistemas nanoparticulados han recibido especial atención en las últimas décadas. Las nanopartículas son partículas de tamaño comprendido entre los 10-1000 nm, aunque generalmente la nanomedicina se centra en partículas de tamaño inferior a 200 nm. Su gran utilidad se debe en parte a sus características:

- Por un lado, presentan una superficie funcional importante en relación al tamaño de partícula. A esta superficie se pueden unir o adsorber otros compuestos, como fármacos o proteínas, dotando a las nanopartículas de una gran versatilidad y permitiendo dirigir la acción de las nanopartículas hacia dianas específicas tras la administración subcutánea o intravenosa (Allen and Cullis, 2004). Además, presentan mayor superficie reactiva que el resto de sus análogos de mayor tamaño.
- Por otro lado, permiten la encapsulación, la unión covalente o la adsorción de los agentes terapéuticos y diagnósticos. De esta forma, se pueden superar limitaciones inherentes a las características químicas de estos agentes, como es la solubilidad, permitiendo atravesar barreras biológicas, como son la placenta o la barrera hematoencefálica cerebral (Borm and Kreyling, 2004).

Dentro de los sistemas poliméricos nanoparticulados aplicados a la liberación controlada de fármacos se pueden encontrar diversas formulaciones (Figura 6):

- Micelas: son agregados de moléculas anfifílicas que, en disolución acuosa y en presencia de surfactantes, forman vesículas esféricas en las que se

pueden encapsular fármacos hidrófobos, facilitando así su vehiculización (Rangel-Yagui et al., 2005).

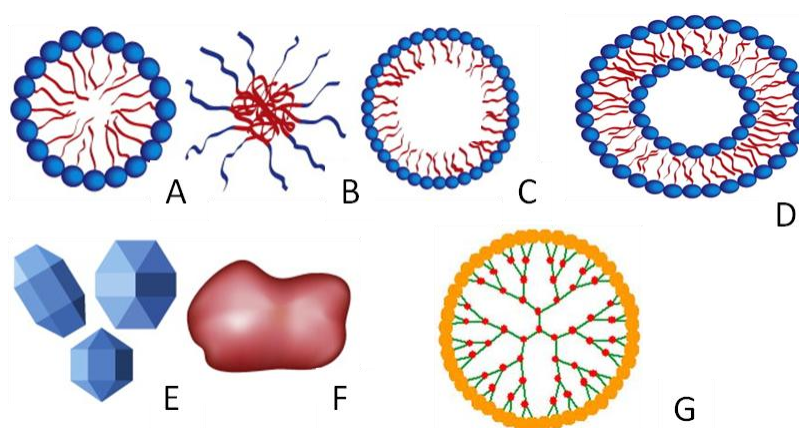


Figura 6. Ejemplos de estructuras de diferentes sistemas nanoparticulados: micelas (A-C), liposomas (D), nanopartículas sólidas (E,F) y dendrímeros (G) (Husseini and Pitt, 2008).

- Liposomas: son nanoestructuras vesiculares formadas por una bicapa lipídica compuesta por colesterol y fosfolípidos, que forman un compartimento hidrofílico en su interior donde pueden encapsularse fármacos solubles en agua (Huang, 2008). Recientemente se han aprobado nuevas formulaciones basadas en este tipo de sistemas nanoparticulados (Duncan and Gaspar, 2011).
- Nanopartículas sólidas: las nanopartículas sólidas se caracterizan porque no necesariamente presentan una forma esférica, sino que pueden presentar formas angulares o irregulares (Husseini and Pitt, 2008). En función de cómo se encuentre el fármaco distribuido en la nanopartícula, se distinguen dos formas de nanopartículas: nanoesferas, si el fármaco se dispersa por todo el sistema matricial, y nanocápsulas, si el fármaco se aloja en una cavidad y está rodeado por una estructura polimérica (Sahoo and Labhasetwar, 2003).

- Nanoemulsiones: son formulaciones compuestas por una mezcla de dos fases líquidas inmiscibles, formando pequeñas vesículas, y cuya estabilidad se mantiene gracias al uso de un surfactante. Generalmente, se preparan nanoemulsiones en las que la fase continua es la fase acuosa y el fármaco forma parte de la fase dispersa (Husseini and Pitt, 2008).
- Dendrímeros: son macromoléculas tridimensionales con forma ramificada en las cuales existe una molécula central de la que parten numerosas ramificaciones. Las ramificaciones sufren impedimento estérico y dotan al dendrímero de una cierta forma esférica. Presentan numerosas ventajas como su estructura versátil y bien definida, lo que les dota de gran capacidad de funcionalización (Haley and Frenkel, 2008).

Las características que presentan estos sistemas nanoparticulados les convierten en unas de las herramientas más prometedoras en nanomedicina, especialmente por las posibilidades que ofrecen en el tratamiento y detección de determinadas enfermedades, como es el caso del cáncer.

2.1 Aplicación de las nanopartículas en cáncer

Uno de los principales objetivos de la nanotecnología aplicada a la terapia del cáncer es superar las limitaciones que presentan los tratamientos farmacológicos actuales, que en numerosos casos son las responsables del fracaso de la terapia. El desarrollo de mecanismos de multirresistencia a fármacos en las células tumorales así como la falta de especificidad de los mismos para que únicamente actúen sobre el tejido dañado conlleva a establecer regímenes de administración con elevadas dosis repetidas que tienen como resultado la aparición de efectos secundarios indeseables para el paciente (Kawasaki and Player, 2005).

Por ello, la aplicación de las nanopartículas en el tratamiento del cáncer permite superar muchas limitaciones como éstas, ofreciendo la posibilidad de

diseñar un tratamiento más selectivo que se traduce en la mejora de la calidad de vida del paciente. Como sistemas de liberación controlada de fármacos antineoplásicos, las nanopartículas ofrecen las siguientes ventajas frente a los tratamientos convencionales (Farokhzad and Langer, 2009):

- Permiten una liberación sostenida del fármaco antitumoral a lo largo del tiempo, disminuyendo la posibilidad de alcanzar concentraciones plasmáticas tóxicas o ineficaces del fármaco. Con ello, se mejora el control de los parámetros farmacocinéticos, permitiendo administrar el fármaco a dosis menores y reduciendo la posibilidad de desarrollar efectos adversos derivados de la toxicidad del fármaco.
- Aprovechan las características fisiológicas de los tumores sólidos (vectorización pasiva) para conseguir una mayor especificidad del tratamiento.
- Pueden ser funcionalizadas con diferentes moléculas o ligandos que sean más selectivamente reconocibles por las células tumorales (vectorización activa). De esta forma, las células sanas se verán menos afectadas, con lo que también se reducen los efectos adversos.
- Encapsulan el fármaco protegiéndolo de su degradación enzimática y permiten su liberación en el citoplasma celular, incrementando su biodisponibilidad.
- Permiten la vehiculización de fármacos que presentan problemas de solubilidad que limitan su administración, como es el caso de numerosos antineoplásicos que son muy poco solubles en agua. De esta forma, se pueden desarrollar nuevas vías de administración de los mismos.

De todas estas importantes ventajas, la vectorización pasiva y activa de las nanopartículas marca la mayor diferencia respecto a los tratamientos

convencionales, y se ha convertido en el pilar fundamental para el diseño de nuevos fármacos antineoplásicos. La razón principal es que permiten aprovechar una serie de características solo presentes en los tejidos cancerosos, lo que hace que el tratamiento pueda ser mucho más selectivo y localizado, reduciendo la aparición de efectos indeseados y mejorando la eficacia terapéutica.

2.1.1 *Vectorización pasiva de las nanopartículas*

Este mecanismo se ha empleado con mayor frecuencia en el diseño de nuevos tratamientos antineoplásicos más selectivos, ya que se basa únicamente en aprovechar las características anatómicas y fisiológicas que ofrecen los tumores sólidos.

Como ha sido descrito con anterioridad, los tumores sólidos presentan unas características que no son propias de los tejidos sanos y que pueden ser aprovechadas para hacer llegar el fármaco de forma selectiva y localizada, evitando la afectación de las células sanas. Las más importantes son el efecto de retención aumentada (EPR) y la acidosis extracelular.

El EPR en los tumores se produce como consecuencia de la combinación de una débil vasculatura fenestrada y un pobre o inexistente drenaje linfático en las masas tumorales sólidas. Por ello, las partículas de tamaño nanométrico son capaces de llegar al tumor por difusión pasiva, a través de los huecos o fenestras de la neovasculatura, y permanecer allí durante un periodo de tiempo mayor (Figura 7). Esto se traduce en tiempos de circulación sanguínea más largos y una mayor posibilidad de llegar al tejido afectado (Maeda et al., 2000), consiguiendo alcanzar concentraciones de fármaco entre 10 y 50 veces más altas en células tumorales y reduciendo la toxicidad en tejidos sanos.

Los requisitos ideales que deberían cumplir las nanopartículas para conseguir la mayor direccionalización al tumor aprovechando este efecto son: 1) tamaño comprendido entre 10 y 100 nm; 2) carga neutra o aniónica para prevenir la excreción renal; y 3) habilidad de evitar la opsonización y fagocitosis a través

del sistema retículo endotelial, lo que las destruiría al ser reconocidas como material extraño (Danhier et al., 2010). Existen estrategias que permiten evitar el reconocimiento del sistema nanoparticulado por los macrófagos, como son la funcionalización de la superficie de la nanopartícula con albúmina sérica humana (HSA) o con polietilenglicol (PEG) (Yokoe et al., 2008).

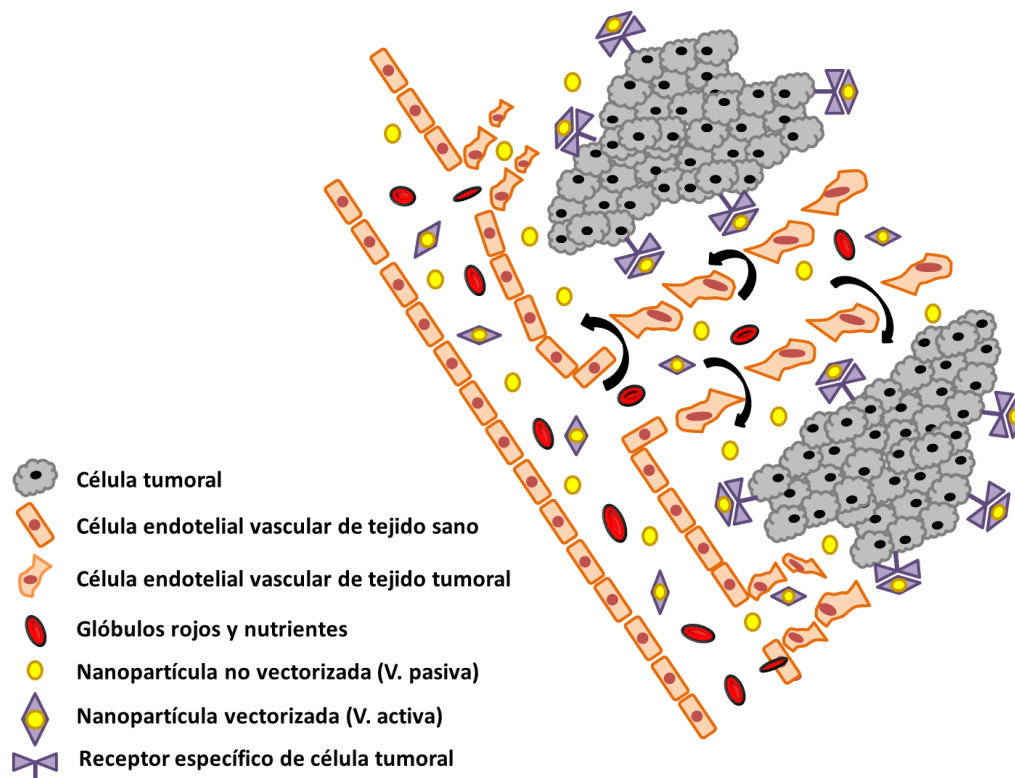


Figura 7. Representación esquemática de la vectorización pasiva y activa de las nanopartículas hacia un tejido tumoral

Otra de las características del microambiente celular tumoral es la acidosis extracelular que se produce como consecuencia del metabolismo anaeróbico por la falta de oxigenación en el centro de los tumores sólidos. Mientras en los tejidos sanos se alcanzan valores de pH en torno a 7,4, en la región extracelular de los tumores el pH puede alcanzar valores cercanos a 6 (Cardone et al., 2005; Danquah et al., 2011). Esta característica puede aprovecharse para el diseño de

sistemas de liberación controlada pH-dependiente que solo liberan el fármaco antineoplásico al penetrar en este microambiente ácido (Chen et al., 2013).

2.1.2 Vectorización activa de las nanopartículas

La mayor parte de los sistemas poliméricos nanoparticulados que han llegado a emplearse en la práctica clínica han sido diseñados para llegar al tumor aprovechando sus características fisiológicas, es decir, mediante vectorización pasiva. Sin embargo, presentan aún ciertas limitaciones en cuanto al grado de especificidad que pueden ofrecer en el tratamiento tumoral. Con el objetivo de superar estas limitaciones surge la vectorización activa de las nanopartículas.

La vectorización activa implica la unión de una molécula o ligando que es selectivamente reconocido por las células tumorales, permitiendo la entrada del sistema que vehiculiza el fármaco en el interior de las células cancerosas de forma que su acción será ejercida específicamente en el tejido afectado. Generalmente, se basa en mecanismos de reconocimiento molecular entre receptores que se encuentran sobre-expresados en las células tumorales y su ligando específico, que es la molécula que se selecciona para vectorizar los sistemas (Figura 7) (Brigger et al., 2002).

Para el diseño de estos sistemas vectorizados, se tienen que tener en cuenta los siguientes factores para crear sistemas de liberación de fármacos lo más eficaces posible: 1) el antígeno o receptor debería ser expresado exclusivamente o en gran cantidad en células tumorales y no en células sanas; 2) su expresión en células cancerosas debe ser lo más homogénea posible; 3) el antígeno de superficie debe ser estable en circulación sanguínea, de forma que únicamente se produzca la interacción del ligando con su receptor en la región tumoral concreta (Misra et al., 2010).

Dependiendo del tipo de interacción ligando-receptor, la tasa de internalización celular puede variar, y es importante tener en cuenta este factor ya que la acumulación del sistema nanoparticulado en el tumor va a depender

principalmente de esta interacción. Generalmente, se prefiere seleccionar ligandos implicados en procesos celulares de endocitosis mediada por receptor, ya que permiten emplear gradientes de concentración plasmática más bajos que en el caso de la endocitosis simple.

Debido a los recientes descubrimientos sobre los mecanismos moleculares que están implicados en el desarrollo tumoral, la vectorización activa de los sistemas nanoparticulados para la liberación controlada y selectiva de fármacos ha centrado la investigación de los últimos años con el objetivo de mejorar el tratamiento farmacológico del cáncer, existiendo muchos sistemas en desarrollo clínico que han mostrado resultados muy esperanzadores (Duncan and Gaspar, 2011).

Entre los diferentes ligandos existentes para conseguir la vectorización activa de las nanopartículas, los siguientes se han convertido en las moléculas más frecuentemente seleccionadas para conseguir una direccionalización activa de fármacos antitumorales: aptámeros, familia de factores de crecimiento epidérmico humano, transferrina, ácido fólico, y péptidos y proteínas que se unen a integrinas (Blanco et al., 2012).

- Aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla (ADN y ARN), cuya estructura comprende entre 20 y 80 oligonucleótidos, que gracias a su plegamiento tridimensional por diferentes interacciones intramoleculares son reconocidos por determinadas proteínas diana con elevada afinidad y especificidad (Cheng and Zhao, 2013).

Presentan numerosas ventajas como: 1) su estabilidad frente a cambios de pH, temperatura y fuerza iónica; 2) pueden ser sintetizados y procesados químicamente, incluso empleando disolventes orgánicos, sin perder su actividad; 3) presentan un tamaño más pequeño que los fragmentos variables de cadena sencilla de los anticuerpos, por lo que atraviesan más fácilmente los

compartimentos biológicos por permeabilidad y llegan al tejido tumoral; y 4) su versatilidad estructural permite realizar modificaciones químicas para conseguir su unión a los sistemas nanoparticulados sin perder su actividad biológica (Bouchard et al., 2010; Famulok et al., 2007). Sin embargo, debido a su pequeño tamaño, también presentan aclaramientos renales altos, con lo que sus tiempos de permanencia plasmática no son muy elevados. No obstante, existen modificaciones que permiten hacer frente a esta desventaja, como la unión de moléculas de colesterol o polietilenglicol (PEG) (Hicke et al., 2006).

Por ello, los aptámeros se han empleado activamente en la vectorización de sistemas que permiten estudiar diferentes vías de internalización celular o ser empleados como sistemas de liberación controlada de fármacos antineoplásicos. Entre algunos de los aptámeros empleados recientemente en sistemas de liberación nanoparticulados dirigidos se encuentran: el antígeno específico de la membrana prostática (PSMA), sobreexpresado en cáncer de próstata (Farokhzad et al., 2006); el aptámero AS1411 frente a la proteína nucleolina, altamente expresada en la membrana de las células tumorales (Guo et al., 2011) o el aptámero Sgc8c, que reconoce células leucémicas por su interacción con la proteína tirosin-quinasa 7 (Taghdisi et al., 2011).

- Familia de factores de crecimiento epidérmico humano

Los factores de crecimiento epidérmico humano son un grupo de moléculas directamente implicadas en procesos de crecimiento y proliferación celular mediante su reconocimiento e interacción con la familia de receptores de factor de crecimiento epidérmico humano (HER) (Laskin and Sandler, 2004).

Esta familia de receptores está formada por cuatro grupos de receptores (EGFR o HER1, HER-2/neu, HER3 y HER4), y todos ellos tienen en común un dominio intracelular con actividad tirosina-quinasa intrínseca que desencadena diferentes cascadas de señalización que estimulan o inhiben la proliferación celular, cuya regulación se ve afectada en el desarrollo tumoral.

Por ello, se han convertido también en posibles dianas farmacológicas para el tratamiento de los procesos tumorales (Desai et al., 2013). Algunos de estos tratamientos se encuentran en ya en fase de desarrollo clínico, como es el caso del Herceptin® (trastuzumab), un anticuerpo monoclonal anti-HER2 aprobado en 1998 por la FDA para el tratamiento de cáncer de mama metastático (Vrbic et al., 2013).

- Transferrina

La transferrina es la cuarta glicoproteína sérica más abundante con capacidad de fijar hierro. Se sintetiza principalmente en el hígado y se secreta a plasma con la función principal de fijar hierro endógeno y transportarlo hacia las células. El hierro actúa como co-factor en la síntesis de ADN en las células proliferantes, con lo que en caso de las células tumorales, su demanda se verá incrementada. Consecuentemente, el receptor de transferrina (CD71) se encuentra en sobre-expresado en numerosos tipos de cáncer, convirtiéndose en diana farmacológica, y permitiendo emplear la transferrina como ligando para vectorizar los sistemas de liberación controlada de fármacos antineoplásicos (Wilner et al., 2012).

Tumores como el cerebral, de mama, próstata o células escamosas han mostrado la expresión de este receptor de forma significativamente superior a las células de tejidos sanos. Algunos fármacos como el paclitaxel o la doxorubicina se han conseguido vectorizar frente a células cancerosas empleando la transferrina como ligando adherido a la superficie de las nanopartículas (Gaspar et al., 2012; Zhang et al., 2012).

- Ácido fólico

El ácido fólico o vitamina B₉ es una vitamina hidrosoluble de la familia de la vitamina B, de pequeño peso molecular, que tiene un papel fundamental en la síntesis de ácidos nucleicos (Figura 8). Concretamente, es su forma reducida, el ácido tetrahidrofólico, el que actúa como co-factor en las reacciones de transferencia de grupos con un átomo de carbono para la biosíntesis de bases

púricas y pirimidínicas. Por tanto, juega un papel muy importante en procesos de proliferación y supervivencia celular (Hilgenbrink and Low, 2005).

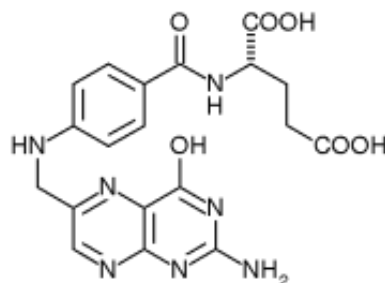


Figura 8. Estructura química del ácido fólico.

El ácido fólico penetra en las células mediante dos proteínas de membrana: el transportador y el receptor de ácido fólico. Ambos se expresan tanto en células sanas como en células tumorales; sin embargo, los requerimientos de ácido fólico de las células sanas quedan cubiertos generalmente con el papel que realiza el transportador, mientras que éste es insuficiente para cubrir las necesidades de las células tumorales. Consecuentemente, el receptor de ácido fólico, que media la captación de la vitamina por endocitosis, se encuentra sobre-expresado en este tipo de células (Lu and Low, 2002). Esto convierte a este receptor en posible diana terapéutica para la direccionalización de fármacos anticancerosos.

De las diferentes isoformas que presenta este receptor (α , β , γ/γ'), FR_{α} es la isoforma que se presenta sobre-expresada de forma significativa en el 40% de los tipos de cáncer, como el de útero, ovárico, renal, de pulmón, de cabeza y cuello o el de mama; la isoforma FR_{β} se expresa principalmente en macrófagos activados y células hematopoyéticas de origen maligno. Sobre las isoformas $FR_{\gamma/\gamma'}$ y su papel en tejidos humanos no se conoce mucho, aunque se piensa pueden estar relacionadas con la regulación de linfocitos T (Low and Kularatne, 2009). Todas

ellas, y principalmente FR_{α} y FR_{β} , presentan elevada afinidad por el ácido fólico y sus derivados.

El empleo del ácido fólico como ligando para la funcionalización de sistemas de liberación controlada de antineoplásicos ofrece algunas ventajas frente al uso de anticuerpos monoclonales para la vectorización. Entre ellas, su económico precio, estabilidad, inexistente toxicidad e inmunogenicidad, y elevada afinidad por sus receptores (Low and Antony, 2004).

Estas ventajas frente a otras formas de vectorización le han convertido en una de las moléculas más empleadas para el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos empleados en el tratamiento de los cánceres anteriormente citados, como la doxorrubicina (Shmeeda et al., 2006), el tamoxifeno o el 5-fluoruracilo (Blanco et al., 2011; Blanco et al., 2010).

Además, también ha sido empleado como marcador de sistemas que se emplean como nuevas herramientas en diagnóstico por imagen de tumores, mostrando muy buenos resultados y permitiendo obtener más información sobre mecanismos moleculares que median el desarrollo de esta enfermedad (Yang et al., 2010).

- Péptidos y proteínas que se unen a integrinas

Las integrinas son una familia de receptores glicoproteicos que participan mayoritariamente en la unión de las células con la matriz extracelular, y también en la unión célula-célula. Presentan dos subunidades, una α y otra β , de las cuales se han detectado diferentes tipos.

Estos receptores se encuentran presentes en bajas concentraciones en las células endoteliales de los vasos sanguíneos de tejidos sanos, mientras que aparecen sobre-expresados en el caso de los tejidos tumorales (Brannon-Peppas and Blanchette, 2004). Concretamente, las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ se han asociado con procesos reguladores del desarrollo de la angiogénesis y, en el caso de la

$\alpha_v\beta_3$, con la posterior migración celular para invadir nuevos tejidos (Nisato et al., 2003).

Recientemente, se han diseñado péptidos y anticuerpos capaces de bloquear la acción de estas integrinas en la formación de la neovasculatura para la vectorización de sistemas antineoplásicos. Entre ellos, el péptido RGD ha demostrado buenos resultados en la vectorización de fármacos como doxorubicina (Garg et al., 2009) o paclitaxel (Jiang et al., 2011).

3. BIOMATERIALES

El desarrollo de la nanotecnología y su aplicación en las ciencias biomédicas ha tenido como consecuencia una gran evolución en el campo de investigación sobre los biomateriales a lo largo del siglo XX, y sobre todo la pasada década, con el objetivo de obtener materiales adecuados para su uso en nanomedicina.

El concepto de biomaterial fue definido por primera vez en 1987 por la Sociedad Europea de Biomateriales (Ratner and Bryant, 2004), la cual estableció una definición amplia y genérica de los mismos como “materiales inertes empleados en dispositivos médicos pensados para interactuar con sistemas biológicos”.

Años más tarde se planteó una revisión más específica del concepto. Los biomateriales fueron definidos en 1999 como sustancias capaces de interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier función, tejido u órgano del cuerpo (Williams, 2009). Esta definición ha sido aceptada de forma general en los últimos años por la mayoría de autores.

Sin embargo, y como consecuencia del empleo de estos materiales en campos muy diversos que abarcan desde la regeneración de tejidos hasta la terapia génica y farmacológica, algunos autores defienden una nueva re-definición del término biomaterial proponiendo la siguiente: “un biomaterial es toda sustancia que ha

sido diseñada para ser usada, bien sola o formando parte de un sistema, para dirigir y seguir el curso de cualquier proceso diagnóstico o terapéutico mediante interacción con componentes de los sistemas vivos, ya sean humanos o animales” (Williams, 2009).

Los biomateriales deben cumplir una serie de requisitos específicos, ya sean de naturaleza físico-química, mecánica o biológica, dependiendo de su aplicación en el organismo. Sin embargo, el diseño de biomateriales debe contemplar una característica fundamental que deben cumplir los mismos, independientemente de la funcionalidad, que es su biocompatibilidad.

Debido a la compleja organización del cuerpo humano, cualquier sustancia que sea introducida en él, ya sea de origen natural o sintético, va a desencadenar una respuesta inmunológica que permitirá la identificación, el rechazo o la admisión de la nueva sustancia introducida (Figura 9) (Chauvel-Lebret et al., 1999). El concepto de biocompatibilidad se refiere al conjunto de interacciones, entre el cuerpo extraño introducido y el medio fisiológico, que determinan el período necesario para su reconocimiento y la intensidad de estas reacciones para llevar a cabo su asimilación o rechazo, con el posterior restablecimiento del equilibrio interno (Fournier et al., 2003).

Con el objetivo de que la respuesta inflamatoria sea leve y corta, los materiales empleados en el desarrollo de sistemas de liberación controlada deben cumplir, en la medida de lo posible, este requisito de biocompatibilidad para evitar el rechazo del organismo.

Dentro los biomateriales empleados en biomedicina, probablemente el grupo que tiene un mayor protagonismo es el de los polímeros. Los biomateriales poliméricos poseen múltiples aplicaciones, desde la sustitución y regeneración tisular hasta un uso terapéutico, como es el caso de la liberación controlada de fármacos, medicamentos poliméricos o polímeros terapéuticos (Kabanov, 2006; Vicent and Duncan, 2006).

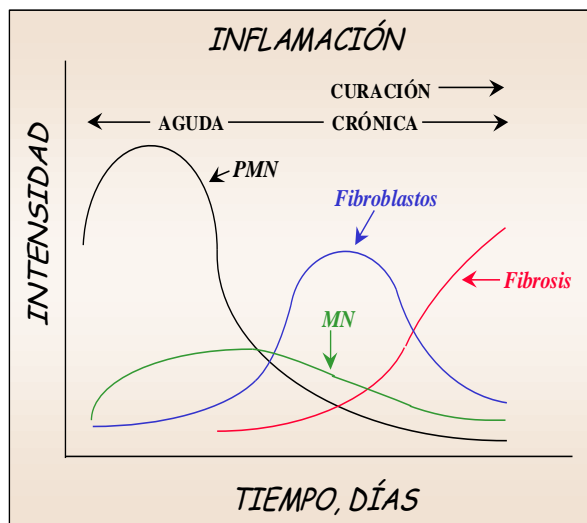


Figura 9. Respuesta inflamatoria del organismo humano ante la implantación de un dispositivo o cuerpo extraño; PMN: leucocitos polimorfonucleares y MN: leucocitos mononucleares.

3.1 Biomateriales poliméricos

Los polímeros empleados como biomateriales ofrecen una amplia gama de propiedades en función de sus combinaciones estructurales y métodos preparativos usados. Esto les convierte en materiales muy versátiles, y ofrece la posibilidad de escoger el material más adecuado para cada aplicación y finalidad perseguida en cada momento. Además, el desarrollo de nuevos materiales poliméricos ha supuesto un papel fundamental para el avance de la nanomedicina, permitiendo la obtención de sistemas con propiedades innovadoras para aplicaciones de importancia crítica (Kim et al., 2009).

Aunque existen numerosos polímeros que cumplen el requisito de biocompatibilidad, la tendencia actual es el empleo de polímeros que además sean biodegradables; esto es, polímeros que, bien ellos mismos o sus subproductos, sean eliminados a través de una vía natural, después de haber

concluido su función, ofreciendo la oportunidad de ser metabolizados y eliminados por el organismo sin producir ningún efecto tóxico en estos procesos (Nair and Laurencin, 2007).

Existen polímeros de origen natural y sintético que ofrecen estas características, aunque generalmente se suelen emplear combinaciones de varios polímeros ya que no suele ser posible encontrar un compuesto que reúna todas las propiedades ideales para una determinada aplicación por sí solo.

3.1.1 Biomateriales poliméricos de origen natural

El grupo de polímeros naturales engloba un elevado número de compuestos de diferente naturaleza que han sido y continúan siendo muy empleados en el desarrollo de nuevos sistemas, gracias a que presentan numerosas ventajas respecto a los materiales poliméricos de origen sintético. Entre ellas (George and Abraham, 2006):

- Son materiales más sencillos de obtener que los polímeros de origen sintético, ya que muchos de ellos se obtienen de fuentes naturales, lo que supone un menor coste económico.
- Presentan estructuras con gran cantidad de grupos reactivos susceptibles de sufrir modificaciones químicas importantes, dotándolos de una gran versatilidad.
- Por su similitud con estructuras presentes en el medio biológico, son susceptibles de ser degradados enzimáticamente, acercándose más al concepto de biocompatibilidad que deben cumplir los biomateriales y siendo menos rechazados por el organismo.

Aunque dentro de los polímeros naturales existe una gran variedad de estructuras, las proteínas y los polisacáridos constituyen dos de los grupos más importantes por las numerosas aplicaciones que presentan en el desarrollo de nuevos sistemas poliméricos.

- Polímeros naturales de naturaleza proteica

Los sistemas de composición proteica son particularmente interesantes debido a sus numerosas ventajas, como su gran estabilidad *ex vivo* e *in vivo*, baja toxicidad e inmunogenicidad, y fácil manejo a escala industrial (Langer et al., 2003).

La **albúmina** es la proteína plasmática más abundante en el ser humano (35-50g/L suero). Su estructura primaria se caracteriza por un bajo contenido en triptófano y metionina, y un elevado contenido en cisteína y aminoácidos con carga (ácido glutámico y aspártico, lisina y arginina). La presencia de glicina e isoleucina es menor que el promedio de otras proteínas. La carga total elevada le proporciona una buena solubilidad en medio acuoso, y los 17 puentes disulfuro intracatenarios que se forman entre los restos de cisteína de la molécula contribuyen a su elevada estabilidad. Además de las cisteínas que se encuentran formando parte de los puentes disulfuro, la albúmina presenta un residuo de cisteína libre, característica que no está presente en el resto de proteínas extracelulares (Peters, 1985).

En cuanto a la estructura secundaria de la proteína se diferencian dos conformaciones diferentes: aproximadamente un 55% de la proteína se encuentra en forma de α -hélice, mientras que un 16% se encuentra en forma de lámina β . Sin embargo, estos porcentajes varían en función del pH al que se encuentre la proteína ya que es sensible a este factor, produciéndose cambios conformacionales que alteran su forma en el espacio (Carter and Ho, 1994).

Como la mayoría de las proteínas plasmáticas, la albúmina se sintetiza en el hígado. A ella se unen numerosos compuestos para ser transportados en el organismo: ácidos grasos de cadena larga, bilirrubina, fármacos y metales. Además es la proteína responsable de la presión osmótica en la sangre y es una fuente importante de aminoácidos para el tejido periférico cuando es degradada.

La albúmina presenta otras características que hacen que sea fundamental en el campo de los biomateriales. Es biodegradable, no tóxica, no inmunogénica, metabolizada *in vivo* sin producir productos tóxicos, estable en un intervalo amplio de pH, fácil de purificar y soluble en agua (Kratz et al., 1997; Rahimnejad et al., 2006). Además, presenta numerosos sitios de unión en su estructura que permiten la incorporación de cantidades significativas de fármacos a su matriz polimérica (Patil, 2003). Así mismo, ofrece la posibilidad de interactuar de forma electrostática con otras moléculas iónicas por el elevado contenido de aminoácidos cargados en su estructura, sin necesidad de emplear moléculas adicionales, permitiendo llevar a cabo también diferentes procedimientos de síntesis y preparación de nanosistemas (Weber et al., 2000).

Estas características, así como los grandes requerimientos de albúmina que tienen los tumores y los tejidos inflamados, la convierten en una candidata perfecta para su uso en sistemas de liberación de fármacos (Kratz, 2008).

En el mercado se pueden encontrar diferentes tipos de albúmina en función de su fuente de obtención. Así, se obtiene albúmina a partir de la clara de huevo (ovoalbúmina), suero bovino (albúmina sérica bovina, BSA) o suero humano (albúmina sérica humana, HSA). Todas ellas ofrecen numerosas posibilidades en cuanto a la obtención de diferentes nanosistemas preparados mediante diferentes técnicas (Elzoghby et al., 2012).

El **colágeno** es la proteína con función mecánica y estructural de mayor relevancia en el organismo humano. Se encuentra formando fibras que proporcionan resistencia a la tracción en diferentes tejidos como cartílagos, tendones, huesos, piel, vasos sanguíneos o músculos, donde juega un papel clave para el correcto funcionamiento de los mismos aportando flexibilidad y resistencia a la fractura. Presenta estructura de triple hélice y se han aislado hasta 28 tipos de colágenos diferentes en función de su secuencia polipeptídica (Puxkandl et al., 2002).

Debido a la importancia funcional que ejerce esta proteína en el organismo, el colágeno ha sido la molécula de elección para el trabajo en el campo de regeneración tisular, donde se ha empleado bien solo o junto a otros compuestos para el desarrollo de plataformas o “andamios” (scaffolds) sobre los que promover el crecimiento de células procedentes de diferentes tejidos, como el óseo o epitelial (Abou Neel et al., 2013). Así mismo, estas plataformas se han empleado en la modelización *in vitro* de tumores con el objetivo de diseñar nuevas técnicas que supongan un paso intermedio entre los cultivos celulares bidimensionales y la experimentación con modelos tumorales en animales (Chen et al., 2012).

Las **caseínas** son un grupo de proteínas que constituyen aproximadamente el 80% del total de proteínas de la leche. Son proteínas fosfatadas que entran dentro de la definición de globulinas. Se distinguen cuatro tipos de caseínas: caseína α , caseína β y caseína k que se diferencian en su peso molecular y en la cantidad de grupos fosfatos unidos. Presentan entre 19 y 25 kDa de peso molecular y su punto isoeléctrico se encuentra entre 4,6 y 4,8. Todas ellas presentan estructuras anfifílicas bien definidas.

La importancia de estas proteínas radica en que se organiza formando micelas, lo que les permite solubilizar determinados compuestos de naturaleza hidrofóbica, en su gran capacidad de captar agua, elevada afinidad por moléculas pequeñas e iones, y propiedades emulgentes. Además, tienen la característica de que pueden formar geles con hinchamiento dependiente del pH del medio. Todo ello convierte a las caseínas en candidatas perfectas a ser empleadas como polímeros para el diseño de sistemas aplicados en nanomedicina (Elzoghby et al., 2011).

- Polímeros naturales de naturaleza polisacáridica

Los polisacáridos son los polímeros de los monosacáridos. Se obtienen a partir de fuentes naturales con diversos orígenes: desde algas (alginato), plantas (pectina y goma guar) y microorganismos (dextrano y goma xantán), hasta

fuentes animales (quitosano o condroitina) (Sinha and Kumria, 2001). Presentan gran variabilidad en cuanto a pesos moleculares y composición química, lo que contribuye a su diversidad en estructura y propiedades.

Los polisacáridos son compuestos muy estables, no tóxicos, hidrofílicos y biodegradables. Al poder ser obtenidos a partir de fuentes naturales su precio es bastante asequible. La presencia de muchos grupos reactivos como grupos carboxilos, hidroxilos y amino permite que reaccionen estableciendo enlaces no covalentes con tejidos orgánicos (epitelios o mucosa) a través de un mecanismo de bioadhesión, siendo susceptibles de ser modificados estructuralmente, lo que les proporciona una enorme versatilidad (Lee et al., 2000).

Muchas de estas características no son fácilmente reproducibles por los polímeros sintéticos, por lo que los polisacáridos se han convertido en materia prima ideal para formar parte de sistemas con aplicación en nanomedicina.

El **alginato** es un polisacárido procedente de las paredes y espacios celulares de las algas pardas marinas. Su estructura química se compone de unidades de ácido β -D-manurónico y de ácido α -L-gulurónico unidos mediante enlaces (1-4) (Figura 10), que se combinan de diferentes formas dependiendo de su origen. Su peso molecular va desde los 200 hasta los 500 kDa (Rehm, 2009). La secuencia de los monosacáridos y la proporción de los mismos es determinante en las propiedades físico-químicas del alginato (Yang et al., 2011).

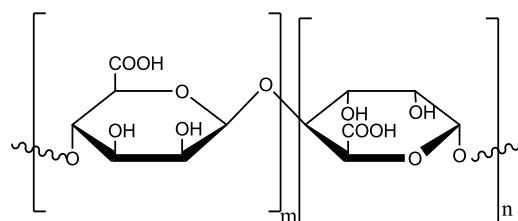


Figura 10. Estructura química del alginato

Este polisacárido es biocompatible, no tóxico, no inmunogénico y biodegradable. Presenta un gran número de grupos funcionales carboxílicos e hidroxílicos susceptibles de ser modificados para mejorar sus propiedades en función de su posible aplicación, lo que le convierte en un polímero muy versátil.

Su fácil funcionalización, elevado grado de mucoadhesión celular y biodegradabilidad hacen que sea uno de los polisacáridos más empleados en el diseño de nanosistemas con aplicaciones médicas, desde sistemas de liberación controlada hasta “andamios” para el crecimiento celular (Barbosa et al., 2005; Pandey and Ahmad, 2011).

El **quitosano** es un polisacárido lineal compuesto por unidades de glucosamina y N-acetil-glucosamina unidas mediante enlaces β -(1-4). Procede de la hidrólisis básica de la quitina, polímero muy abundante en la pared celular de los hongos y en los exoesqueletos de los invertebrados (Muzzarelli and Muzzarelli, 2005). Existen diferentes tipos de quitosanos en función de su grado de desacetilación y peso molecular, que suelen estar entre un 60 y 100% y 3,8-20 kDa, respectivamente.

Este biopolímero se considera biodegradable y no tóxico, y por ello presenta numerosas aplicaciones, desde la industria textil hasta la farmacéutica y biomédica (Guerrero et al., 2010). Es precisamente en estos últimos sectores donde su capacidad de ser degradado mediante enzimas, su carácter policatiónico y su elevada bioadhesividad le han convertido en una herramienta fundamental para el desarrollo de sistemas con aplicación en nanomedicina (Davidenko et al., 2009; Varum et al., 2008).

El **ácido hialurónico** es un polisacárido, de la familia de los glucosaminoglicanos, cuya estructura se compone de la repetición de unidades disacáridicas formadas por ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina unidos mediante enlaces β -(1-3) y β -(1-4) (Cafaggi et al., 2011). Su peso molecular puede alcanzar hasta 10^4 kDa, y presenta numerosos grupos funcionales en su

estructura que pueden ser modificados con el objetivo de conseguir unas propiedades del material adecuadas para su correcta aplicación (Burdick and Prestwich, 2011).

Este polisacárido aniónico se encuentra ampliamente distribuido en la matriz extracelular de los tejidos de los vertebrados, como en cartílago, piel y líquido sinovial, y presenta propiedades viscoelásticas y reológicas. Es biodegradable, bioactivo, no inmunogénico y no citotóxico, e incluso está implicado en diferentes procesos celulares, tales como la angiogénesis y la inflamación (Leach and Schmidt, 2005; Oh et al., 2010).

Por sus propiedades, ha sido empleado como biomaterial en la regeneración de tejidos, y también en la industria cosmética, oftalmológica y farmacológica, ofreciendo resultados muy esperanzadores (Kogan et al., 2007).

3.1.2 Biomateriales poliméricos de origen sintético

Con la intención de diseñar un biomaterial adecuado para una aplicación específica, la ingeniería de polímeros ha desarrollado numerosos compuestos de origen sintético con propiedades adecuadas para su uso en nanomedicina, tales como la biodegradabilidad y biocompatibilidad. Esta ingeniería facilita así una gran gama de compuestos con diferentes propiedades y características, permitiendo adecuar el material a los requisitos que exija su posible aplicación para conseguir una completa funcionalidad (Kumari et al., 2010).

Entre los polímeros sintéticos más empleados en biomedicina destacan los polímeros con grupos reactivos, como poliésteres alifáticos o ácidos poliamínicos, y los polímeros sensibles a estímulos, como polímeros termosensibles, sensibles a cambios de pH o fotosensibles (Tian et al., 2012).

El poli(ácido láctico) (PLA), el poli(ácido glicólico) (PGA), sus copolímeros (PLGA), y la poli(ϵ -caprolactona) (PCL) son algunos de los polímeros más representativos del grupo de **poliésteres alifáticos**. Se trata de polímeros

termoplásticos con grupos ésteres hidrolíticamente lábiles en su estructura principal. Se sintetizan por polimerización de los monómeros o por policondensación en función del polímero de partida (Nair and Laurencin, 2007). Han recibido una especial atención por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad, junto con la posibilidad de controlar su perfil de degradación, convirtiéndose en uno de los grupos poliméricos más empleados en nanomedicina (Lou et al., 2003).

Otro gran grupo de polímeros sintéticos empleados en nanomedicina son los “**polímeros sensibles a estímulos**”, o también denominados “polímeros inteligentes”. Estos polímeros sufren un cambio de sus propiedades mediante estímulos como la temperatura, el pH, la concentración de electrolitos, metabolitos, luz, campo eléctrico o magnético, produciendo una o varias transiciones de fase característica para cada tipo de sistema. En medicina, los polímeros con respuesta a estímulos tienen que exhibir sus propiedades de respuesta dentro de los márgenes de las condiciones biológicas (Schmaljohann, 2006). Estos polímeros inteligentes se han diseñado y aplicado en diferentes campos de investigación, como la liberación controlada de fármacos, ingeniería de tejidos o diseño de biosensores (Jeong and Gutowska, 2002).

4. PRINCIPALES MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS

Como consecuencia de los resultados esperanzadores que ofrece la aplicación de la nanotecnología en las ciencias biomédicas, y más concretamente, en el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos basados en sistemas de liberación controlada de fármacos, la investigación sobre las técnicas de preparación de estos sistemas ha sufrido un gran desarrollo.

El mayor conocimiento en la química de polímeros ha permitido el desarrollo de diferentes formas de preparación de nanopartículas poliméricas que ofrecen diferentes posibilidades en función de la aplicación deseada de los sistemas y de

la naturaleza de los polímeros que van a formar parte de su composición (Braunecker and Matyjaszewski, 2007). A continuación se detallan algunos de los métodos más representativos que se han empleado para la preparación de nanosistemas poliméricos.

4.1 Preparación de nanopartículas mediante emulsión

La formación de nanopartículas a partir de un sistema previamente emulsionado ha sido uno de los métodos más empleados para la obtención de estos sistemas. En todos los casos, se parte de dos fases inmiscibles entre sí y es necesario el uso de un agente surfactante para estabilizar la emulsión. Son procesos compuestos de dos etapas: en la primera etapa se produce la dispersión de una fase en otra, y en la segunda etapa se produce la formación de las nanopartículas, y es la que de verdad da el nombre al método. Son muy pocos los casos en los que las nanopartículas quedan formadas y estabilizadas en el primer paso del proceso.

En cuanto a la primera etapa del procedimiento, existen diferentes formas de llevar a cabo la formación de la emulsión, es decir, la dispersión de una fase en la otra. Existen métodos que emplean la temperatura de inversión de fases como factor dispersante (Anton et al., 2008), pero la mayoría de ellos emplean procesos mecánicos, tales como la agitación intensa, que favorecen que ambas fases queden mezcladas de forma homogénea (Storka et al., 2003). El tamaño de las gotículas producidas en la emulsión dependerá de parámetros como la intensidad o el tiempo de agitación, y deben controlarse para obtener un tamaño de partícula lo más homogéneo posible. Sin embargo, existen también métodos de microfiltración que permiten la selección de un intervalo de tamaño de partículas determinado (Geerken et al., 2007).

Una vez que la emulsión se ha formado y estabilizado por la presencia del surfactante, se lleva a cabo la segunda etapa en la que se producirá la formación de las nanopartículas. Esta fase puede llevarse a cabo de diferentes formas:

induciendo la precipitación polimérica a través de la eliminación del disolvente, por gelación de las gotículas o mediante polimerización *in situ*.

a) **Precipitación polimérica mediante la eliminación del disolvente.** Las gotas poliméricas formadas en la emulsión se precipitan mediante la retirada progresiva del disolvente a través de diferentes técnicas:

- Evaporación del disolvente que compone la fase continua de forma progresiva, con lo que las gotas poliméricas de la fase dispersa irán precipitando a medida que el disolvente se evapora. El disolvente debe ser volátil para favorecer su evaporación a temperaturas relativamente bajas, como el diclorometano o el cloroformo (Anton et al., 2008).
- Difusión de disolvente o desplazamiento del disolvente mediante la adición de un volumen grande de fase acuosa tras la formación de las gotas de la emulsión, lo que provoca que el disolvente contenido en estas gotas difunda hacia la fase acuosa, precipitando la fracción polimérica. Para ello, el disolvente debe ser parcialmente soluble en agua, como alcohol bencílico o acetato de etilo (Leroux et al., 1995).
- Efecto "Salting Out" o efecto salino que se produce al emplear una elevada concentración de sales en la fase acuosa. Los electrolitos más empleados en esta técnica son el cloruro de magnesio, el cloruro cálcico y acetato de magnesio (Ibrahim et al., 1992).

b) **Gelación de las gotas de la emulsión.** Las gotas poliméricas formadas en la emulsión se gelifican mediante diferentes técnicas en función del polímero empleado en la composición, que debe tener el requisito de tener propiedades gelificantes. Existen polímeros, como la agarosa, que se gelifican modificando la temperatura (Vauthier and Couvreur, 2000),

mientras que otros como el alginato o la pectina se gelifican añadiendo una sal iónica y cambiando las condiciones del pH (Opanasopit et al., 2008) (Figura 11).

- c) **Polimerización *in situ*:** En esta técnica la emulsión se prepara con unidades monoméricas en lugar de poliméricas, de forma que mediante una reacción de polimerización que se dispara con la adición de un iniciador comienzan a formarse unidades poliméricas, y con ellas, las nanopartículas (Weiss et al., 2007).

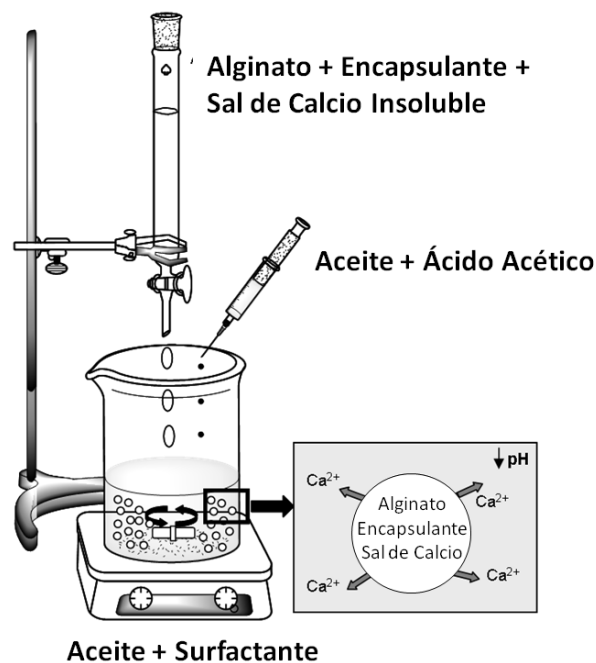


Figura 11. Esquema representativo de la formación de nanopartículas de alginato por gelación interna.

4.2 Preparación de nanopartículas mediante interacciones poliméricas covalentes

Esta técnica de preparación de nanopartículas implica el establecimiento de interacciones covalentes entre ambos polímeros que componen la nanopartícula. Para ello, se emplean diferentes agentes entrecruzantes de distinta naturaleza,

que son añadidos durante el proceso de síntesis de los sistemas en unas condiciones determinadas para que establezcan interacciones inter- e intramoleculares, estabilizando así la estructura de la nanopartícula.

Entre los primeros entrecruzantes que se emplearon, el glutaraldehído ha sido uno de los más usados en esta técnica de producción de nanopartículas (Zhi et al., 2005); sin embargo, la toxicidad que presenta este compuesto ha hecho que sea necesario el empleo de otras moléculas más biocompatibles como los ácidos di- y tricarbónicos naturales (ácido succínico, málico, tartárico y cítrico), cuyos grupos ácidos se activan previamente mediante una reacción mediada por una carbodiimida para aumentar su reactividad (Bodnar et al., 2005).

El establecimiento de enlaces presentes de forma natural en muchas macromoléculas, como es el caso de los enlaces disulfuro, es otra técnica para el establecimiento de interacciones covalentes entre los polímeros de forma que las nanopartículas queden estabilizadas. La existencia de grupos tiol libres puede ocurrir de forma original en las moléculas de partida, o bien por la introducción de los mismos mediante modificación química de los reactivos originales. Posteriormente, se lleva a cabo un proceso oxidativo que persigue la formación de enlaces disulfuro inter- e intramoleculares. Esta técnica de formación de nanopartículas es relativamente sencilla e inocua, ya que con un simple cambio de pH se puede favorecer la formación de estos enlaces (Bernkop-Schnurch, 2005) (Figura 12).

4.3 Preparación de nanopartículas mediante interacciones poliméricas iónicas

La obtención de nanopartículas mediante el establecimiento de interacciones iónicas se incluye dentro de los métodos que no emplean disolventes orgánicos, ya que todo el proceso de síntesis se lleva a cabo en medio acuoso. Esto presenta una serie de ventajas, ya que la metodología suele ser sencilla y el empleo

exclusivo de disolventes acuosos permite aproximarse más al concepto de biocompatibilidad.

Se basa en el empleo de polímeros que presentan carga positiva o negativa cuando se encuentran en disolución acuosa, y son capaces de gelificar en presencia de pequeños iones de carga contraria. Es necesario emplear concentraciones bajas de polímeros en disolución de forma que al interactuar con el agente gelificante las nanopartículas resultantes posean un tamaño pequeño (Vauthier and Bouchemal, 2009).

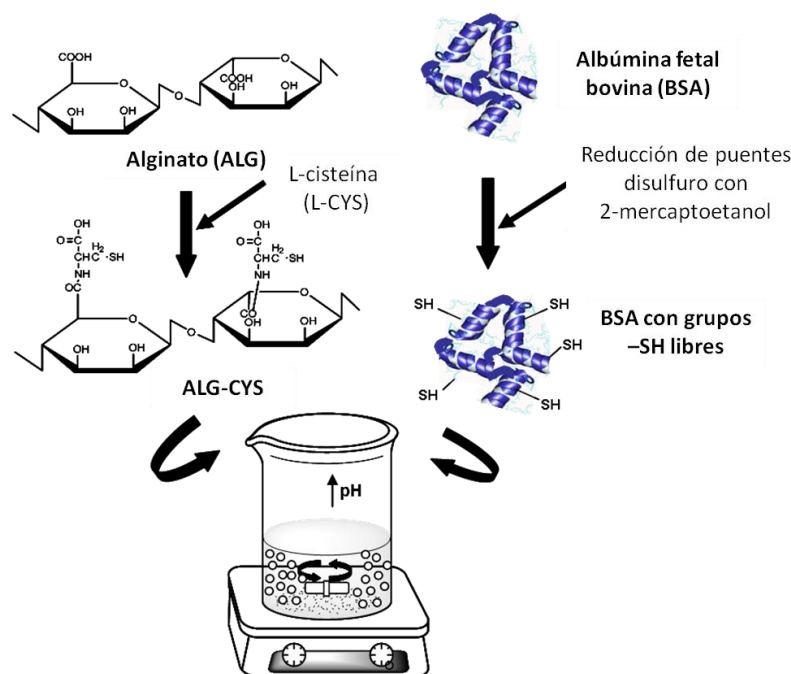


Figura 12. Representación esquemática de la formación de nanopartículas de alginato y albúmina mediante la formación de puentes disulfuro entre ambos polímeros modificados.

Existen diferentes compuestos que se han empleado como entrecruzantes iónicos. El tripolifosfato sódico (TPP) es un entrecruzante de carga aniónica que ha sido ampliamente utilizado para formar nanopartículas con polímeros catiónicos, como es el caso del quitosano (Amidi et al., 2006; Pan et al., 2002). Las cargas negativas que aporta el TPP interactúan con los grupos amino cargados

positivamente del polímero, favoreciendo la formación de partículas de tamaño nanométrico.

Para los polímeros cargados negativamente, como es el caso del alginato, se emplean entrecruzantes catiónicos. El ión divalente de calcio, procedente de una sal cálcica (cloruro de calcio, por ejemplo), es capaz de interactuar con las cargas negativas de los grupos ácidos de estos polímeros, formando partículas. Sin embargo, en algunos casos es necesario previamente estabilizar las partículas en una fase de pre-gel con compuestos como la poli-lisina para después llevar a cabo su entrecruzamiento iónico con calcio con el objetivo de reducir el tamaño de las partículas obtenidas, y que éstas se encuentren en un rango nanométrico de tamaño (Ahmad et al., 2006; Azizi et al., 2010).

4.4 Preparación de nanopartículas mediante auto-ensamblaje de macromoléculas

4.4.1 Formación de complejos polielectrolíticos (PEC)

Los complejos polielectrolíticos (PEC) se forman por interacción entre dos polímeros que presentan cargas opuestas mediante interacciones electrostáticas entre ambas macromoléculas. Generalmente se suelen establecer interacciones entre polímeros ricos en grupos ácidos, que aportan la carga negativa, y polímeros con abundantes grupos amino, que aportan la carga positiva. Son materiales muy interesantes ya que algunas de sus propiedades, como su hinchamiento o permeabilidad, pueden ser modificadas de forma sencilla mediante estímulos externos como el pH del medio, lo que les convierte en sistemas muy versátiles.

La estructura de estas partículas puede describirse como el de un gel compuesto por cadenas polielectrolíticas hinchadas por la interacción con moléculas de agua. La carga superficial de las partículas vendrá determinada por el polielectrolito que se encuentre en exceso. Hacia la parte central de la nanopartícula se orientan los fragmentos poliméricos que no tienen carga,

mientras que las fracciones cargadas quedan expuestas hacia el exterior (Vauthier and Bouchemal, 2009). Así mismo, la relación de pesos moleculares de ambos polielectrolitos afecta al tamaño de las nanopartículas, de forma que el polímero de mayor peso molecular sirve de “hospedador” del polímero de menos peso molecular (Schatz et al., 2004). Algunos de los polielectrolitos más usados para preparar estos complejos son el quitosano, la poli-etilenamina, la poli-ornitina o la poli-lisina. En el caso de los polianiones destacan el alginato, el glucomanano, la carboximetil celulosa o el dextran-sulfato (Martínez et al., 2012).

4.4.2 Ensamblaje de polímeros hidrofóbicamente modificados

Con el objetivo de sintetizar polímeros de carácter anfifílico, varios segmentos hidrofóbicos pueden ser añadidos a las cadenas de polímeros hidrofílicos, de forma que se puedan obtener estructuras micelares. En estas estructuras micelares, las regiones hidrofílicas de las moléculas están orientadas hacia el exterior y la parte hidrofóbica queda situada en el interior de la micela, formando un reservorio hidrofóbico con envuelta hidrofílica, que permite la encapsulación y vehiculización de moléculas de carácter hidrofóbico (Letchford and Burt, 2007).

Existen diferentes moléculas de carácter hidrofóbico que pueden ser unidas a cadenas poliméricas hidrofílicas con el objetivo de obtener estos sistemas micelares. Entre ellas, las más destacadas son los ácidos grasos de cadena larga (ácido hexanoico, linoleico, palmítico o esteárico), la poli(ϵ -caprolactona), los copolímeros de Pluronic, el colesterol o el poli-isobutilcianoacrilato (PIBCA), entre otras (Martínez et al., 2012).

4.5 Preparación de nanopartículas mediante nanoprecipitación

La nanoprecipitación es uno de los métodos más empleados para la obtención de nanopartículas, debido a su simplicidad y a la economía de la técnica.

Para llevar a cabo este procedimiento es necesario un sistema formado por tres componentes: el polímero, el disolvente del polímero y un medio en el que el polímero no sea capaz de disolverse. Para la obtención de nanopartículas, la disolución polimérica se mezcla con el medio en el que el polímero no es soluble mediante agitación, de forma que las partículas se obtienen de forma inmediata cuando ambos medios se ponen en contacto.

La diferencia que presenta este método respecto al previamente descrito en el apartado de las emulsiones, donde los polímeros también son precipitados por difusión, es que en este sistema la disolución polimérica es completamente insoluble en la otra fase, mientras que en el sistema emulsionado hay una disolución parcial de ambas fases (Schubert et al., 2011).

Esta metodología para la obtención de nanopartículas se ha empleado con polímeros sintéticos como el PLA y PLGA (Lassalle and Ferreira, 2007), así como con polímeros naturales como el quitosano o las ciclodextrinas (Hornig and Heinze, 2008).

OBJETIVOS/ OBJECTIVES

El cáncer se ha convertido en una de las causas de mortalidad más comunes a nivel mundial, y principalmente en los países desarrollados. Gracias a los avances en los tratamientos médicos y en las herramientas de cribado diagnóstico, se ha conseguido disminuir la tasa de mortalidad y mejorar la esperanza de vida de los pacientes afectados por esta enfermedad. No obstante, la incidencia sigue aumentando y los tratamientos no se muestran completamente efectivos, estando acompañados generalmente de un elevado número de efectos secundarios que afectan a la calidad de vida del paciente de forma significativa. Todo esto indica que aún queda mucho por mejorar en el tratamiento y prevención de esta enfermedad, así como en el conocimiento científico que se tiene sobre los mecanismos moleculares implicados en su desarrollo.

La nanomedicina se ha perfilado como una de las alternativas más esperanzadoras para conseguir mayores logros en la lucha contra el cáncer, proporcionando una serie de sistemas que actúan a diferentes niveles, ya sea en el ámbito farmacológico o diagnóstico. Fundamentalmente se buscan sistemas capaces de transportar el principio activo antineoplásico a su tejido u órgano diana, de forma que sea liberado mayoritariamente allí y su liberación se produzca en un periodo de tiempo adecuado, aumentando la eficacia terapéutica y disminuyendo la posibilidad de aparición de efectos secundarios indeseables.

Entre las posibles herramientas desarrolladas por la nanotecnología para cumplir este objetivo de mejora de eficacia terapéutica en el cáncer, las nanopartículas han recibido una gran atención. Los sistemas nanoparticulados permiten la vehiculización de fármacos antineoplásicos hacia el tumor sólido, ya sea aprovechando las características fisiológicas del propio tumor o mediante su vectorización hacia ese tejido diana. Si, además, la composición de estos sistemas está basada en polímeros biocompatibles y biodegradables, como es el caso de los polímeros naturales, los productos derivados del metabolismo de estos sistemas nanoparticulados no producirán ningún efecto nocivo en el organismo.

De acuerdo con las consideraciones expuestas, el **objetivo principal** de este trabajo ha sido la *preparación, caracterización y evaluación biológica de sistemas nanoparticulados basados en polímeros naturales para la liberación controlada de tamoxifeno*. El tamoxifeno es un fármaco muy empleado en el tratamiento del cáncer de mama dependiente de estrógenos, cuya administración sistémica implica la aparición de efectos adversos indeseados. Su vehiculización a través de este tipo de dispositivos basados en polímeros naturales, concretamente albúmina sérica bovina y alginato, persigue una nueva aproximación terapéutica en este tipo de cáncer, ya que estos sistemas permitirían, bien a través de mecanismos de vehiculización pasiva o activa, mejorar la eficacia farmacológica del mismo.

Para la consecución de este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Síntesis de nanopartículas basadas en albúmina y alginato, previamente modificados mediante un proceso de tiolación, y la posterior estabilización de las partículas mediante enlaces disulfuro. Caracterización de los sistemas nanoparticulados mediante la determinación de su composición, tamaño, morfología y estabilidad térmica.
2. Inclusión del fármaco en estos sistemas. Cuantificación del fármaco incluido y determinación de su cinética de liberación in vitro en fluidos biológicos simulados.
3. Vectorización con ácido fólico de los sistemas obtenidos mediante la unión de folato a la proteína. Caracterización de los sistemas nanoparticulados, inclusión del fármaco y valoración de la cinética de liberación.
4. Determinación de la efectividad de los nanosistemas sintetizados en cultivos celulares utilizando las líneas celulares MCF7 y T47D de cáncer de mama humano, y Hela de cáncer de ovario humano. Se llevarán a cabo estudios de viabilidad celular y de la captación de los sistemas por las células.

5. Evaluación de la efectividad *in vivo* de los sistemas obtenidos en un modelo de cáncer de mama xenográfico en ratones atómicos. Análisis de la evolución del volumen del tumor, biodistribución del fármaco en tejidos e histología del tumor.

Los resultados de estos estudios proporcionarán una información fundamental sobre la utilidad final de estos sistemas, lo cual sentará las bases para el posible desarrollo posterior del producto.

Cancer has become one of the most common causes of death worldwide, especially in developed countries. Recent medical advances achieved in therapeutic and diagnostic areas have allowed the increase patient life expectancy to be improved. However, cancer incidence rate is still rising and current therapy is not completely effective, since important and undesirable side effects appear along or after anticancer treatments. Thus, there are several issues to improve regarding treatment, prevention and also the scientific knowledge about all the mechanisms involved in cancer development.

Nanomedicine is outlined as a very promising tool to obtain better achievements in fight against cancer, supplying new systems that can act at either pharmacological or diagnostic levels. Basically, there are looking for systems that could transport drugs to targeted tissues or organs, where drug would be selectively released along the adequate period of time. Consequently, undesirable side effects would be reduced and therapeutic efficacy would be improved.

Nanoparticles are emerging as one of the most important tools developed by nanotechnology, and they have recently focused scientist attention in order to achieve better anticancer goals. Nanoparticulated systems allow drug vehiculisation to solid tumours to be achieved, either by passive or active mechanisms. Additionally, if their composition is based on biocompatible and

biodegradable polymers, such as natural polymers, their metabolic and degradation products will not induce any toxicity reaction in the organism.

Taking everything into account, the **main goal** of this work has been the *preparation, characterization and bio-evaluation of nanoparticulated systems based on natural polymers to be used as controlled release devices of tamoxifen*. Tamoxifen vehiculation through these kinds of systems based on natural polymers, in particular bovine serum albumin and alginate, pursues a new and improved therapeutic approach in breast cancer. This strategy is based on the rational and specific delivery of this drug in targeted tissues, either using passive or active mechanisms, and takes advantage of the good biocompatibility and biodegradability properties that those polymers offer.

In order to achieve this general aim of the study, some specific objectives were set out:

1. Synthesis of nanoparticles based on albumin and alginate, previously modified by a thiolation process. Stabilization of nanoparticles through disulfide bond formation. Characterization of nanoparticulated systems by composition, size, morphology and thermal stability studies.
2. Tamoxifen loading into those obtained systems. Quantification of drug load values and study of *in vitro* drug release kinetics.
3. Folic acid attachment to these obtained systems in order to prepare targeted nanoparticles. Characterization of folate-targeted nanoparticles, drug loading process and evaluation of *in vitro* drug release kinetics.
4. *In vitro* anticancer efficacy evaluation of nanoparticles against MCF-7 and T47D cells, human breast cancer cell lines, and HeLa cells, human ovarian cell line. Cell viability and uptake studies will be performed in order to evaluate the efficacy of the systems.

5. *In vivo* anticancer efficacy evaluation of nanoparticles in a breast tumour xenograft model developed in athymic mice. Tumour volume evaluation, tamoxifen biodistribution and histological studies will be performed.

Results obtained from all the studies will give important information about the final utility of these systems, which could establish the conditions for their future and possible development as new breast cancer treatment tools.

METODOLOGÍA Y RESULTADOS

La metodología llevada a cabo en este trabajo para la consecución de los objetivos previamente descritos, así como los resultados obtenidos de los estudios realizados, queda descrita y detallada a lo largo de las publicaciones realizadas en diferentes revistas científicas, las cuales se adjuntan a continuación, con los siguientes títulos:

1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de alginato tiolado y albúmina estabilizadas por puentes disulfuro. Evaluación como sistemas de liberación controlada.
 - Synthesis and characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. Evaluation as drug delivery systems. A. Martínez, I. Iglesias, R. Lozano, J.M. Teijón y M.D. Blanco. *Carbohydrate Polymers*, 83: 1311-1321 (2011). JCR (2012): 3,479. Posición: Primer cuartil, Q1. Categoría: Chemistry Applied (7/71); Chemistry Organic (12/55); Polymer Science (13/83).
2. Nanopartículas de alginato y albúmina tiolados cargadas con tamoxifeno como sistemas de liberación controlada de antineoplásicos.
 - Tamoxifen-loaded thiolated alginate-albumin nanoparticles as antitumoral drug delivery systems. A. Martínez, M. Benito-Miguel, I. Iglesias, J.M. Teijón y M.D. Blanco. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 100A: 1467-1476 (2012). JCR (2012): 2,834. Posición: Primer cuartil, Q1. Categoría: Engineering Biomedical (14/79)
3. Eficacia preclínica mejorada del tamoxifeno formulado en nanopartículas de alginato-cisteína/albúmina reducida.
 - Enhanced preclinical efficacy of tamoxifen developed as alginate-cysteine/disulfide bond reduced albumin nanoparticles. A. Martínez, E. Muñiz, I. Iglesias, J.M. Teijón y M.D. Blanco. *International Journal of Pharmaceutics*, 436: 574-581 (2012). JCR

(2012): 3,458. Posición: Primer cuartil, Q1. Categoría: Pharmacology & Pharmacy (61/260).

4. Nanopartículas basadas en albúmina y mezclas albúmina/alginato funcionalizadas con ácido fólico como sistemas de liberación controlada de tamoxifeno. Síntesis y caracterización *in vitro*.

- Folate-targeted nanoparticles based on albumin and albumin/alginate mixtures as controlled release systems of tamoxifen. Synthesis and *in vitro* characterization. A. Martínez, R. Olmo, I. Iglesias, J.M. Teijón and M.D. Blanco. *Pharmaceutical Research* DOI 10.1007/s11095-013-1151-z (2013). JCR (2012): 4,742 Posición: Primer cuartil, Q1. Categoría: Chemistry, multidisciplinary (25/152); Pharmacology and Pharmacy (26/260).

5. Vectorizando el tamoxifeno a tumores de mama xenograft: eficacia preclínica de nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico basadas en una combinación de alginato-cisteína/albúmina con puentes disulfuro reducidos.

- Targeting tamoxifen to breast cancer xenograft tumours: preclinical efficacy of folate-attached nanoparticles based on alginate-cysteine / disulphide-bond-reduced albumin. A. Martínez, E. Muñiz, C. Teijón, I. Iglesias, J.M. Teijón y M.D. Blanco. *Pharmaceutical Research* DOI 10.1007/s11095-013-1247-5 (2013). JCR (2012): 4,742 Posición: Primer cuartil, Q1. Categoría: Chemistry, multidisciplinary (25/152); Pharmacology and Pharmacy (26/260).

Antes de la presentación de las publicaciones, se ha procedido a resumir brevemente el objetivo, la metodología y los resultados de cada uno de los artículos publicados, con el objetivo facilitar el seguimiento del trabajo.

1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de alginato tiolado y albúmina estabilizadas por puentes disulfuro. Evaluación como sistemas de liberación controlada.

[Synthesis and characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. Evaluation as drug delivery systems. A. Martínez, I. Iglesias, R. Lozano, J.M. Teijón y M.D. Blanco. *Carbohydrate Polymers*, 83: 1311-1321 (2011)].

Objetivo:

El objetivo de este trabajo fue la síntesis y la caracterización *in vitro* de nanopartículas compuestas por albúmina con puentes disulfuro reducidos (BSA-SH) y alginato tiolado (ALG-CYS), empleando una técnica de coacervación, y su estabilización mediante enlaces disulfuro entre ambos polímeros. Posteriormente, las nanopartículas fueron cargadas con tamoxifeno para evaluarlas como posibles sistemas de liberación controlada de este fármaco.

Metodología:

En primer lugar se sintetizaron los materiales tiolados necesarios para la síntesis de nanopartículas. Para obtener BSA-SH, se siguió un proceso de reducción de los enlaces disulfuro presentes en la estructura original de la proteína con 2- mercaptoetanol. En el caso del ALG-CYS, se llevó a cabo un proceso de tiolación mediante la unión de L-cisteína a los grupos ácidos del alginato a través de una reacción mediada por una carbodiimida. Una vez se obtuvieron los materiales, se determinó el contenido de grupos tiol libres obtenidos en cada uno de los compuestos por un método espectrofotométrico mediante una reacción colorimétrica específica de los grupos tiol.

Una vez evaluado el grado de tiolación de los materiales, se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas a través de un método de coacervación mediante el cual se conseguía la formación de puentes disulfuro entre ambos polímeros por un cambio de pH en el medio de reacción, promoviendo la formación y la

estabilización de las partículas. Inicialmente, se intentó la formación de las partículas a partir de una mezcla de cantidades iguales de ambos polímeros, así como de los polímeros solos por separado. Además, se consideraron dos formas de optimización de la síntesis para evitar la agregación de las nanopartículas: por un lado, el bloqueo con L-cisteína de los grupos tiol libres remanentes tras la formación de las partículas; por otro lado, una estabilización con temperatura y desolvatación con etanol. La proporción de los reactivos así como la masa de los mismos en la síntesis fueron factores adicionalmente estudiados. Todas las variables realizadas en la síntesis de las partículas quedan recogidas en la Tabla 1.

Tras la síntesis de las partículas, se procedió a su caracterización *in vitro*. En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de tamaño y morfología de las partículas. El tamaño y la apariencia de las partículas se estudiaron a través del análisis de las muestras mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). La distribución de tamaños se estudió a través del análisis de las muestras por estudio de la difusión de la luz cuasielástica.

Tras la caracterización del tamaño de las partículas, se procedió al estudio de su composición. Para ello, se analizó la cantidad de proteína y polisacárido remanente en el sobrenadante tras la síntesis, considerando que la diferencia respecto a la concentración inicial de ambos polímeros debía encontrarse formando parte de las partículas. Para cuantificar la albúmina, se llevó a cabo la reacción de Bradford tras el aislamiento de la proteína mediante precipitación en el sobrenadante. Para la cuantificación del alginato, se llevó a cabo una hidrólisis ácida con calor que producía un producto coloreado cuantificable mediante espectrofotometría.

Posteriormente se llevó a cabo un estudio de espectroscopía infrarroja tanto de los materiales originales, como de los materiales modificados y las nanopartículas, con el objetivo de demostrar las modificaciones químicas inducidas en los polímeros y las interacciones entre ambos tras la formación de los sistemas.

Se realizó también un estudio de hinchamiento de las nanopartículas en tampón fosfato con 0,5% de dodecil sulfato sódico (PBS con SDS a pH = 7,4) y en etanol para calcular el índice de hinchamiento de las partículas en medios de diferente naturaleza.

Una vez se realizó la caracterización de las nanopartículas obtenidas, se incluyó el fármaco en ellas mediante incubación de 12 h del pellet húmedo de nanopartículas obtenido en el proceso de síntesis en una disolución etanólica de tamoxifeno (TMX) con una concentración 150 µg/ml. Tras la incubación, se procedió a la ultracentrifugación de las nanopartículas y a su liofilización. El sobrenadante con el fármaco remanente se conservó para estudios posteriores.

Los estudios de caracterización de las nanopartículas cargadas con TMX incluyeron el estudio de la carga de fármaco de las nanopartículas, estabilidad térmica de las nanopartículas, estudio de liberación del tamoxifeno y adaptación de la cinética de liberación a modelos matemáticos.

Para el estudio de la carga de fármaco se llevaron a cabo dos determinaciones: por un lado, se estudió la concentración de fármaco remanente en el sobrenadante tras realizar la carga de las nanopartículas; por otro lado, se llevó a cabo una extracción directa del fármaco de las nanopartículas con metanol, disolvente en el que el fármaco es soluble. Las muestras procedentes de estos estudios fueron procesadas mediante HPLC.

El estudio de la estabilidad térmica se realizó mediante termogravimetría, analizando los perfiles de degradación térmica de los materiales originales y de los materiales modificados, y de las nanopartículas sin fármaco y con fármaco. Se analizaron la temperatura de degradación máxima así como el porcentaje de pérdida de masa en el paso de descomposición térmica.

Los estudios de liberación del fármaco se llevaron a cabo en PBS con 0,5% SDS a 37°C y agitación orbital. Aunque el SDS del medio de liberación no se encuentra presente en condiciones fisiológicas, su uso es necesario para poder

facilitar la salida del fármaco de los sistemas, ya que de lo contrario no sería posible cuantificarlo debido a su elevada hidrofobicidad. Las muestras recogidas a diferentes tiempos se procesaron mediante HPLC. Con los datos procedentes de este ensayo se llevó a cabo la adaptación de la cinética de liberación a diferentes modelos matemáticos, empleando las ecuaciones correspondientes para cada uno de ellos.

Resultados:

La modificación de los materiales originales se llevó a cabo mediante la reducción de puentes disulfuro existentes en el caso de la albúmina, o por tiolación en el caso del alginato. Se obtuvo una albúmina modificada con una concentración de $3,1 \times 10^{-4} \pm 0,4 \times 10^{-4}$ mM de grupos tiol por mg de proteína, mientras que la albúmina original presentó una concentración de $2,0 \times 10^{-5} \pm 0,6 \times 10^{-5}$ mM de grupos tiol por mg de proteína. En el caso del caso del alginato, se cuantificó una concentración de $1,2 \times 10^{-3} \pm 0,2 \times 10^{-3}$ mM de grupos tiol por mg de polisacárido.

En cuanto a la síntesis de nanopartículas, todas las combinaciones de la Tabla 1 condujeron a la obtención de nanopartículas salvo la formada exclusivamente por alginato-cisteína (Experimento 3). Las imágenes correspondientes al análisis del resto de muestras mediante SEM se recogen en la Figura 1. En todas ellas se observó la aparición de nanopartículas individualizadas con cierta tendencia esférica, aunque la mayor presencia de alginato en las nanopartículas provocaba una pérdida en esta tendencia apareciendo partículas más poliédricas. En cuanto a la optimización de la síntesis, se apreció la obtención de mejores resultados a través del bloqueo con L-cisteína tras la formación de las nanopartículas.

La medida manual del tamaño de las nanopartículas obtenidas en los experimentos 6, 7 y 8 (Tabla 1) empleando las imágenes obtenidas por microscopía condujo a la obtención de tamaños nanométricos: 96 ± 52 nm, 186 ± 73 nm y 306 ± 74 nm en el caso de las nanopartículas BSA-SH NP (100% BSA-SH), B-50-50 NP (50% ALG-CYS y 50% BSA-SH) y C-70-30 NP (70% ALG-

CYS y 30% BSA-SH), respectivamente. Estos diámetros medios nanométricos se confirmaron posteriormente mediante la medida de tamaño a través del estudio de la difusión de la luz cuasielástica (42, 189 y 388, respectivamente, Figura 2).

Tras la caracterización del tamaño y morfología de las partículas, se procedió al estudio de su composición. Los porcentajes de polímero incorporados a cada una de las formulaciones se recogieron en la Tabla 2. Como se puede observar, en aquellas composiciones que partían de un 50% de cada uno de los polímeros existe una relación BSA-SH/ALG-CYS aproximadamente de 1/1, mientras que en la que partía con un 70% de ALG-CYS y un 30% de BSA-SH obtuvo una relación de 0,5/1, aproximadamente.

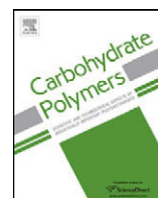
El estudio de espectroscopia infrarroja permitió confirmar la modificación química del alginato mediante la identificación de diferentes bandas en sus espectros (Figura 3). En el caso de la albúmina se obtuvieron espectros muy similares. En cuanto a la comparación del espectro de las nanopartículas respecto a los obtenidos para cada material modificado por separado, se observó que el espectro de las nanopartículas era muy similar al espectro de la BSA-SH pero con la incorporación de dos bandas características del ALG-CYS (Figura 3).

Todas las composiciones obtuvieron índices de hinchamiento elevados en ambos medios, siendo las nanopartículas BSA-SH NP las que se hinchaban ligeramente mejor en PBS + 0,5% SDS (95% frente a 93%), mientras que las nanopartículas B-50-50-NP y C-70-30 NP parecían ser las que mejor se hinchaban en etanol (88% frente a 80%).

Los resultados del estudio de la carga de fármaco obtenida por ambos métodos se recogen en la Tabla 4. Las composiciones B-50-50 NP y C-70-30 NP fueron las que mayor cantidad de fármaco incluyeron. La extracción directa con metanol no permitió la extracción completa del fármaco de los sistemas, especialmente en las nanopartículas BSA-SH NP.

El estudio termogravimétrico permitió confirmar las modificaciones químicas realizadas en los materiales de partida, obteniendo perfiles de degradación diferentes (Figura 4). Lo mismo ocurría al comparar los perfiles de los materiales modificados por separado con el perfil obtenido para cada una de las composiciones de las nanopartículas (Figura 4). La presencia del fármaco en las nanopartículas no pareció modificar su perfil térmico. En cualquier caso, las temperaturas de degradación alcanzadas (Tabla 3) fueron muy superiores a las empleadas en los protocolos de trabajo e incluso superior a la temperatura fisiológica, con lo que se obtuvieron materiales estables.

Los perfiles de liberación del fármaco quedan recogidos en la Figura 5. Se registraron los máximos de liberación para los sistemas TMX-B-50-50 NP, TMX-C-70-30 NP y TMX-BSA-SH NP con valor de $1,3 \pm 0,1$ μg TMX/mg NP a las 7 h, $2,64 \pm 0,06$ μg TMX/mg NP a las 26,5 h, y $0,50 \pm 0,01$ μg TMX/mg NP a las 75 h, respectivamente. En todas ellas se observa una primera fase de liberación rápida, seguida por una segunda fase de liberación más lenta. Las velocidades de liberación del fármaco en estas etapas, así como su duración, aparecen recogidas en la Tabla 5. Tras el ajuste de los modelos matemáticos a éstas cinéticas de liberación (Tabla 6), se concluyó que todas se ajustaban a un mecanismo de liberación Fickiana, así como también se determinó un comportamiento de tipo hidrogel en el caso de las nanopartículas TMX-B-50-50 NP y TMX-BSA-SH NP al ajustarse bien el modelo de partición (Tabla 6).



Synthesis and characterization of thiolated alginate–albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. Evaluation as drug delivery systems

A. Martínez^a, I. Iglesias^a, R. Lozano^b, J.M. Teijón^c, M.D. Blanco^{c,*}, Group of Polymeric Materials for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicina

^a Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Spain

^b Departamento de Química inorgánica y Bioinorgánica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Spain

^c Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 March 2010
Received in revised form
21 September 2010
Accepted 22 September 2010
Available online 29 September 2010

Keywords:

Nanoparticles
Alginate
Albumin
Tamoxifen
Drug delivery systems

ABSTRACT

Nanoparticles based on thiolated alginate (ALG–CYS) and disulfide bond reduced albumin (BSA–SH) have been synthesized by coacervation method and stabilized by disulfide bond formation. In order to optimize the synthesis, the influence of amount and proportion of reactants on nanoparticle characteristics has been studied. Results showed cubic shaped nanoparticles but with a certain spherical tendency. The size range was 42–388 nm; as the percentage of ALG–CYS increased in the particle, their morphology is less spherical and the size is larger. The presence of both reactants in the nanoparticles was determined by FT-IR and confirmed by TGA. The ratio BSA–SH/ALG–CYS (0.49/1–1.23/1) in the particles was quantified by colorimetric methods. Nanoparticles were assayed as drug delivery systems by loading them with tamoxifen (TMX) (2–4 μg TMX/mg NP). Maximum TMX release (23–61% of loaded TMX) took place between 7 and 75 h, and the amount of released TMX can be modulated with the percentage of ALG–CYS in the particle.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Research into the rational delivery of anticancer drugs is at the forefront of projects in nanomedicine. One of the major problems facing cancer chemotherapy is the achievement of the required concentration of the drug at the tumour site for a desired period of time (Chawla & Amiji, 2002). The vascularization of solid tumours is heterogeneous, showing poorly perfused regions as well as dense vascularized regions where a rapid growth occurs. Tumours usually present resistances to treatment due to both cellular and non-cellular mechanisms (Brigger, Dubernet, & Couvreur, 2002).

However, the leaky defective blood vessels of tumour tissue make its vasculature permeable to macromolecules in the size range from 100 to 1200 nm in diameter (Kratz, 2008). Thus, nanocarriers can be administered close to the tumour cells to achieve a localised action. Furthermore, nanoparticles protect the drug from degradation following administration, and drug solubility issues can be overcome, a particular advantage because large proportions of new drug candidates are water insoluble (Moghimi, Hunter, & Murray, 2005).

Various macromolecular substances, such as synthetic and natural polymers, can be used for nanoparticle preparation. Among natural polymers, serum albumin and sodium alginate are emerging as versatile carriers for drug targeting. The properties of these natural polymers, such as their ready availability, versatility and biodegradability, make them ideal candidates for their use in drug delivery systems. Thus, they have been used in a multitude of studies of nanoparticle preparation, some of them including anticancer drugs such as methotrexate (Kratz, 2008) or paclitaxel (Karmali et al., 2009; Yoshioka et al., 2007).

In the case of oestrogen-dependent breast cancer, a large number of molecules classified as “selective oestrogen receptor modulators” (SERMs) have been widely used. Tamoxifen is the most important member of this family of SERMs, and it has been successfully used since 1970s in treatment of hormone dependent breast cancer (Ameller, Legrand, Marsaud, & Renoir, 2004). However, tamoxifen shows a low water solubility, which limits the administration of this drug only to the oral route. Furthermore, following a long-term therapy, tamoxifen has some side effects, such as endometrial cancer and development of drug resistance. To overcome the undesirable side effects of tamoxifen, and to increase the concentration at the tumour site, tamoxifen could be entrapped in polymeric nanoparticles, which may provide a better means of delivery in terms of enhanced uptake by the tumour and increased local concentration of the drug at the receptor site (Chawla & Amiji, 2002).

* Corresponding author. Tel.: +34 913941447; fax: +34 913941691.
E-mail address: mdblanco@med.ucm.es (M.D. Blanco).

In the present study, nanoparticles based on disulfide bond reduced albumin (BSA-SH) and thiolated alginate (ALG-CYS) were prepared and stabilized by disulfide bonds formation, in order to characterize and to evaluate them as possible delivery systems of tamoxifen.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Alginic acid sodium salt, Coomassie Blue G-250, L-cysteine (non animal source), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbo-diimide hydrochloride (EDAC), potassium bromide (KBr, FT-IR grade), 2-mercaptoethanol (2-ME) and tamoxifen were purchased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). Sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl, 35%), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), ethanol absolute, trichloroacetic acid, urea, phosphoric acid (88%), triethylamine and methanol (HPLC gradient grade) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Sodium chloride (NaCl), bovine serum albumin (BSA, Fraction V), and sodium dodecyl sulfate were purchased from Merck (Barcelona, Spain).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of disulfide bond reduced bovine serum albumin (BSA-SH)

An aqueous solution of BSA 5% (w/v) was prepared. The pH-value was adjusted to 8 with 1 M NaOH (pH-meter METROHM 654). 70 μl of 2-mercaptoethanol (2-ME) was added and the resulting solution was incubated for 5 h under continuous stirring (100 rpm) at 37 °C. Thereafter, the pH-value was adjusted to 2.5 with 1 M HCl and the acidic solution was transferred to a dialysis bag (Visking® dialysis tubing 20/32 diameter: 16 mm, SERVA). The solution was exhaustively dialyzed against HCl solution (pH 3.5). The obtained solution was freeze dried for 24 h at -110°C (Heto PowerDry LL1500 Freeze Dryer, Thermo Electro Corporation). The lyophilized product was conserved at 4 °C until further use.

2.2.2. Preparation of alginate-cysteine conjugate (ALG-CYS)

Alginate-cysteine conjugate was synthesized according to the methodology developed by Bernkop-Schnürch, Kast, and Richter (2001). The obtained alginate-cysteine conjugate was conserved at 4 °C until further use.

2.2.3. Determination of the thiol group content

The thiol concentration on the modified products was determined by a colorimetric reaction using Ellman's reagent [DTNB] (Ellman, 1959; Marschütz & Bernkop-Schnürch, 2002). In this reaction, the free thiol groups of the polymers react with DTNB forming a coloured conjugate whose absorbance can be measured at 412 nm (UNICAM 8700 series UV/vis spectrometer). In brief, 0.5 mg of each conjugate was hydrated in 500 μl of 0.5 M phosphate buffer pH 8.0. After incubation for 2 h at room temperature with 500 μl of Ellman's reagent [0.03% (w/v) DTNB in 0.5 M phosphate buffer pH 8.0], absorbance of the samples was measured at 412 nm. The amount of thiol groups of BSA-SH was calculated using a standard curve obtained from the sulfhydryl group determination of solutions containing increasing amounts of cysteine (0.003–0.05 mg/ml). The amount of thiol groups of ALG-CYS was calculated using a standard curve obtained from the sulfhydryl group determination of increasing amounts of cysteine solutions (0.003–0.05 mg/ml) containing a constant concentration of unmodified alginate (0.5 mg/ml).

2.2.4. Preparation of nanoparticles

Nanoparticles of BSA-SH and BSA-SH/ALG-CYS mixtures were prepared. Stabilization of nanoparticles was obtained by forming disulfide bonds. An initial protocol for synthesis was designed (Table 1; Experiment 1): 10 mg of BSA-SH and 10 mg of ALG-CYS were dissolved in 2 ml 1 mM HCl under intense stirring conditions. The obtained suspension was sonified (Branson sonifier 450) and the pH of the suspension was adjusted to 6.5–6.8 with 1 M NaOH. The formation of disulfide bonds was allowed to proceed for 12 h under intense stirring conditions. After this time, the resulting suspension was centrifuged (41,000 rpm, 15 min, Beckman Coulter Optima L-100 XP Ultracentrifuge), and the pellet was freeze dried for 24 h at -110°C . Nanoparticles based only on BSA-SH and based only on ALG-CYS were prepared as described above (Table 1; Experiments 2 and 3).

Two different methods were proposed for the optimization of the process to avoid the aggregation tendency of the particles. The first alternative consisted of blocking the remaining free sulfhydryl groups of the nanoparticles with L-cysteine. 5 ml of a solution of L-cysteine (0.06 mM) was added and the reaction was allowed to proceed for 5 h under stirring conditions. After this time, the protocol was continued as above described (Table 1; Experiment 4). The second alternative consisted of stabilizing the particles with temperature, following previous desolvation with ethanol (Weber, Coester, Kreuter, & Langer, 2000). 0.5 ml of the suspension of particles was centrifuged (41,000 rpm, 15 min) and the pellet was suspended in an ethanol/water solution (1.2/0.3 ml/ml). This suspension was incubated at 70 °C for 2 h under stirring conditions. After this time, the suspension was centrifuged (41,000 rpm, 15 min) and the pellet was freeze dried (Table 1; Experiment 5).

Proportion and amount of initial reactants were studied as variables in the process of synthesis. Two more syntheses were prepared varying only the amount of initial reactants (Table 1, Experiments 6 and 8), and another one varying the proportion and the weight of reactants (Table 1; Experiment 7). According to the obtained results, in these three last experiments blocking of free sulfhydryl groups with L-cysteine was carried out.

2.2.5. Size and morphology of nanoparticles

The size and appearance of microspheres were studied by scanning electron microscopy (FE-SEM) (Jeol JSM-6400 Electron Microscope, resolution 36 mm from Centro de Microscopía y Citometría, UCM). From FE-SEM micrographs, more than 500 particles were measured using micrographs enlargements. The number-average diameter (D_n), the weight-average diameter (D_w) and the polydispersity index (U) were calculated (Guerrero et al., 2008). The particle distribution is considered to be monodisperse when U is between 1.0 and 1.1.

The size distribution analysis was performed on a back-scattered quasi-elastic light scattering device (Zetatracc NPA-152, Microtrac). Data were processed with Microtrac Flex software. According to the obtained results, average diameter and size distribution were only studied in particles of B-50-50, C-70-30 and BSA-SH synthesis (Table 1; Experiments 6, 7 and 8, respectively).

2.2.6. Composition of nanoparticles

The composition of BSA-SH/ALG-CYS particles was studied measuring the concentration of BSA-SH and ALG-CYS in the supernatant obtained after centrifugation of the samples in the synthesis process. The difference between the initial concentration of each polymer and their concentration in the supernatant was determined, and these amounts were considered to participate in nanoparticle formation.

Concentration of ALG-CYS in the supernatant was determined by measuring the absorbance of the coloured products obtained after a hydrolysis reaction of alginate. The hydrolysis of alginate

Table 1
Variables considered in the synthesis of nanoparticles.

Experiment number	Formulation	Total weight of initial reactants (mg)	Volume of dissolution (ml)	% (w/w) ALG-CYS	Blocking with L-cys	Temperature and desolvation with ethanol
1	A-50-50	20	2	50	–	–
2	BSA-SH	20	2	–	–	–
3	ALG-CYS	20	2	100	–	–
4	A-50-50	20	2	50	Yes	–
5	A-50-50	20	2	50	–	Yes
6	B-50-50	200	20	50	Yes	–
7	C-70-30	200	20	70	Yes	–
8	BSA-SH	200	20	–	Yes	–

was carried out in extreme conditions (10 N HCl, 5 h, 100 °C) and, after this reaction, samples were neutralised with 10 N NaOH and cooled. Absorbance of the samples was measured at 277.6 nm. A standard curve of ALG-CYS and another one of commercial alginate (0.5–4 mg/ml) were prepared to study possible differences between both materials in the hydrolysis reaction.

Concentration of BSA-SH in the supernatant was determined using Bradford's method (Bradford, 1976). The absorbance of blue-coloured products of this reaction can be measured at 595 nm. To avoid interactions between alginate and Bradford reagent, BSA-SH in the supernatant was precipitated with 2 M trichloroacetic acid (TCA). After the precipitation process, samples were centrifuged and the supernatant was removed. The pellet was suspended in 1 ml 6 M urea (urea solution in 2 N HCl). A standard curve of BSA-SH and another one of commercial BSA (0.125–0.5 mg/ml) were prepared to study possible differences between both materials.

2.2.7. FT-IR spectroscopy

Modified materials and BSA-SH/ALG-CYS nanoparticles were analyzed by FT-IR spectroscopy and the resulting spectra were compared with the FT-IR spectra of the unmodified materials. For this study, a Nicolet Magna IR 750 Series II equipment with a DTGS-KBr detector was used. The measurement was realized preparing tablets with 300 mg of KBr and 2 mg of sample. Spectra were obtained at 4 cm⁻¹ of resolution.

2.2.8. Preparation of tamoxifen-loaded nanoparticles

After centrifugation in the synthesis process, the obtained pellet was suspended in 2 ml of a 150 µg/ml TMX solution (in ethanol) and it was incubated for 12 h at room temperature. Then, the suspension was centrifuged (41,000 rpm, 15 min) and the pellet was freeze-dried. The supernatant was conserved for later characterization studies. All of the experiments with TMX were performed under subdued light as the drug is highly photosensitive. According to the obtained results, particles of B-50-50 (Table 1; Experiment 6), C-70-30 (Table 1; Experiment 7) and BSA-SH synthesis (Table 1; Experiment 8) were selected for loading the drug.

2.2.9. Swelling behaviour of nanoparticles

The swelling behaviour of nanoparticles in an alcoholic medium (ethanol) and in PBS (pH 7.4) with 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) was studied. 20 mg of each type of nanoparticles was placed in 2 ml of ethanol and in 2 ml of PBS with 0.5% SDS for 24 h at a constant temperature (37 °C). The equilibrium swelling degree (W_{∞}) was obtained by weighing the swollen product after filtering the nanoparticles through a polyamide filter (0.2 µm, Sartorius, Goettingen, Germany) (Bernardo, Blanco, Olmo, & Teijón, 2002).

2.2.10. Estimation of drug content

In order to determine the loaded TMX in nanoparticles, two different methods were carried out. In the first one, the amount of TMX loaded into the nanoparticles was determined by calculating the difference between the initial concentration of TMX solution and

the final concentration after the loading process. This amount was considered to be loaded in the nanoparticles. The second method consisted in a direct extraction of drug from TMX-loaded nanoparticles using methanol: 3 mg of TMX-loaded nanoparticles were suspended in 1 ml of methanol under stirring conditions during 5 h. After this time, the suspension was centrifuged (13,000 rpm, 5 min) and the supernatant was collected for the measurement. The samples obtained in both processes were analyzed by HPLC.

High performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector technique was required to determine the drug content (MacCallum, Cummings, Dixon, & Miller, 1996). The chromatographic separation was performed on a 25 cm × 4.6 mm RP-Spherisorb ODS2 C₁₈ column (5 µm particle size, Waters). The mobile phase consisted of 1% aqueous dissolution of triethylamine and methanol 11/89 (v/v). A flow rate of 1 ml/min was established. The fluorescence detector was set at an excitation wavelength of 250 nm and an emission wavelength of 370 nm. A photochemical reactor unit with a wavelength of 254 nm was placed between the detector and the column. Chromquest 4.2 software (Thermo) was used to process the obtained data. Standard solutions (10–2000 ng/ml) of TMX in methanol were used to obtain the calibration curve.

2.2.11. Thermogravimetric analysis (TGA)

TGA curves of drug-loaded and unloaded nanoparticles, as well as modified and unmodified materials, were obtained using a Mettler Toledo thermal analyzer (TGA-SDTA 851). The mass of the samples was 1.5 mg. The sample pan was placed onto the balance and the temperature was increased from 25 to 600 °C at a heating rate of 10 °C min⁻¹ under nitrogen atmosphere (nitrogen flow rate of 60 cm³ min⁻¹). The mass of the sample pan was continuously recorded as a function of temperature.

2.2.12. Drug release studies

For drug release studies from TMX-loaded nanoparticles, 5 mg of drug-loaded nanoparticles was added to 5 ml PBS with 0.5% SDS contained in a flask vial at a constant temperature (37 °C) and orbital shaking (100 rpm, Ecotron INFORS HT). TMX is relatively insoluble in the aqueous medium and SDS is an anionic surfactant used to make the release of the drug easier in phosphate buffer (Hu, Neoh, & Kang, 2006). At intervals, 50 µl samples were withdrawn from the solution in order to follow the change in drug concentration using HPLC. The removed volume from the vial was replaced with PBS with 0.5% SDS. Sink conditions were maintained during drug release experiments (Chawla & Amiji, 2002).

2.2.13. Mathematical modelling of release kinetics

In order to study the mechanism of drug release, the *in vitro* drug release data were fitted to various kinetic models: Higuchi, Korsmeyer–Peppas and partition phenomenon models were selected for the study (Blanco et al., 2008).

2.2.14. Statistical analysis

Statistical comparisons were performed with unpaired Student's *t*-test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Quantification of the thiol groups in the modified materials

The degree of modification was determined by measuring the amount of thiol groups of BSA and alginate using Ellman's reagent. The results showed an increase of sulfhydryl group content in both materials regarding unmodified materials. BSA has 17 intrachain disulfide bonds and 1 free sulfhydryl group. Hence, when the disulfide bonds are broken by a reduction process, modified BSA with more free sulfhydryl groups is supposed to be obtained (Kang, Kim, Shin, Woo, & Moon, 2003). BSA-SH displayed $3.1 \times 10^{-4} \pm 0.4 \times 10^{-4}$ mM of thiol groups per mg protein whereas unmodified BSA displayed $2.0 \times 10^{-5} \pm 0.6 \times 10^{-5}$ mM of thiol groups per mg protein (mean \pm S.D.; $n = 7$). Thus, a BSA-SH with a concentration of thiol groups almost 15 times higher than the concentration of thiol groups of unmodified BSA was obtained.

Alginate exhibits a backbone of (1 \rightarrow 4) linked β -D-mannuronic acid and α -L-guluronic acid residues of widely varying composition and sequence (Coviello, Matricardi, Marianecchi, & Alhaique, 2007). Since the polymer displays carboxylic acid groups, the sulfhydryl compound L-cysteine can be easily covalently attached by the formation of amide bonds between the primary amino group of the amino acid and a carboxylic acid group of the polymer (Bernkop-Schnürch et al., 2001). ALG-CYS displayed $1.2 \times 10^{-3} \pm 0.2 \times 10^{-3}$ mM of thiol groups per mg polymer ($n = 7$). As unmodified alginate does not have sulfhydryl groups in its original structure, covalent attachment of L-cysteine was considered to have been a successful way to introducing thiol groups into the structure of alginic acid.

These thiolated polymers, or so-called thiomers, are polymers capable of forming disulfide bonds, the covalent bridging interaction most commonly encountered in biological systems, with different biological structures such as glycoproteins (Gum et al., 1992). Some studies showed these thiomers as a promising useful way for the noninvasive application of peptide drugs (Marschütz, Caliceti, & Bernkop-Schnürch, 2000).

3.2. Size and morphology of nanoparticles

Nanoparticles were obtained from BSA-SH and BSA-SH/ALG-CYS mixtures, but it was not possible to obtain them from ALG-CYS. FE-SEM micrographs of nanoparticles (Fig. 1) showed individual particles of very small size, most of them being nanometric. They showed cubic shape with certain spherical tendency, and their surface was smooth and without pores. Unlike polymeric nanoparticles such as poly- ϵ -caprolactone or poly(lactic-co-glycolic acid), polysaccharide-based nanoparticles are known to shrink and lose shape under electron bombardment during SEM analysis (Bilensoy et al., 2009). Thus, a less spherical shape in case of C-70-30 nanoparticles, whose composition included more proportion of ALG-CYS, could be attributed, at least in part, to this phenomenon (Fig. 1F).

Micrographs corresponding to optimization methods (Fig. 1C and D) showed individual particles with the same described features in both cases. Optimization of nanoparticle preparation process by desolvation has been used successfully in some studies (Langer et al., 2003; Weber et al., 2000). However, in this case results were considered more satisfactory by blocking with L-cysteine because more individual particles were found.

According to the obtained results, nanoparticles of Experiments 6, 7 and 8 (B-50-50, C-70-30 and BSA-SH, respectively;

Table 1) were selected for the study of their average diameter and size distribution. All the obtained particles showed nanometric size. According to FE-SEM data, BSA-SH nanoparticles showed the smallest size (number-average diameter, $D_n = 96 \pm 52$ nm; polydispersity index, $U = 1.83$), followed by B-50-50 nanoparticles ($D_n = 186 \pm 73$ nm; $U = 1.53$). Finally, C-70-30 nanoparticles showed the largest size ($D_n = 306 \pm 74$ nm; $U = 1.19$). All the nanoparticle formulations were considered polydisperse, with a polydispersity index over 1.1 (Guerrero et al., 2008). Average diameters obtained with light-scattering (LS) technique confirmed this size characterization. BSA-SH, B-50-50 and C-70-30 nanoparticles showed an average diameter of 42, 189 and 388 nm, respectively. There were significant differences ($p < 0.05$) in the average diameter between all the nanoparticle formulations. Plots of size distributions, which were elaborated by measuring particles using micrograph enlargements and with LS technique, are represented in Fig. 2. Nanoparticles based on polysaccharides such as chitosan, and albumin nanoparticles, in a size range 150–300 nm, have shown good results as drug delivery systems in anticancer therapy (Bilensoy et al., 2009; Langer et al., 2003). Considering that the pore size of tumour microvessels varies from 100 to 1200 nm (Hobbs et al., 1998), the obtained size range of the nanoparticle formulations would allow the extravasation into tumour tissue.

3.3. Composition studies

The particle composition was studied evaluating the concentration of BSA-SH and ALG-CYS in the supernatant obtained after centrifugation in the synthesis process. Concentration of ALG-CYS in the supernatant was determined by a hydrolysis reaction of alginate and by measuring the absorbance of the obtained coloured products of this reaction at 277.6 nm. Hydrolysis conditions were extreme due to the high resistance of alginic acid to hydrolysis (Chandía, Matsuhira, & Vásquez, 2001). Differences between standard curves of commercial alginate and ALG-CYS were not observed.

Concentration of BSA-SH in the supernatant was determined by a colorimetric reaction using Bradford's method. Differences between standard curves of commercial BSA and BSA-SH were not observed.

The absorbance of each sample was interpolated on the corresponding calibration curve, and the concentration of each polymer in the supernatant was obtained (Table 2). The percentage of each polymer incorporated into nanoparticles was calculated by the difference between the initial concentration in the synthesis process and the final concentration in the supernatant (Table 3). The BSA-SH/ALG-CYS ratio was calculated considering the concentration of each polymer incorporated into nanoparticles (Table 3).

A-50-50 and B-50-50 nanoparticles, which were only different in the weight of initial materials in the synthesis process, showed a similar value of BSA-SH/ALG-CYS ratio. It was concluded that modifications in amount of reactants in synthesis did not have influence on nanoparticle composition. Nanoparticles of C-70-30 synthesis, which were different in proportion of reactants in the synthesis process, showed a different value of BSA-SH/ALG-CYS ratio. It was concluded that modifications in proportion of reactants in synthesis were a determinant in nanoparticle composition.

3.4. FT-IR spectroscopy

Modified and unmodified materials, as well as BSA-SH/ALG-CYS nanoparticles, were analyzed by FT-IR spectroscopy, and their spectra were compared to observe possible differences due to chemical transformation (Fig. 3). Because signal from sulfhydryl groups and disulfide bonds is very weak (Socrates, 2004), and also due to the complex structure of the analyzed molecules, it was not possi-

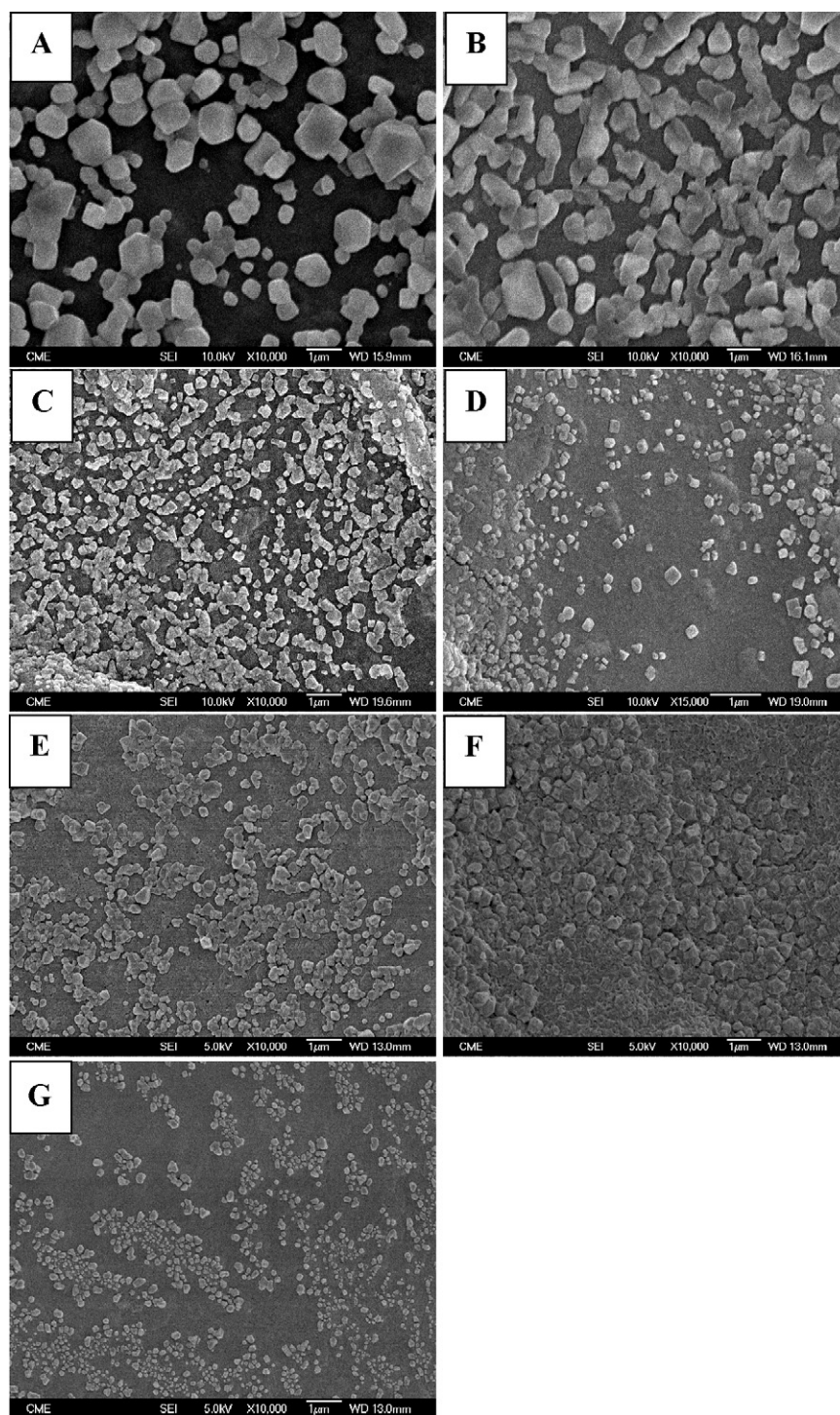


Fig. 1. FE-SEM micrographs of nanoparticles. Experiment 1; A-50-50 particles (A), Experiment 2; BSA-SH particles (B), Experiment 4; A-50-50 particles (C), Experiment 5; A-50-50 particles (D), Experiment 6; B-50-50 particles (E), Experiment 7; C-70-30 particles (F), Experiment 8; BSA-SH (G).

Table 2

Nanoparticle composition. Concentration and percentage of ALG-CYS and BSA-SH determined in the supernatant after the synthesis process. Percentage of each polymer incorporated into nanoparticles. BSA-SH/ALG-CYS ratio in nanoparticles.

Sample	ALG-CYS concentration in supernatant (mg/ml, %)	BSA-SH concentration in supernatant (mg/ml, %)	ALG-CYS incorporated into nanoparticles (%)	BSA-SH incorporated into nanoparticles (%)	BSA-SH/ALG-CYS ratio in nanoparticles
A 50-50; Experiment 1	2.891 ± 0.008 ^a (57.8)	2.4 ± 0.4 ^a (48.0)	42.2	52.0	1.23/1
B 50-50; Experiment 6	1.8 ± 0.3 ^a (36.4)	1.3 ± 0.2 ^a (26.8)	63.6	73.2	1.16/1
C 70-30; Experiment 7	3.38 ± 0.08 ^a (48.3)	1.2 ± 0.2 ^a (40.3)	51.7	59.7	0.49/1
BSA-SH; Experiment 8	–	0.68 ± 0.05 ^a (6.8)	–	93.2	–

^a Mean ± S.D. (*n* = 3).

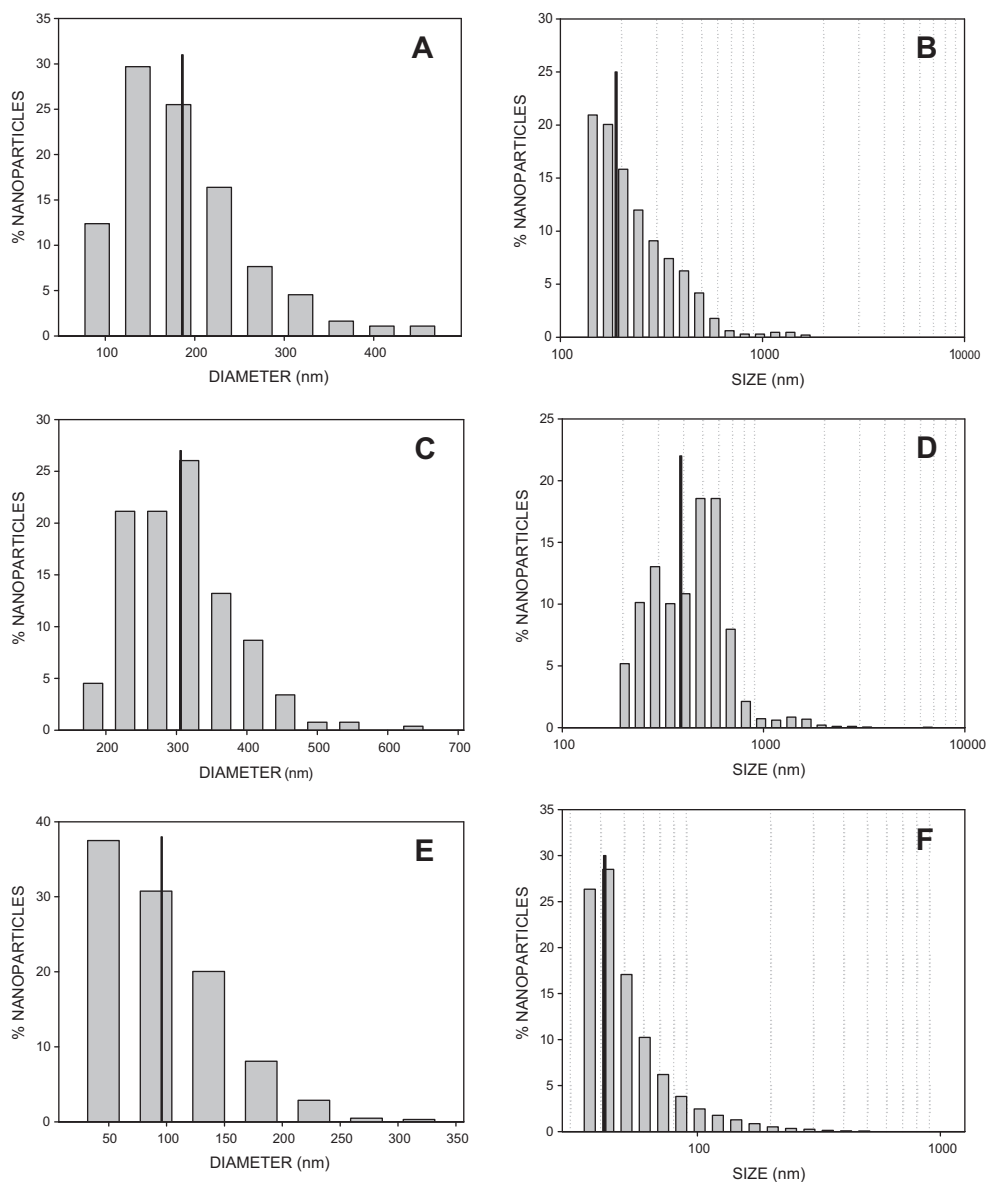


Fig. 2. Size distribution of nanoparticles of Experiment 6 (A and B), Experiment 7 (C and D) and Experiment 8 (E and F) by measuring particles using FE-SEM micrograph enlargements (A, C and E), and LS technique (B, D and E). Average diameter: solid line.

ble to identify the band of free sulfhydryl groups corresponding to chemical modifications in the materials. Instead of using this band, different bands were analyzed. Differences between spectra of both BSA were not observed because the only difference between them was the presence of more free sulfhydryl groups in BSA-SH (Fig. 3A). Amide I band ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) and amide II band ($1550\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$), which are characteristic of peptide bonds (Maruyama et al., 2001), were identified in both spectra.

In the case of unmodified alginate and ALG-CYS, some differences between their spectra were found (Fig. 3B). The bands at 1617 and 1418 cm^{-1} in the IR spectrum of sodium alginate (unmodified alginate) were assigned to asymmetric and symmetric stretching peaks of carboxylate salt groups (Huang, Pal, & Moon, 1999). In the spectrum of ALG-CYS, bands at 1739 , 1605 , 1412 and 1248 cm^{-1} were observed due to the presence of -COOH groups, which are characteristic of alginic acid. Furthermore, two bands at 1687 and 1477 cm^{-1} , which were assigned to amide I band and amide III bands respectively, due to the presence of amide bonds formed with the introduction of molecules of L-cysteine in the original structure, were observed. The presence of different bands in the

spectra of alginates allowed to confirm the chemical transformation of alginate.

Comparing BSA-SH/ALG-CYS nanoparticle spectrum with modified material spectra, it was observed that spectrum of nanoparticles was more similar to the BSA-SH spectrum, but with the presence of two bands at 1095 and 1032 cm^{-1} ; these bands were assigned to the presence of ALG-CYS in the nanoparticle composition. Furthermore, the characteristic band of alginic acid at 1739 nm , which was present in ALG-CYS, disappears in the case of nanoparticle spectrum because the -COOH groups are in the salt form, and not in the acidic form as a consequence of the change of the pH in the synthesis process of nanoparticles. With this data, the presence of both modified materials in the structure of nanoparticles was confirmed.

3.5. Swelling behaviour of nanoparticles

The swelling behaviour of nanoparticles in an alcoholic medium (ethanol), and in PBS with SDS was studied. All the nanoparticle formulations showed a good swelling behaviour in both media. In

Table 3

Phenomenological data for the thermal decomposition of unmodified and modified materials (BSA, sodium alginate, BSA-SH and ALG-CYS), unloaded nanoparticles (A-50-50, B-50-50, C-70-30 and BSA-SH) and TMX-loaded nanoparticles (TMX B-50-50, TMX C-70-30 and TMX BSA-SH).

Sample	Mass loss (%) up to 600 °C	Peak temperature in DTG (°C)	Mass loss (%) in the step of thermal decomposition
BSA	83.5	306	40.3
BSA-SH	81.9	329	50.2
Sodium alginate	65.4	244	40.2
ALG-CYS	89.1	217	39.9
B-50-50 NP (Exp. 6)	100	235	30.8
		302	59.4
C-70-30 NP (Exp.7)	100	223.3	22.4
		301	50.3
BSA-SH NP (Exp.8)	100	302	47.5
TMX B-50-50 NP	100	240.8	21.5
		306	55
TMX C-70-30 NP	100	240.8	30.3
		304	55.8
TMX BSA-SH NP	86.5	314	47.3
TMX	100	258	68.9

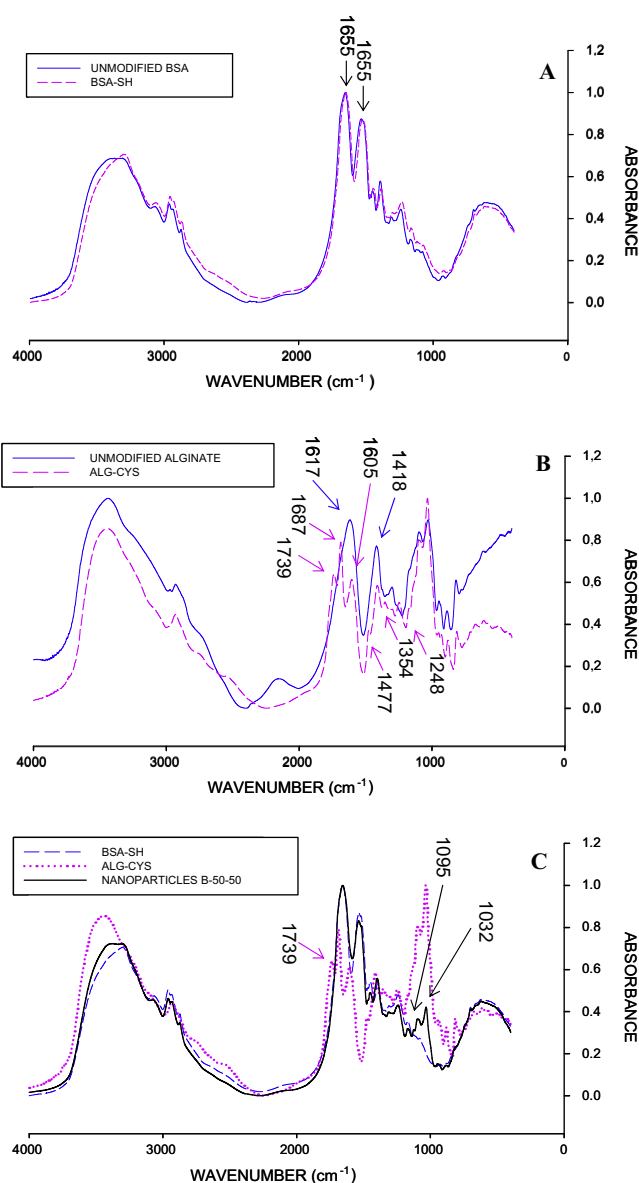


Fig. 3. FT-IR spectra of: BSA-SH and unmodified BSA (A), ALG-CYS and unmodified alginate (B), BSA-SH, ALG-CYS and B-50-50 nanoparticles (C).

PBS, W_{∞} values of 93.8%, 93% and 95% were obtained for B-50-50, C-70-30 and BSA-SH nanoparticles, respectively. In ethanol, W_{∞} values of 88.2%, 88.7% and 80.4% were obtained for B-50-50, C-70-30 and BSA-SH systems, respectively. Hence, BSA-SH nanoparticles were more swollen in PBS than in ethanol, in contrast with B-50-50 and C-70-30 nanoparticles which were more swollen in ethanol than in PBS. These results suggest that the presence of ALG-CYS in the nanoparticle composition makes nanoparticle swelling in an alcoholic medium easier than in PBS.

3.6. Estimation of drug content

Two different methods were carried out to determine the drug content. One of them considered the difference between the initial concentration of TMX solution and the final concentration after the loading process of the drug. The other one consisted in the quantification of a direct extraction of TMX from drug-loaded nanoparticles with methanol. The obtained drug content detected with each method is shown in Table 4. According to the data obtained with both methods, TMX B-50-50 and TMX C-70-30 nanoparticles included more drug than TMX BSA-SH nanoparticles. Thus, the difference in the composition of nanoparticles was an important factor in the drug-loading process. As described previously, swelling behaviour of nanoparticle formulations was related to the nanoparticle composition. Nanoparticles with ALG-CYS in their composition could include more drug than BSA-SH nanoparticles because of their higher swelling in an alcoholic medium. The amount of loaded TMX seems to be different depending on the method (Table 4). Considering the results, direct extraction of drug from nanoparticles with methanol allowed only part of the TMX to be included in the particles. TMX is a very hydrophobic drug and it has strong interactions with the hydrophobic regions of the albumin and other plasma proteins (>95%) (Morello, Wurz, & DeGregorio, 2003). As a consequence of these interactions, methanol could only extract the superficial tamoxifen of nanoparticles whose interactions with albumin were weaker. Furthermore, as a consequence of the swelling degree and composition of each nanoparticle formulation, the amount of tamoxifen extracted with methanol in case of TMX C-70-30 and TMX B-50-50 nanoparticles was similar and higher than that in the case of TMX BSA-SH nanoparticles.

3.7. Thermogravimetric study

The thermal stability of modified materials, drug-loaded and unloaded nanoparticles was studied. The TGA first derivative of the materials is plotted in Fig. 4, and the parameters derived from them are collected in Table 3. Differences between the thermal behaviour of modified and unmodified materials were observed. Modified albumin and alginate-cysteine degraded in a one-step process at a maximum temperature of 329 and 217 °C, respectively, which are different from the degradation temperatures of unmodified materials (Fig. 4A, B and Table 3). There were differences in the percentage of total mass loss between modified and unmodified polymers (Table 3). These differences in thermal behaviour of modified and unmodified materials again confirmed the chemical modification. BSA-SH (Experiment 8) nanoparticles degraded in a one-step process at a maximum temperature of 302 °C (Fig. 4C and Table 3) in contrast with B-50-50 and C-70-30, which degraded in two different steps (Fig. 4C and Table 3). The first degradation step of B-50-50 and C-70-30 nanoparticles occurred at 235 and 223.3 °C, respectively, being these temperatures very similar to the degradation temperature of ALG-CYS (Table 3). The second degradation step occurred at 302 and 301 °C, respectively, being these temperatures close to the degradation temperature of BSA-SH. The two-step degradation process of the nanoparti-

Table 4
Estimation of tamoxifen content in nanoparticles.

Sample	Drug content in nanoparticles		
	By difference of concentration in drug-solution after loading process (μg TMX/mg NP)	By TMX extraction with methanol (μg TMX/mg NP)	Percentage of TMX extracted with methanol (%)
TMX B-50-50	$3.9 \pm 0.5^{\text{a,b,*}}$	$2.1 \pm 0.5^{\text{a,c,*}}$	53.8
TMX C-70-30	$4.3 \pm 0.2^{\text{d,e,*}}$	$1.9 \pm 0.3^{\text{d,f,*}}$	44.2
TMX BSA-SH	$2.1 \pm 0.5^{\text{b,e,g,*}}$	$0.7 \pm 0.08^{\text{c,f,g,*}}$	33.3

Data marked with the same letter showed significant differences between them.

* Mean \pm S.D. ($n=3$).

cles composed by ALG-CYS and BSA-SH confirmed the presence of both materials in these nanoparticles, in contrast with BSA-SH nanoparticles which showed a similar behaviour to BSA-SH. The thermal behaviour of TMX-loaded nanoparticles was very similar to the unloaded nanoparticles (Fig. 4D and Table 5), allowing it to conclude that the presence of TMX in the drug-loaded nanoparticles did not cause significant modifications in the stability of particles.

3.8. Drug release studies

The release of TMX from drug-loaded nanoparticles is shown in Fig. 5. The maximum drug release from TMX-B-50-50 was $1.3 \pm 0.1 \mu\text{g}$ TMX per mg nanoparticle at 7 h (Fig. 5A); from TMX C-70-30 it was $2.64 \pm 0.06 \mu\text{g}$ TMX per mg nanoparticle at 26.5 h (Fig. 5B); and from TMX BSA-SH, $0.50 \pm 0.01 \mu\text{g}$ TMX per mg nanoparticle at 75 h (Fig. 5C).

Three stages in drug release were established and the release rate in each stage was determined (Table 5). The drug release occurred in a short first stage which was the fastest one, followed by a second stage which was slower and longer than the first one. From this, a very slow release rate was observed in all cases. Comparing the release rate in the first stage of each nanoparticle formulation, TMX release was faster from TMX C-70-30 and TMX B-50-50, and slower from TMX BSA-SH (Table 5). The release rate in the second stage became much slower in all cases. Different studies in which TMX was incorporated into nanoparticles based on synthetic polymers, such as poly(ϵ -caprolactone) or poly(ethylene-glycol)-modified cyanoacrylate, showed a fast release of the drug in the first hours, and the total release of the drug within a 24-h time interval. The burst release of hydrophobic drugs, like TMX, was attributed to the predominant surface presence of the drug in the nanoparticle formulation (Chawla & Amiji, 2002). In BSA-SH/ALG-CYS and BSA-SH nanoparticles, this fast release of TMX could be

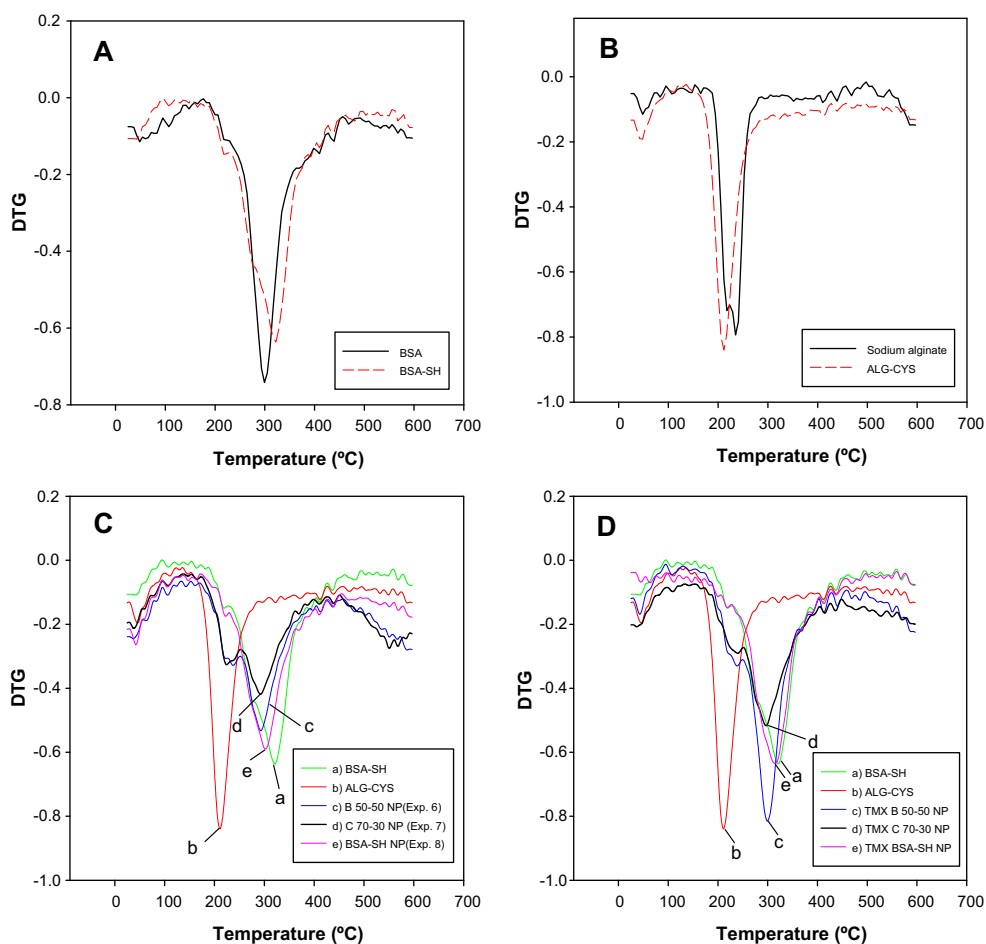


Fig. 4. TGA first derivative curves of modified and unmodified BSA (A), modified and unmodified alginate (B), unloaded nanoparticles and modified materials (C) and tamoxifen-loaded nanoparticles and modified materials (D).

Table 5
Release rates of tamoxifen from nanoparticle formulations.

Sample	First stage		Second stage	
	K ($\mu\text{g TMX}/\text{mg NP}/\text{h}$)	Time (min)	K ($\mu\text{g TMX}/\text{mg NP}/\text{h}$) ^a	Time (h)
TMX B-50-50	2.90 (0.890)	0–10	0.31 (0.948)	0.5–2
TMX C-70-30	2.72 (0.983)	0–30	0.22 (0.916)	1–4
TMX BSA-SH	0.15 (0.999)	0–30	0.027 (0.972)	1–8

^a Value in parenthesis is r^2 .

observed in the first stage. Hence, it was concluded that superficial TMX, whose interactions with the nanoparticles were weaker, was released in the first stage. Thus, nanoparticles with ALG-CYS in their composition showed a faster first stage than BSA-SH nanoparticles. In the second stage, TMX strongly retained by the nanoparticles was released. Thus, the release rate became much slower in second stage. From this, the release rate in all the cases became much slower. In contrast with the mentioned studies, in any case the total release of the loaded drug was achieved. It was concluded that interactions between TMX and albumin were the main regulator factor in the release of the drug and, because these interactions were very strong, total release of the drug was not achieved. This partial release of TMX could be an advantage if these drug-loaded nanoparticles were intravenously administered, since they could be uptake by cells with a significant amount of antitumoural drug.

3.9. Mathematical modelling of release kinetics

The mechanism of drug release through the mathematical modelling of dissolution data for the drug delivery systems was

evaluated. The regression parameters (release kinetic constants and regression coefficients) obtained after fitting the kinetic models to the *in vitro* drug release data are given in Table 6. Modelling analysis was carried out by fitting the data until the time when a minimum 73%, 81% and 97% of drug was released from TMX BSA-SH, TMX C-70-70 and TMX B-50-50 nanoparticles, respectively. According to the obtained results, formulations were observed to yield statistically valid correlations with various models (Table 6).

The drug release studies of the three nanoparticle formulation were in accordance with the square root of time, since all formulations showed good correlation with the Higuchi model.

According to the Korsmeyer–Peppas model, in cases of pure Fickian release the exponent n has the limiting values of 0.5, 0.45 and 0.43 for release from slabs, cylinders and spheres, respectively. For drug release from spherical polymer particles of a wide size distribution, the value of the exponent n for Fickian diffusion depends on the width of the distribution (Ritger & Peppas, 1987), and n values lower than 0.43 can be obtained. The obtained values of the diffusional exponent n for TMX B-50-50 and TMX BSA-SH nanoparticles were lower than 0.43, probably because of the wide size

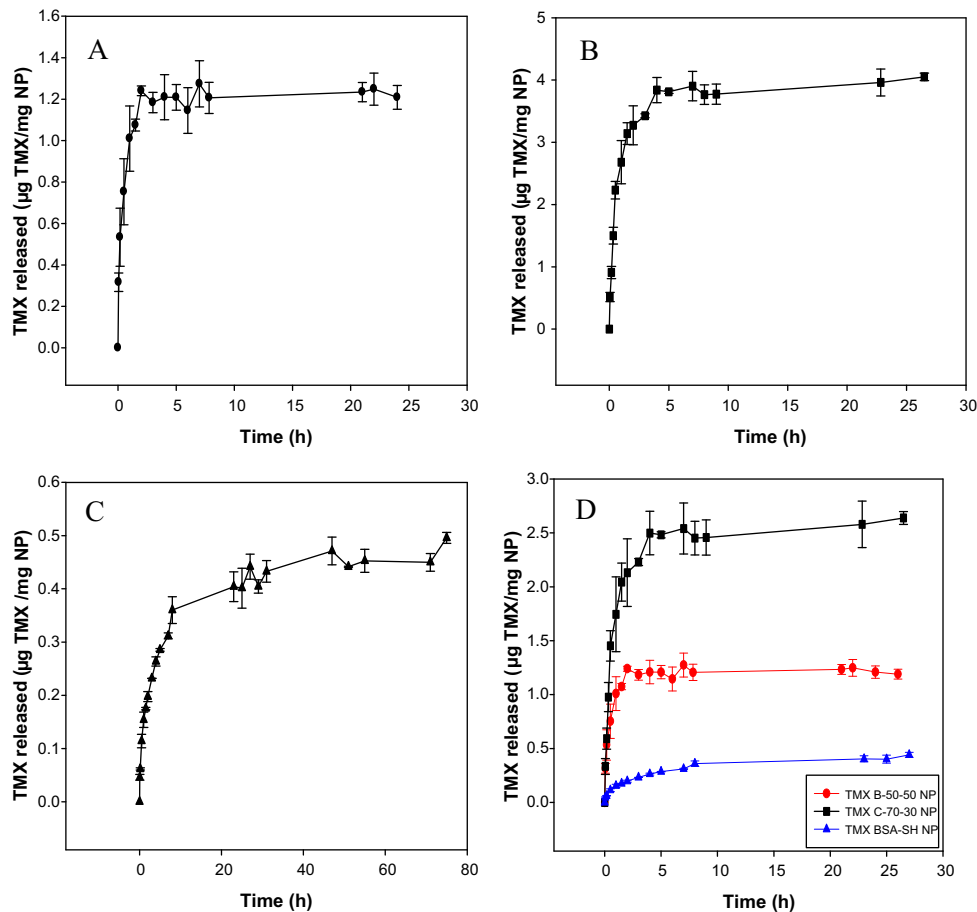


Fig. 5. Cumulative amount of TMX released from drug-loaded TMX B-50-50 (A), TMX C-70-30 (B) and TMX BSA-SH (C) nanoparticles. Comparison of the three release curves during the first 24 h (D).

Table 6
Statistical parameters of various formulations obtained after fitting the drug release data to the release kinetic models. Model fitting was reattempted until a minimum of 73%, 81% and 97% of drug release from TMX BSA-SH, TMX C-70-70 and TMX B-50-50 nanoparticles, respectively.

Formulation	Higuchi K ($\text{h}^{-1/2}$) ^a	Korsmeyer–Peppas n^a	Partition phenomenon (first order) k_R (h^{-1}) ^a	Partition phenomenon (second order) k_R (h^{-1}) ^a	M_t/M_∞ versus t^n ; $n=0.5$ K ($\text{h}^{-1/2}$) ^a
TMX B-50-50	0.834 (0.973)	0.36 (0.995)	0.506 (0.938)	2.674 (0.938)	0.654 (0.973)
TMX C-70-30	1.613 (0.970)	0.53 (0.972)	3.154 (0.898)	3.15 (0.898)	0.485 (0.932)
TMX BSA-SH	0.119 (0.989)	0.412 (0.993)	0.035 (0.982)	0.128 (0.990)	0.241 (0.989)

^a Value in parenthesis is r^2 .

distribution. In case of TMX C-70-30, the obtained value of n is closer to 0.5 than 0.43. This could be explained because C-70-30 nanoparticle shape was less spherical and had more slab form (see Fig. 1F).

As all the formulations showed good correlation for the Higuchi and Korsmeyer–Peppas models, an approximation of this last model was made in order to confirm the Fickian diffusion component in the release of the drug (Chung, Lin, Liu, Tyan, & Yang, 2009). Korsmeyer–Peppas model was applied considering in all cases the presence of Fickian diffusion (M_t/M_∞ versus t^n ; $n=0.5$). The results are shown in Table 6, showing in all cases good correlation for the approximation. According to the results of the application of Higuchi, Korsmeyer–Peppas model and the approximation to a Fickian release of Korsmeyer–Peppas model, it was declared a Fickian release behaviour for all the formulations.

In accordance with the mathematical model proposed by Reis, Guilherme, Rubira, and Muniz (2007), the loading of solutes onto and their release from hydrogel-based devices can be better understood when they are treated as a partition phenomenon. Two possibilities were considered: one is that solute release follows reversible first-order kinetics, and the second option is that solute release follows reversible second-order kinetics (Blanco et al., 2008). According to the high swelling degree of all the formulations in PBS with 0.5% SDS, this model was applied in order to confirm a hydrogel behaviour of nanoparticles. After fitting this mathematical model, it was concluded the presence of a partition phenomenon in TMX BSA-SH and TMX B-50-50, where the albumin had a higher presence in composition of nanoparticles and whose swelling degrees in PBS with 0.5% SDS were higher.

4. Conclusion

Disulfide bond reduced albumin BSA and ALG-CYS were successfully obtained. Nanoparticles based on BSA-SH and BSA-SH/ALG-CYS mixtures have been prepared and characterized. Individual particles with certain spherical tendency and small size (<300 nm) were obtained in all cases. Modifications in proportion of reactants in the synthesis process were determinant in nanoparticle composition. FT-IR and TGA studies confirmed the composition and stability of nanoparticles, as well as the chemical modification and stability of modified materials. The presence of ALG-CYS in the nanoparticle composition conditioned the swelling behaviour of nanoparticles. TMX was successfully incorporated into nanoparticles, and nanoparticle composition conditioned the drug content in nanoparticles (2–4 $\mu\text{g}/\text{mg}$), as well as the amount and the rate of drug released. Interactions between the drug and nanoparticle structure conditioned the release of TMX. Total release of the drug was not achieved in any case; only the 23–61% of the drug was released. After fitting several mathematical models, a Fickian release behaviour for all the formulations was declared. According to the obtained results, these nanoparticle formulations are potential candidates as drug delivery systems for antitumour drug administration.

Acknowledgements

The financial support of the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (PS09/01513), of the Fundación Mutua Madrileña and the FPI grant from UCM to A. Martínez are gratefully acknowledged.

References

- Ameller, T., Legrand, P., Marsaud, V., & Renoir, J. M. (2004). Drug delivery systems for oestrogenic hormones and antagonists: The need for selective targeting in estradiol-dependent cancers. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 92(1–2), 1–18.
- Bernardo, M. V., Blanco, M. D., Olmo, R., & Tejió, J. M. (2002). Delivery of bupivacaine included in poly(acrylamide-co-monomethyl itaconate) hydrogels as a function of the pH swelling medium. *Journal of Applied Polymer Science*, 86, 327–334.
- Bernkop-Schnürch, A., Kast, C. E., & Richter, M. F. (2001). Improvement in the mucoadhesive properties of alginate by the covalent attachment of cysteine. *Journal of Controlled Release*, 71(3), 277–285.
- Bilensoy, E., Sarisozen, C., Esendagli, G., Dogan, A. L., Aktas, Y., Sen, M., et al. (2009). Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors. *International Journal of Pharmaceutics*, 371(1–2), 170–176.
- Blanco, M. D., Guerrero, S., Tejió, C., Olmo, R., Pastrana, L., Katime, I., et al. (2008). Preparation and characterization of nanoparticulate poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogel for the controlled release of anti-tumour drugs. *Polymer International*, 57, 1215–1225 (Erratum: *Polymer International*, 2009, 58, 116).
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(5), 631–651.
- Chandía, N. P., Matsuhira, B., & Vásquez, A. E. (2001). Alginate acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 46, 81–87.
- Chawla, J. S., & Amiji, M. M. (2002). Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *International Journal of Pharmaceutics*, 249(1–2), 127–138.
- Chung, T. W., Lin, S. Y., Liu, D. Z., Tyan, Y. C., & Yang, J. S. (2009). Sustained release of 5-FU from Poloxamer gels interpenetrated by crosslinking chitosan network. *International Journal of Pharmaceutics*, 382(1–2), 39–44.
- Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., & Alhaique, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release*, 119(1), 5–24.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70–77.
- Guerrero, S., Muñoz, E., Tejió, C., Olmo, R., Tejió, J. M., & Blanco, M. D. (2008). Ketotifen-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers: characterization and in vivo evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 3153–3169.
- Gum, J. R., Jr., Hicks, J. W., Toribara, N. W., Rothe, E. M., Lagace, R. E., & Kim, Y. S. (1992). The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21375–21383.
- Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P., et al. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4607–4612.
- Hu, F. X., Neoh, K. G., & Kang, E. T. (2006). Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles. *Biomaterials*, 27(33), 5725–5733.
- Huang, R. Y. M., Pal, R., & Moon, G. Y. (1999). Characteristics of sodium alginate membranes for the pervaporation dehydration of ethanol-water and isopropanol-water mixtures. *Journal of Membranes Science*, 160, 101–113.
- Kang, Y. N., Kim, H., Shin, W. S., Woo, G., & Moon, T. W. (2003). Effect of disulfide bond reduction on bovine serum albumin-stabilized emulsion gel formed by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 68(7), 2215–2220.
- Karmali, P. P., Kotamraju, V. R., Kastantin, M., Black, M., Missirlis, D., Tirrell, M., et al. (2009). Targeting of albumin-embedded paclitaxel nanoparticles to tumors. *Nanomedicine*, 5(1), 73–82.

- Kratz, F. (2008). Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 132(3), 171–183.
- Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., von Briesen, H., & Schubert, D. (2003). Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 257(1–2), 169–180.
- MacCallum, J., Cummings, J., Dixon, J. M., & Miller, W. R. (1996). Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of tamoxifen and its major metabolites in plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Application*, 678(2), 317–323.
- Marschütz, M. K., & Bernkop-Schnürch, A. (2002). Thiolated polymers: self-crosslinking properties of thiolated 450 kDa poly(acrylic acid) and their influence on mucoadhesion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(4), 387–394.
- Marschütz, M. K., Caliceti, P., & Bernkop-Schnürch, A. (2000). Design and in vivo evaluation of an oral delivery system for insulin. *Pharmaceutical Research*, 17(12), 1468–1474.
- Maruyama, T., Katoh, S., Nakajima, M., Nabetani, H., Abbott, T. P., Shono, A., et al. (2001). FTIR analysis of BSA fouled on ultrafiltration and microfiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 192, 201–207.
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Murray, J. C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB Journal*, 19(3), 311–330.
- Morello, K. C., Wurz, G. T., & DeGregorio, M. W. (2003). Pharmacokinetics of selective estrogen receptor modulators. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(4), 361–372.
- Reis, A. V., Guilherme, M. R., Rubira, A. F., & Muniz, E. C. (2007). Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks. *Journal of Colloid and Interface Science*, 310(1), 128–135.
- Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release. I: Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, 5, 23–36.
- Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts* (3rd ed.). John Wiley & Sons Ltd., p. 16.
- Weber, C., Coester, C., Kreuter, J., & Langer, K. (2000). Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 194(1), 91–102.
- Yoshioka, T., Ikoma, T., Monkawa, A., Yunoki, S., Abe, T., Sakane, M., et al. (2007). Preparation of hydroxyapatite-alginate gels as a carrier for controlled release of paclitaxel. *Key Engineering Materials*, 330–332, 1053–1056.

2. Nanopartículas de alginato y albúmina tioladas cargadas con tamoxifeno como sistemas de liberación controlada de antineoplásicos.

[Tamoxifen-loaded thiolated alginate-albumin nanoparticles as antitumoral drug delivery systems. A. Martínez, M. Benito-Miguel, I. Iglesias, J.M. Teijón y M.D. Blanco. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 100A: 1467-1476 (2012)].

Objetivo:

El objetivo de este trabajo fue la optimización del proceso de carga de tamoxifeno en las nanopartículas basadas en BSA-SH y mezclas BSA-SH/ALG-CYS sintetizadas mediante coacervación previamente caracterizadas, para intentar obtener una mayor cantidad de fármaco internalizado. Además, se llevó a cabo la evaluación de la efectividad de estas nanopartículas como sistemas de liberación controlada de tamoxifeno ensayándolas en cultivos celulares de líneas tumorales de cáncer de mama humano, MCF-7, y de cáncer de ovario humano, HeLa. Para ello, se realizaron estudios de viabilidad celular, cuantificación de la internalización de las nanopartículas en las células y estudio del efecto del fármaco sobre el ciclo celular.

Metodología:

En primer lugar se llevó a cabo la síntesis por coacervación de las nanopartículas compuestas por BSA-SH (BSA-SH NP) así como por mezclas 50/50 (p/p) y 70/30 (p/p) de ALG-CYS/BSA-SH (B-50-50 NP y C-70-30 NP) siguiendo la metodología descrita en el trabajo anterior. Sin embargo, se modificó el procedimiento de inclusión de tamoxifeno para la obtención de las nanopartículas cargadas con el fármaco. Esta vez se decidió partir de las nanopartículas ya secas y liofilizadas, e hincharlas en la solución etanólica con una concentración más alta de fármaco (500 $\mu\text{g/ml}$) que la usada en el trabajo anterior (150 $\mu\text{g/ml}$), donde además se partió del pellet húmedo de las nanopartículas. Tras la incubación de las nanopartículas en esta solución durante 12 h, se procedió a la ultracentrifugación de las nanopartículas y a su liofilización. El sobrenadante con el fármaco remanente se conservó para estudios posteriores.

Tras la síntesis de las partículas, se realizó su caracterización *in vitro*. En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de tamaño medio y potencial zeta de las partículas a través de la difusión de la luz cuasielástica. Se caracterizaron tanto las partículas sin fármaco como las cargadas con tamoxifeno.

Para la determinación de la cantidad de fármaco incorporada a los sistemas se llevaron a cabo tres estudios diferentes. Por un lado, se analizó la concentración de fármaco remanente en el sobrenadante tras realizar la carga de las nanopartículas (método indirecto); por otro lado, se llevó a cabo una extracción directa del fármaco con metanol; finalmente, también se llevó a cabo la degradación enzimática de las nanopartículas mediante tripsinización seguida de la posterior extracción del fármaco mediante disolventes orgánicos. Todas las muestras procedentes de estos estudios fueron procesadas mediante HPLC.

Los estudios de liberación del fármaco se llevaron a cabo en PBS con 0,5% SDS a 37°C y agitación orbital. Las muestras recogidas a diferentes tiempos se procesaron mediante HPLC.

Para los ensayos en cultivos celulares se seleccionaron dos líneas celulares diferentes: células MCF-7, de cáncer de mama humano y positivas en la expresión de receptores de estrógenos; y células HeLa, de cáncer de ovario humano y negativas en la expresión de receptores de estrógenos. Con ambas líneas se llevaron a cabo los ensayos de viabilidad celular, cuantificación de la internalización de las nanopartículas y estudio del efecto del fármaco sobre el ciclo celular.

El ensayo de viabilidad celular se realizó tanto con las nanopartículas sin fármaco, para el estudio de la citocompatibilidad de los sistemas, como con los sistemas cargados con tamoxifeno, para la evaluación de la actividad citotóxica de los mismos. Se seleccionaron dos concentraciones de fármaco, 6 y 10 μM , y después de 1, 2, 3, 6, y 9 días de incubación con el fármaco y las nanopartículas se llevó a cabo la evaluación de la viabilidad celular mediante el método del MTT.

La concentración de nanopartículas necesaria para alcanzar estas concentraciones de fármaco se recoge en la Tabla 1.

El estudio de la internalización de los sistemas en ambas líneas celulares se llevó a cabo de forma cuantitativa y cualitativa. Para ello, se prepararon nanopartículas cargadas con un fluoróforo (6-cumarina) de forma que pudiera realizarse la determinación a través de la señal de fluorescencia emitida por los sistemas internalizados. La determinación cuantitativa de la internalización de los sistemas se valoró tras la incubación de las nanopartículas con cumarina a diferentes tiempos y concentraciones, un lavado posterior para eliminar el exceso de los sistemas no internalizados, la lisis de las células y la cuantificación de la señal fluorescente emitida tras la misma. En el caso de la determinación cualitativa, se fotografiaron las células con un microscopio de fluorescencia tras el lavado del excedente de nanopartículas no internalizadas.

Finalmente, se procedió a la evaluación del efecto del tamoxifeno sobre el ciclo celular de ambas líneas. Para ello, se seleccionaron las mismas concentraciones de fármaco y nanopartículas con tamoxifeno que se emplearon para el estudio de la viabilidad celular (6 y 10 μM), y se analizó mediante citometría de flujo el efecto del fármaco sobre el ciclo celular de ambas líneas tras 48 h de incubación. Las nanopartículas sin fármaco también se evaluaron a la concentración más elevada para comprobar si podrían tener algún efecto sobre el ciclo celular por sí mismas.

Resultados:

Los sistemas preparados se caracterizaron en términos de tamaño medio y potencial zeta mediante la difusión de la luz cuasielástica. Todas las nanopartículas mostraron un tamaño medio nanométrico. Las nanopartículas sin fármaco B-50-50 NP, C-70-30 NP, y BSA-SH NP tuvieron un tamaño medio de 449, 361, and 514 nm, respectivamente. En el caso de los sistemas TMX-B-50-50 NP, TMX-C-70-30 NP, y TMX-BSA-SH NP se determinó tamaño medio 446, 430, and 498 nm, respectivamente. La medida del potencial zeta dio como resultado

valores de potencial zeta de -50 ± 6 , -27 ± 4 y -23 ± 6 mV para las nanopartículas B-50-50 NP, C-70-30 NP y BSA-SH NP, respectivamente. En el caso de las nanopartículas cargadas con tamoxifeno se obtuvieron valores de potencial zeta de -37 ± 9 , -26 ± 7 y $-7,2 \pm 0,3$ mV para los sistemas TMX-B-50-50 NP, TMXC-70-30 NP y TMX-BSA-SH NP, respectivamente.

En cuanto a la determinación de la cantidad de tamoxifeno incluido en las nanopartículas, los resultados obtenidos mediante el método indirecto y la degradación enzimática están recogidos en la Tabla 1. La cantidad de fármaco cuantificada mediante ambos métodos fue similar. De acuerdo a los resultados obtenidos, la composición TMX-C-70-30 NP fue la que más fármaco incluyó, mientras que las nanopartículas TMX-B-50-50 NP y TMX-BSA-SH NP mostraron cargas de fármaco similares. Si se compara con los valores de carga obtenidos en el trabajo anterior, se consiguió optimizar la carga en el caso de los sistemas TMX-C-70-30 NP y TMX-BSA-SH NP. En el caso de la extracción directa con metanol, se obtuvieron valores de $2,1 \pm 0,3$, $3,0 \pm 0,3$, and $2,2 \pm 0,2$ $\mu\text{g TMX/mg NP}$ para las composiciones TMX-B-50-50 NP, TMX-C-70-30 NP, y TMX-BSA-SH NP, respectivamente, con lo que parte del fármaco seguía quedando retenido en los sistemas tras su extracción directa.

Los perfiles de liberación del fármaco quedan recogidos en la Figura 1. Se registraron los máximos de liberación para las nanopartículas TMX-B-50-50 NP, TMX-C-70-30 NP y TMX-BSA-SH NP con valor de $2,2 \pm 0,2$ $\mu\text{g TMX/mg NP}$ a las 2 h, $2,92 \pm 0,04$ $\mu\text{g TMX/mg NP}$ a las 4 h, y $2,2 \pm 0,2$ $\mu\text{g TMX/mg NP}$ a las 25 h, respectivamente. En todas ellas se observa una primera fase de liberación rápida en los primeros 10 minutos en la que se libera el 37,18%, 36,85%, y 14,89% del tamoxifeno incluido en las composiciones TMX-B-50-50 NP, TMX-C-70-30 NP, y TMX-BSA-SH NP, respectivamente. Tras esta primera fase, se produce una segunda fase de liberación más lenta en la que se pudo determinar la velocidad de liberación del fármaco para cada composición: $0,3802$ $\mu\text{g TMX/mg NP/h}$ ($r^2 = 0,923$) para las nanopartículas TMX-B-50-50 NP entre 2 minutos y 2 h de liberación; $0,114$ $\mu\text{g TMX/mg NP/h}$ ($r^2 = 0,922$) para el sistema TMX-C-70-30 NP

entre 30 minutos y 4 h de liberación; y $0,09 \mu\text{g TMX/mg NP/h}$ ($r^2 = 0,910$) para la composición TMX-BSA-SH NP entre 30 minutos y 6 h de liberación. La liberación del fármaco no fue completa en ninguno de los tres casos, quedando un 45-51% de fármaco aún remanente en los sistemas.

Los ensayos de viabilidad celular llevados a cabo con los sistemas sin fármaco incluido mostraron que, en general, las nanopartículas eran citocompatibles (Figura 2), mostrando porcentajes de viabilidad comprendidos entre $115 \pm 9\%$ y $80 \pm 9\%$ en las MCF7, y entre $127 \pm 2\%$ y $74 \pm 5\%$ en las HeLa. Las únicas excepciones donde los valores de viabilidad bajaron de estos intervalos se obtuvieron en las células MCF-7 con los sistemas B-50-50 NP y C-70-30 NP tras 6 y 9 días de incubación y a la concentración más alta empleada.

Los ensayos de internalización celular se llevaron a cabo con las nanopartículas marcadas con cumarina, de forma que mediante el estudio, ya sea cualitativo o cuantitativo, de la señal fluorescente obtenida se obtendrá información sobre la presencia de las nanopartículas en las células y también de la cantidad de sistemas internalizada. Los resultados del estudio cualitativo y cuantitativo se muestran en la Figura 3. Las nanopartículas que contenían alginato en su composición fueron internalizadas en mayor medida que las nanopartículas formadas exclusivamente por proteína, tanto en el caso de las células MCF-7 como en las HeLa. También se observó que la internalización parecía ser más concentración-dependiente que tiempo-dependiente, ya que en general se vieron diferencias significativas entre la concentración de $0,5 \text{ mg/ml}$ y 1 mg/ml , pero apenas se observaron entre 24 h y 48 h. Además, la internalización en las células HeLa fue cuatro veces mayor que en el caso de las MCF-7. Las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia (Figura 3) muestran claramente la interacción de los sistemas con ambas líneas celulares.

Los resultados de los ensayos de viabilidad celular llevados a cabo con las nanopartículas cargadas con tamoxifeno se reflejan en la Figura 4. Cuando el fármaco y los sistemas se administraron a la concentración de $6 \mu\text{M}$, no se

observaron diferencias significativas entre el fármaco en disolución y el incluido en las nanopartículas en ninguna de las líneas celulares. Además, en el caso de las Hela apenas se apreció el efecto citotóxico del fármaco en ninguna de sus formas de administración. Sin embargo, a la concentración de 10 μM si se observaron diferencias entre los sistemas cargados con tamoxifeno y la disolución del fármaco, observándose una disminución más gradual de la viabilidad que la obtenida con el fármaco en disolución. En las MCF-7 estas diferencias se observaron a partir del segundo día en el caso de los sistemas TMX-B-50-50 NP y TMX-C-70-30 NP, y a partir del sexto día con las nanopartículas TMX-BSA-SH NP. En el caso de las HeLa las diferencias son claras desde el primer día de incubación con los sistemas. Al comparar los datos de viabilidad celular obtenidos en ambas líneas celulares se observaron valores de viabilidad más elevados en las células HeLa que en las MCF-7.

Finalmente, se llevó a cabo el análisis del efecto del tamoxifeno sobre el ciclo celular de ambas líneas mediante citometría de flujo. En el caso de las células HeLa no se observaron diferencias entre las células control sin tratar, las tratadas con tamoxifeno en disolución a 6 y 10 μM , y las tratadas con las nanopartículas sin fármaco y con fármaco a ambas concentraciones. En definitiva, su ciclo celular no sufrió ninguna alteración después de ninguno de los tratamientos. Sin embargo, en el caso de las MCF-7 si se detectaron diferencias (Figura 5). Las nanopartículas sin fármaco por sí mismas no alteraron el ciclo celular, mostrando histogramas similares al de las células control. En el caso de la administración de 6 y 10 μM de tamoxifeno, ya fuera en disolución o incluido en las nanopartículas, se observó un aumento del porcentaje de células en la fase G_1 y una disminución del porcentaje de células en fase S.

Tamoxifen-loaded thiolated alginate-albumin nanoparticles as antitumoral drug delivery systems

A. Martínez,¹ M. Benito-Miguel,² I. Iglesias,¹ J. M. Teijón,² M. D. Blanco²

¹Group of Polymeric Materials for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicine, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Spain

²Group of Polymeric Materials for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicine, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Spain

Received 6 September 2011; revised 8 November 2011; accepted 29 November 2011

Published online 6 March 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.34051

Abstract: Nanoparticles based on disulfide bond reduced bovine serum albumin and thiolated alginate (alginate-cysteine conjugate) have been prepared by coacervation method and have been loaded with tamoxifen (TMX). The TMX load into the nanoparticles was optimized (4–6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ NP) by freeze-drying the systems before the loading procedure. Maximum TMX release (45–52%) took place between 2 and 25 h. Cytotoxicity of unloaded nanoparticles in MCF-7 and HeLa cells was not observed, although a small decrease in viability took place at very high concentration. Cell uptake of nanoparticles

occurred in both cell types and the presence of polysaccharide in the nanoparticle composition allowed a better interaction with cells. The administration of 10 μM TMX by TMX-nanoparticles was effective in both cellular lines, and the effect of the drug-loaded systems on MCF-7 cell cycle showed the efficacy of the TMX-loaded nanoparticles. © 2012 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part A*: 100A: 1467–1476, 2012.

Key Words: drug delivery systems, alginate, albumin, nanoparticles, tamoxifen, cell cultures

How to cite this article: Martínez A, Benito-Miguel M, Iglesias I, Teijón JM, Blanco MD. 2012. Tamoxifen-loaded thiolated alginate-albumin nanoparticles as antitumoral drug delivery systems. *J Biomed Mater Res Part A* 2012;100A:1467–1476.

INTRODUCTION

Cancer is one of the most important public health problems and has become the leading cause of death in the world. Despite a lot of advances in the last decade, the development of innovative targeted therapies and the design of rational drug delivery systems continue to be researched intensely.¹

One of the main goals of nanomedicine is to develop safe and effective drug carriers that are systemically applied but will selectively deliver cytotoxic drugs to tumor cells without harming normal cells.² Most nanocarriers achieve tumor-selective accumulation through the enhanced permeability and retention effect, so that macromolecules in the size range from 100–1200 nm in diameter can be administered to achieve a localized action due to the unique structural features of many solid tumors (hypervascularity, defective vascular architecture and impaired lymphatic drainage).^{3–5}

Among the available potential drug carrier systems in this size range, protein and polysaccharide-based nanoparticles play an important role, and their use in these specific systems with some anticancer drugs shows promising results.^{6,7}

Tamoxifen (TMX) has been the clinical choice for antiestrogen treatment of advanced or metastatic breast cancer for more than 20 years. It is used as adjuvant or additional

therapy following primary treatment for early stage breast cancer. However, TMX acts as an oestrogen-agonist to the uterus, increasing the probability of developing endometrial cancer among other side effects.⁸ Moreover, it shows low water solubility, which limits the administration route of this drug to the oral route. Up to now, TMX has been formulated in nanoparticulate carrier systems to overcome these disadvantages using synthetic polymers, such as poly- ϵ -caprolactone and PEG,^{9,10} as well as using natural polymers.^{7,11}

The objective of the present study is the optimization of the TMX-loading procedure for the preparation of thiolated alginate-albumin nanoparticles, which were obtained by the coacervation method.¹¹ In addition, cell viability and cellular uptake, as well as the effect of the systems on cell cycle kinetic parameters in various cancer cell lines, were studied in order to evaluate their effectiveness in drug delivery systems.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Alginate sodium salt, trypsin from bovine pancreas (13,000 units/mg solid), gentamicin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), dimethyl sulfoxide (DMSO), methylthiazolotetrazolium (MTT), Coumarin

Correspondence to: M. D. Blanco; e-mail: mdblanco@med.ucm.es

Contract grant sponsor: Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain; contract grant numbers: FIS PS09/01513, MAT2010-21509-C03-03

Contract grant sponsor: Universidad Complutense de Madrid (UCM) Grupos UCM; contract grant number: 920613

Contract grant sponsor: UCM (FPI Grant)

6 + 99%, and TMX were purchased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). Sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl; 35%), ethanol absolute, triethylamine, methanol (HPLC gradient grade), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), potassium chloride (KCl), and potassium dihydrogenphosphate were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Bovine serum albumin (BSA, Fraction V), sodium chloride (NaCl), disodium hydrogen phosphate dehydrated, and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Merck (Barcelona, Spain). Fetal bovine serum (FBS), penicillin (50 U/mL), streptomycin (50 µg/mL), and 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA were purchased from Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY.

Methods

Preparation of TMX-loaded nanoparticles. Nanoparticles of disulfide bond reduced bovine serum albumin (BSA-SH) and BSA-SH/alginate-cysteine conjugate (ALG-CYS) mixtures were prepared according to the methodology developed in previous studies.¹¹ Briefly, an aqueous solution of BSA 5% (w/v) was treated with 2-mercaptoethanol in order to obtain BSA-SH, and ALG-CYS conjugate was synthesized by attaching L-cysteine molecules to alginate backbone by a carbodiimide-mediated reaction.¹¹ Then, a determined amount of BSA-SH and ALG-CYS was dissolved in 20 mL 1 mM HCl under intense stirring conditions. The obtained suspension was sonicated (Branson sonifier 450) and the pH of the suspension was adjusted to 6.5–6.8 with 1M NaOH. The formation of disulfide bonds was allowed to proceed for 12 h under intense stirring conditions. After this time, the resulting suspension was centrifuged (41,000 rpm, 15 min, Beckman Coulter Optima L-100 XP Ultracentrifuge), and nanoparticles were freeze dried for 24 h at -110°C . Nanoparticles with 50% ALG-CYS and 50% BSA-SH (B-50-50 nanoparticles), 70% ALG-CYS and 30% BSA-SH (C-70-30 nanoparticles), and 100% of BSA-SH (BSA-SH nanoparticles) in their composition were selected for loading the drug. Then, 20 mg of the obtained nanoparticles was suspended in 1 mL of a 500 µg/mL TMX solution (in ethanol), and it was incubated for 12 h at room temperature. Finally, the suspension was centrifuged (41,000 rpm, 15 min) and nanoparticles were again freeze-dried. The supernatant was retained for later characterization studies. All of the experiments with TMX were performed under subdued light as the drug is highly photosensitive.

Size and zeta potential measurements. Size and zeta potential measurements of the TMX-loaded and unloaded systems in deionized distilled water were performed using a back-scattered quasi-elastic light scattering device (Zetatracc NPA-152, Microtrac). Data were processed with Microtrac Flex Software.

Estimation of drug content. In order to determine the TMX loaded into nanoparticles, three different methods were carried out. In the first one, TMX load was determined by calculating the difference between the initial and the final concentration of TMX solution where nanoparticles were incubated (indirect method). This amount was consid-

ered to be loaded in the nanoparticles. The second method consisted of an enzymatic digestion of TMX-loaded nanoparticles with trypsin and a subsequent extraction of the drug with an organic solvent: 2 mg of TMX-loaded nanoparticles was suspended in 2 mL of phosphate-buffered saline (PBS, pH = 7.4), and 100 µg of trypsin was added to the solution. The digestion process was performed under stirring at 37°C for 24 h. After this time, TMX was extracted from PBS solution by the addition of 4 mL of dichloromethane. The tubes were mixed in a vortex mixer for 10 min and then centrifuged for 20 min at 3000 rpm. The organic phase was transferred to flask vials and evaporated to dryness. The resulting residue was reconstituted in methanol and then evaluated by HPLC technique. In order to establish the efficacy of the extraction process, 2 mg of unloaded nanoparticles was suspended with a known concentration of TMX in PBS and 100 µg of trypsin, and the same extraction protocol was followed. The third method consisted of a direct extraction of the drug from TMX-loaded nanoparticles using methanol: 3 mg of TMX-loaded nanoparticles were suspended in 1 mL of methanol under stirring conditions during 5 h. After this time, the suspension was centrifuged (13,000 rpm, 5 min) and the supernatant was collected for the measurement. The samples obtained in all processes were analyzed by HPLC.

High-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector was required to determine the drug content.^{12,13} The chromatographic separation was performed on a 25 cm \times 4.6 mm RP-Spherisorb ODS2 C₁₈ column (5 µm particle size, Waters). The mobile phase consisted of 1% aqueous solution of triethylamine and methanol 11/89 (v/v). A flow rate of 1 mL/min was established. The fluorescence detector was set at an excitation wavelength of 250 nm and an emission wavelength of 370 nm. A photochemical reactor unit with a wavelength of 254 nm was placed between the detector and the column. Chromquest 4.2 software (Thermo) was used to process the obtained data. The limit of detection of TMX established by this method was 1 ng/mL. Standard solutions (10–2000 ng/mL) of TMX in methanol were used to obtain the calibration curve, and a good linear correlation ($r^2 = 0.99$) was obtained.

Drug release studies. For drug release studies from TMX-loaded nanoparticles, 5 mg of drug-loaded nanoparticles was added to 5 mL PBS (pH = 7.4) with 0.5% SDS contained in a flask vial at a constant temperature (37°C) and orbital shaking (100 rpm, Ecotron INFORS HT). TMX is relatively insoluble in the aqueous medium, and SDS is an anionic surfactant used to make the release of the drug easier in phosphate buffer.^{11,14} At intervals, 50 µL samples were withdrawn from the solution in order to follow the change in drug concentration using HPLC. The removed volume from the vial was replaced with PBS with 0.5% SDS. Sink conditions were maintained during drug release experiments.⁹

In vitro cell culture studies

Cell culture. Human breast adenocarcinoma (MCF7) cells were obtained from Dr. von Kobbe and human cervical cancer (HeLa) cells were obtained from Dr. Tierrez. Cells

TABLE I. Estimation of Tamoxifen Content in Nanoparticles and Concentration of TMX-NP Needed to Obtain 6 and 10 μM of TMX in the Cell Culture Medium

Sample	Drug content in nanoparticles		Required concentration of TMX-NP to obtain TMX concentration in cell culture studies	
	By difference of concentration in drug-solution after loading process (μg TMX/mg NP)	By tryptic hydrolysis of the nanoparticles (μg TMX/mg NP)	Concentration of TMX-NP ($\mu\text{g}/\text{mL}$) to obtain 6 μM TMX	Concentration of TMX-NP ($\mu\text{g}/\text{mL}$) to obtain 10 μM TMX
TMX B-50-50	3.96 \pm 0.09 ^a	4.1 \pm 0.4	557.2	928.6
TMX C-70-30	6.1 \pm 0.2 ^{a,b}	5 \pm 1	371.6	619.6
TMX BSA-SH	4.4 \pm 0.6 ^b	3.8 \pm 0.4	557.2	928.6

Data marked with the same letter showed significant differences between them.

Data were shown as mean \pm S.D. ($n = 3$).

were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium + GlutaMax-I, supplemented with 10% heat inactivated FBS, penicillin (50 U/mL), streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and gentamicin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂ atmosphere (HERA cell, Sorvall Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Germany). Cells were plated in 75-cm² flask (Sarstedt Ag, Barcelona, Spain) and were passaged when reaching 95% confluence, by gentle trypsinization.

Cell viability. Cell viability was evaluated by using the MTT method. All experimental conditions were performed in quintuplicate. Each experiment was carried out in triplicate. In preliminary experiments, increasing concentrations of TMX from 0.01 μM to 1 mM were tested in culture. The selected concentrations were 6 and 10 μM TMX. Cells were seeded in 96-well flat-bottom plates at 5000 cells/well in the case of MCF7 and at 2500 cells/well in the case of HeLa. After 24 h, the medium was replaced with 100 μL medium with 1% FBS containing nanoparticles, TMX-loaded nanoparticles or the drug in solution. The amount of nanoparticles was between 0.372 and 0.929 mg/mL (Table I), which was in accordance with the concentration of TMX used in the experiment, considering the TMX load of the particles. After 1, 2, 3, 6, and 9 days, each well was added with 10 μL MTT solution (5 mg/mL). After 2 h incubation at 37°C, 5% CO₂, each well was replaced with 100 μL DMSO.¹⁵ The cell viability was determined by measuring the absorbance at 570 nm using a spectrophotometer (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain). Results are presented as the percentage survival in relation to untreated control cells.

Cellular uptake of nanoparticles. Nanoparticles (10 mg) were loaded with Coumarin by immersion in 1 mL of a 1 mg/mL Coumarin solution (in ethanol) at room temperature in dark for 48 h under orbital shaking. After this time, the suspension was centrifuged (7000 rpm, 5 min), and the Coumarin-loaded nanoparticles were freeze-dried for 24 h at -110°C . Cellular uptake of nanoparticles was investigated with a monoculture of MCF7 cells and HeLa cells. Cells were seeded in 96-well flat-bottom plates at 10,000 cells per well for MCF7 cells and at 5000 cells per well for HeLa. Twenty-four hours later, the medium was

replaced with 100 μL medium with 1% FBS containing 2 mg of unloaded nanoparticles per mL of growth medium and 0.5–2 mg of Coumarin-loaded nanoparticles per mL of growth medium. The plates were incubated at 37°C for 24 and 48 h. Then, the cells were washed thoroughly with PBS in order to remove the nanoparticles, which were not effectively internalized by the cells. Finally, MCF7 and HeLa cells were dried overnight and dissolved in 100 μL of lysis reagent (PBS with 2% SDS and 50 mM EDTA).¹⁶ The remaining nanoparticles were quantified by fluorimetry at 488 nm using a spectrophotometer (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain). In order to calculate the amount of nanoparticles from fluorescence, calibration curves (fluorescence versus concentration) were prepared in the same lysis medium.

Additionally, microscopy studies were carried out before PBS of the final wash was removed. Localization of fluorescent dye was examined by light fluorescence microscopy (Leica DMIL microscope, Leica Microsystems Switzerland). Cell cultures were photographed with a Leica DFC 300FX digital camera and used Leica Application Suite software for processing the pictures (Leica Microsystems Switzerland).

Cell cycle analysis. The effect of unloaded nanoparticles, TMX-loaded nanoparticles, and TMX in solution on the cell cycle kinetic parameters of MCF7 and HeLa cells was investigated using flow cytometry. The selected concentrations for the analysis of TMX-loaded nanoparticles and drug in solution were 6 and 10 μM TMX, which were the selected concentrations in cell viability study (Table I). In case of unloaded nanoparticles, only the maximum concentration used in viability studies was tested in this analysis. Cells were seeded in 24-well flat-bottom plates at 100,000 cells per well for MCF7 and HeLa cells. Twenty-four hours later, MCF-7 cells and HeLa cells in exponential phase of growth were treated with the correspondent dose of each type of nanoparticle for 48 h, then harvested by trypsinization, and washed with ice-cold PBS and fixed by 70% ethanol at -20°C for 45 min. The fixed cells were then washed twice with ice-cold PBS and suspended in 150 μL of PBS. A total of 5 μL of 10 mg/mL RNase A (Roche) was added at 37°C for 30 min, and finally the cells were stained with 25 μL of 1 mg/mL propidium iodide.¹⁷ Cell cycle distribution was

analyzed using FACScalibur flow cytometer Data from 5000 cells per sample, which were collected and analyzed using the CellQuest software (BD Biosciences, Mountain View, CA).

Statistical analysis. Statistical comparisons were performed with unpaired Student's t-test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Size and zeta potential measurements

The prepared nanoparticles were characterized in terms of mean size and surface charge. Each nanoparticle formulation was analyzed using quasi-elastic light scattering analysis.

All nanoparticles showed nanometric mean size. B-50-50, C-70-30, and BSA-SH unloaded systems showed an average diameter of 449, 361, and 514 nm, respectively. TMX-B-50-50, TMX-C-70-30, and TMX-BSA-SH nanoparticles showed a mean diameter of 446, 430, and 498 nm. According to these results, it seemed that the drug loading process did not highly affect to the size of nanoparticles.

Zeta potential analysis revealed that B-50-50, C-70-30, and BSA-SH unloaded systems had zeta potential values of -50 ± 6 , -37 ± 4 , and -23 ± 6 mV, respectively. Negative values of zeta potential were expected in these formulations because nanoparticles based on alginate and BSA prepared in other studies showed negative superficial charge values.^{18,19} In case of TMX-loaded systems, TMX-B-50-50, TMX-C-70-30, and TMX-BSA-SH nanoparticles showed zeta potential values of -37 ± 9 , -26 ± 7 , and -7.2 ± 0.3 mV, respectively. It has been reported in other works²⁰ that the presence of TMX into the nanoparticle structure decreases the negative value of superficial charge of the system, becoming positive in some cases.²¹ Thus, less negative values of zeta potential were obtained in our TMX-loaded systems. This difference in superficial charge on TMX-loaded nanoparticles was probably due to the surface localization of the drug. As TMX is a weak base with a pK_a of 8.85, it is expected to be positively charged in the nanoparticle suspension, causing a decrease in the negative value of zeta potential.⁹ Surface localization of TMX was later confirmed in the quantification of drug content by the extraction with methanol, and the burst release observed in the *in vitro* release profile.

Estimation of drug content in nanoparticles

Three different methods were carried out to determine the drug content. Indirect method, enzymatic degradation, and direct extraction with methanol were performed in order to quantify the TMX load of the systems.

According to the indirect method, TMX-C-70-30 nanoparticles included more drug than TMX-B-50-50 and TMX-BSA-SH nanoparticles, which showed similar values of loaded drug (Table I). Comparing with the previous study,¹¹ a higher TMX-load was found in case of TMX-C-70-30 and TMX-BSA-SH. Thus, loading the drug after the freeze drying process allowed the optimization of the loading process in case of these two systems. Different factors have to be considered. On the one hand, a higher concentration of TMX was used in the drug solution where nanoparticles were

incubated (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ instead of 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Consequently, a higher amount of drug was available for being loaded into nanoparticles. On the other hand, the effect of freeze drying has to be taken into account. Freeze drying is a commonly used process for drying drug nanosuspensions where nanoparticles suffer various stresses.²² For this reason, different interactions could be established between nanoparticles and the drug if the loading process is carried out before or after the loading process, which could condition the TMX load in the systems.

Considering the results of the enzymatic degradation method, TMX load calculated by indirect method seems to be confirmed by this method, showing no significant differences between both procedures (Table I).

In case of the TMX extraction with methanol, TMX-B-50-50, TMX-C-70-30, and TMX-BSA-SH showed values of 2.1 ± 0.3 , 3.0 ± 0.3 , and 2.2 ± 0.2 μg TMX per mg nanoparticle, respectively. According to the results obtained in this study and in the previous one,¹¹ only part of the TMX included into the nanoparticles was extracted using this method due to the high hydrophobic character of TMX, and the strong interactions established with the hydrophobic regions of the albumin and other plasma proteins.²³ Thus, only 53, 50, and 50% of the TMX included into TMX-B-50-50, TMX-C-70-30, and TMX-BSA-SH nanoparticles, respectively, was obtained by this method. This amount of extracted drug should correspond with the most superficial TMX included into the systems, because the superficial presence of the drug into the nanoparticles was previously confirmed with less negative values of zeta potential in case of TMX-loaded systems.

Drug release studies

The release of TMX from drug-loaded nanoparticles is shown in Figure 1. The maximum drug release from TMX-B-50-50 was 2.19 ± 0.2 μg TMX per mg nanoparticle at 2 h (Fig. 1); from TMX C-70-30, it was 2.92 ± 0.04 μg TMX per mg nanoparticle at 4 h (Fig. 1); and from TMX BSA-SH, 2.18 ± 0.2 μg TMX per mg nanoparticle at 25 h (Fig. 1).

The drug release occurred in a short and fast first stage for the first 10 min at which 37.18, 36.85, and 14.89% of loaded TMX in TMX-B-50-50, TMX-C-70-30, and TMX-BSA-SH, respectively, was released. From this, a slower second stage was established and TMX release rate was determined: 0.3802 μg TMX/h per mg nanoparticle ($r^2 = 0.923$) between 20 min to 2 h in case of TMX-B-50-50; 0.114 μg TMX/h per mg nanoparticle ($r^2 = 0.922$) between 30 min to 4 h in case of TMX-C-70-30; and 0.09 μg TMX/h per mg nanoparticle ($r^2 = 0.910$) between 30 min to 6 h in case of TMX-BSA-SH.

The burst release of hydrophobic drugs, such as TMX, was attributed to the predominant surface presence of the drug in the nanoparticle formulation,⁹ which was previously confirmed by the value of zeta potential and the extraction with methanol from TMX-loaded systems. This superficial TMX, whose interactions with the hydrophobic regions of BSA were weaker, was mostly released in the first stage and was more relevant in case of formulations with ALG-CYS in composition. In the second stage, when release became much slower, TMX more strongly retained by nanoparticles

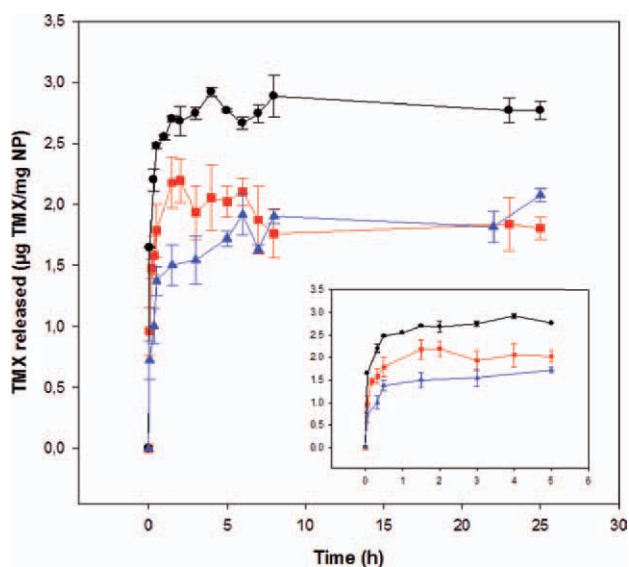


FIGURE 1. Cumulative amount of TMX released from drug-loaded TMX B-50-50 (—■—), TMX C-70-30 (—●—) and TMX BSA-SH (—▲—) nanoparticles. Comparison of the three release curves during the first 24 h. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

was released. As it was concluded in previous studies,¹¹ interactions between TMX and albumin were the main regulator factor in the release of the drug. From this second stage, an equilibrium phase between the release medium and nanoparticles was established, showing at times lower drug concentrations than the maximum drug release value. According to different studies, TMX showed good stability in the release medium for several days²⁴ and degradation of the drug could not have been happened during the 24 h in which drug release was studied. Thus, lower drug concentrations than the maximum drug release could only occur if part of the released drug would be captured again by the system causing some fluctuations in concentration of the released drug. Interactions between the system and the released drug could be established again due to the hydrogel behavior and the high swelling degree of the systems in PBS.¹¹

Moreover, the complete release of the included drug was not achieved in any case, as the maximum drug release from TMX-B-50-50, TMX-C-70-30, and TMX-BSA-SH corresponds with 55, 48, and 49% of the TMX-loaded, respectively. Therefore, part of the loaded drug is still entrapped into the nanoparticle structure, even at favorable conditions for releasing the drug, such as the presence of SDS in the release medium. The partial release of TMX from these nanoparticles could be seen an advantage since they could be uptaken by cells with a significant amount of antitumoral drug only available when these systems would be uptaken by tumoral cells and enzymatically degraded in the cellular medium.

Cell culture studies

As cell sensitivity to nanoparticulate drug delivery systems can vary depending on the cell line where they are assayed, two different cellular lines were used in *in vitro* cellular studies. MCF7 cell line is estrogen receptor (ER)-positive,

whereas HeLa cell line is ER-negative.²⁵ MCF7 has been frequently used for studying the effects of antiestrogenic agents on growth of malignant cells *in vitro*.²⁶ Different studies showed HeLa cell line as a comparative model, which exhibited antiestrogen-induced growth inhibition that was reversible and comparable with growth inhibition achieved in MCF7 cultures but independent of the ER.²⁷

In general, the cytotoxicity of BSA-SH/ALG-CYS and BSA-SH nanoparticles was low. These studies were carried out at 1, 2, 3, 6, and 9 days for high and low concentrations of nanoparticles. The range of cell survival, in presence of various concentrations of unloaded nanoparticles (371.6–928.6 µg/mL), was between $115 \pm 9\%$ and $80 \pm 9\%$ for MCF7 (with the exceptions of high concentrations of B-50-50 and C-70-30 after 6 and 9 days of incubation; Fig. 2) and between $127 \pm 2\%$ and $74 \pm 5\%$ for HeLa (Fig. 2). Thus, BSA-SH nanoparticles had good biocompatibility and produced minimal cytotoxicity in both cellular lines, even at high concentrations and after 9 days of incubation. In case of B-50-50 and C-70-30 nanoparticles, they showed good biocompatibility and produced minimal cytotoxicity in HeLa cells during the complete experiment and in MCF-7 cells

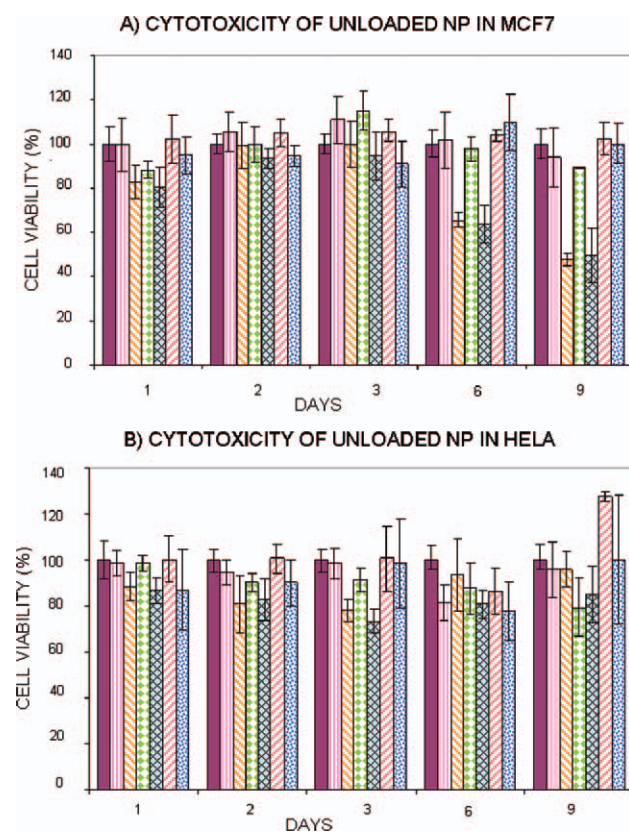


FIGURE 2. Cytotoxicity of unloaded NP in MCF7 and HeLa cells. Cell viability of (A) MCF7 and (B) HeLa: without NP (■); with unloaded B-50-50 at a concentration 557.2 µg/mL (□) and at 928.6 µg/mL (■); with unloaded C-70-30 at a concentration 371.6 µg/mL (□) and at 619.6 µg/mL (■); with unloaded BSA-SH at a concentration 928.6 µg/mL (□) and at 928.6 µg/mL (■). Data were shown as mean \pm SD ($n = 5$). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

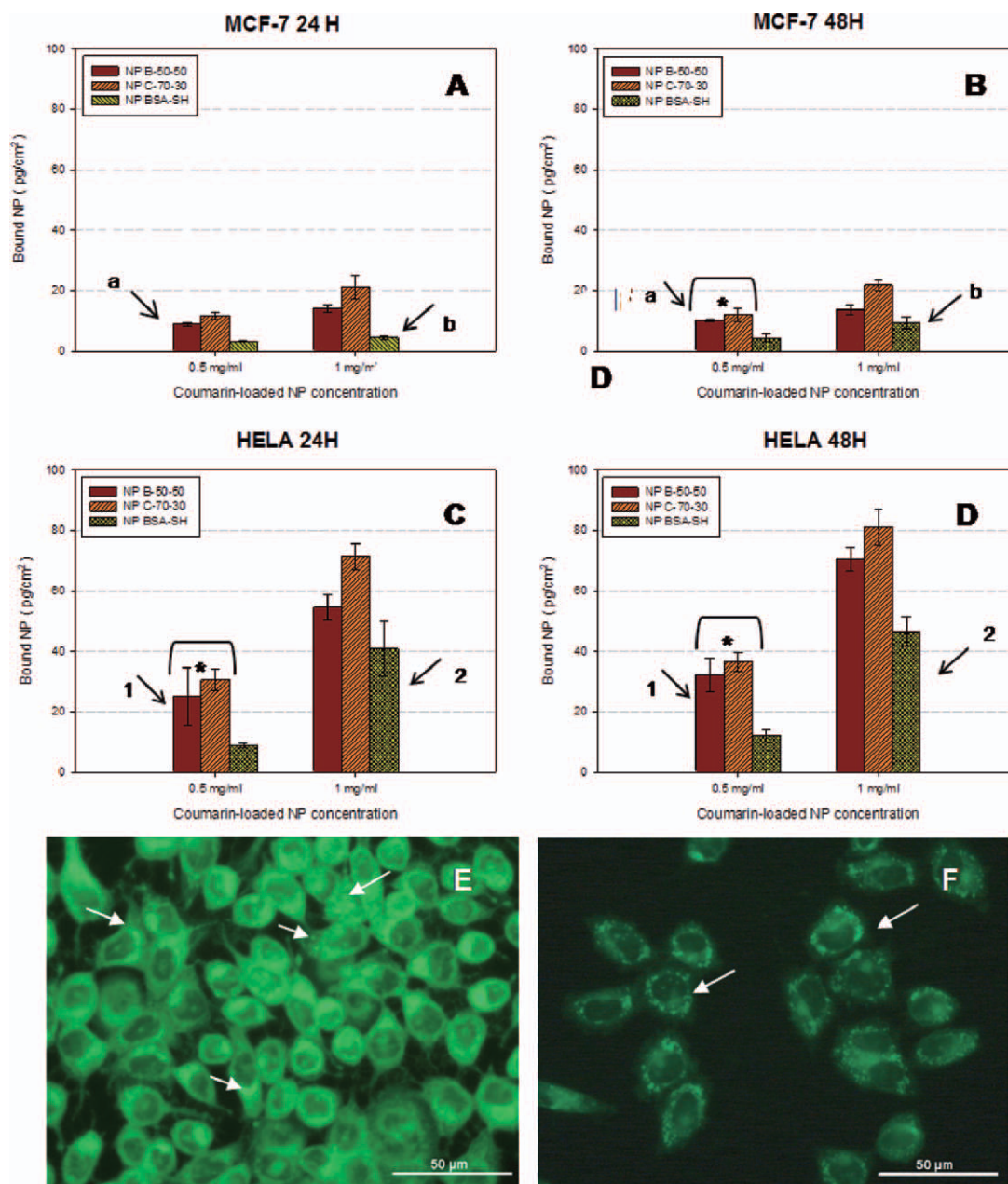


FIGURE 3. Quantitative comparison of Coumarin-loaded included nanoparticles into MCF7 for 24 h (A) and 48 h (B), and into HeLa cells for 24 h (C) and 48 h (D). Fluorescence microscopy images of Coumarin-loaded nanoparticles in MCF7 (E) and HeLa (F) cells, after 48 h of incubation. White arrows indicate representative uptaken Coumarin-loaded nanoparticles by cells. Data marked with the same number, and with asterisk (*) did not show significant statistical differences between them ($p > 0.05$). Data marked with the same letter showed significant statistical differences between them ($p < 0.05$). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

during the three first days of incubation, even at high concentrations. However, as the concentration of unloaded nanoparticles increased, a cytotoxicity effect was observed in MCF7 cells after 6 and 9 days of incubation.

Fluorescence markers are frequently used in cellular uptake studies.^{28,29} Cell uptake features of Coumarin-loaded nanoparticles were evaluated in order to quantify the interaction between cells and nanoparticles. The quantitative analysis is shown in Figure 3, where the amount of included nanoparticles per surface is represented at different times

(24 and 48 h) and two selected concentrations of Coumarin-loaded nanoparticles (0.5 and 1 mg/mL) for both cell lines. In case of MCF7, significant differences between the uptake of the three systems at each concentration were found at 24 h [Fig. 3(A)]. The same occurred at 48 h with the exception of B-50-50 and C-70-30 at 0.5 mg/mL, where no significant differences were found [Fig. 3(B)]. Besides, in order to establish a correlation between uptake and time, uptake results of each nanoparticle in a specific concentration at 24 and 48 h were statistically compared. No

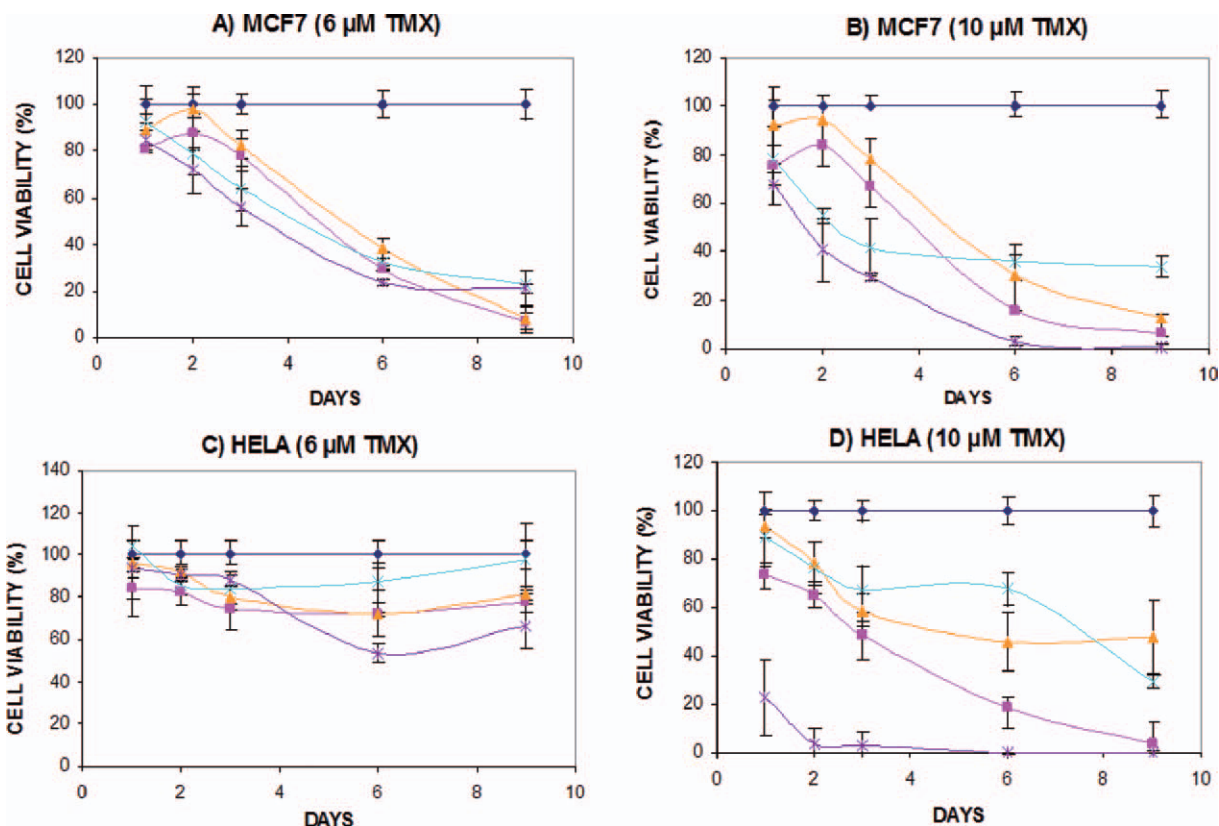


FIGURE 4. Cell viability of MCF7 (A, B) and HeLa (C, D) in the presence of 6 μM (A, C) and 10 μM (B, D) of tamoxifen (TMX): without drug (—●—); TMX solution (—×—); TMX-B-50-50 nanoparticles (—■—); TMX-C-70-30 nanoparticles (—▲—); TMX-NP-BSA-SH nanoparticles (—×—). Data were shown as mean \pm SD ($n = 5$). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

correlation between uptake and these measured times was found as statistically significant but the case of B-50-50 at 0.5 mg/mL and BSA-SH at 1 mg/mL, where a significant increase of the uptake was detected with the incubation time. In case of HeLa cells, significant differences between the uptake of the three systems at both concentrations were found at 24 h [Fig. 3(C)] and 48 h [Fig. 3(D)] with the exception of B-50-50 and C-70-30 at 0.5 mg/mL at both incubation times, where no significant differences were found. In this case, a significant increase of the uptake was detected between 24 and 48 h within the three systems with the exception of B-50-50 at 0.5 mg/mL and BSA-SH at 1 mg/mL, where no significant differences were observed. Moreover, nanoparticle penetration in HeLa cells was almost four times larger than thus observed in MCF7 cells. As these are not targeted-systems, the uptake of the nanoparticles should take place by unspecific mechanisms in both cell lines as other studies described.²⁴ All in all, B-50-50 and C-70-30, which included alginate in their composition seemed to interact better than BSA-SH nanoparticles (Fig. 3), especially C-70-30, which would indicate that the more presence of polysaccharide in nanoparticle composition, the better penetration in cells.

To visualize the cellular uptake of Coumarin-loaded nanoparticles, MCF7 and HeLa cells were observed by fluorescence microscopy [Fig. 3(E,F)]. As Coumarin has green fluorescence, the presence of fluorescence-marked nanoparticles was easily observed.

Two concentrations of TMX (6 and 10 μM) were administered to MCF7 and HeLa cells by solutions of the drug and by TMX-loaded nanoparticles (Fig. 4). In case of MCF-7, the decrease in viability in the presence of 6 μM TMX administered by TMX-loaded nanoparticles was similar to that observed when TMX was administered in solution [Fig. 4(A)]. In case of 10 μM TMX, the decrease in cell viability when TMX was administered by TMX-loaded nanoparticles was more gradual than that observed when TMX was administered in solution. From 2 days of exposure in case of TMX-B-50-50 and TMX-C70-30, and after 6 days in case of TMX-BSA-SH nanoparticles [Fig. 4(B)], the decrease in cell viability was according to a TMX controlled release from the systems, so not all the TMX-loaded into nanoparticles was immediately available for cells and the effect of the drug was gradually observed.

In case of HeLa cells cytotoxicity was not observed at 6 μM TMX administered by TMX-loaded nanoparticles and TMX solution [Fig. 4(C)]. Meanwhile, a gradual decrease in cell viability was observed when 10 μM TMX was administered by TMX-loaded nanoparticles after 24 h exposure of cells. When TMX was administered in solution, the percentage of viability was highly reduced from the first 24 h of exposure, so the gradual action of nanoparticles was due to the slowly release of the drug from the systems. The gradual reduction on cell survival in both cellular lines when TMX-loaded nanoparticles were administered in cells showed the efficacy of the systems.

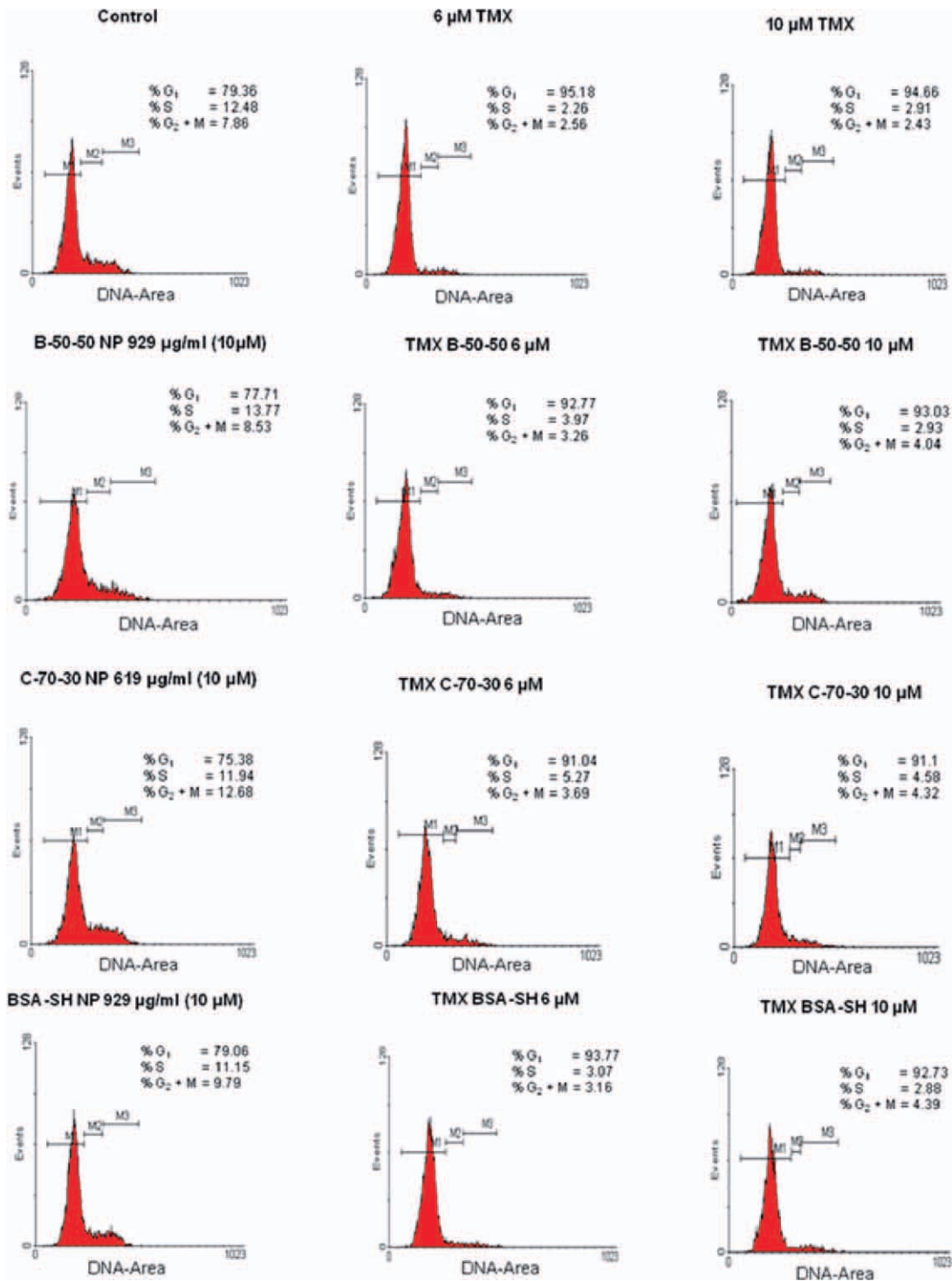


FIGURE 5. Effect of tamoxifen (TMX) on the DNA distribution histograms of MCF7 cells 48 h after drug treatment. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

The survival rates of HeLa cells were higher than the corresponding ones of MCF7 cells at 6 µM TMX, which shows up the different minimal concentration of action of TMX in both cell lines. This fact probably depends on the different action mechanism of TMX in these cell lines.²⁴ The antiproliferative mechanism of TMX in ER-positive breast cancer MCF7 line seems to include mainly the inhibition of

estrogen binding to its receptor,^{30,31} and the fact that MCF7 cells take up TMX through nonspecific endocytosis.⁹ Furthermore, as it was observed in some *in vitro* experiments, sensitivity to the growth inhibitory effect of TMX does not correlate directly with the ER receptor content of the tumor cells,³² exerting its action on ER-negative breast cancer cells by modulating protein kinase C via oxidative stress.³³

Regarding HeLa cells, TMX activates different MAPKs (ERK2 and JUN1) in this cell line.³⁴

To assess the effect of TMX-loaded nanoparticles and TMX in solution on the cell cycle, MCF7 and HeLa cells were treated with the concentrations of the drug, which were previously used in the cell viability assay (6 and 10 μM) for 48 h, and then they were prepared for flow cytometry in the presence of propidium iodide to stain the nuclear DNA.

In case of HeLa cells (data not shown), any effect on their cell cycle was observed when they were treated with nanoparticles as well as with TMX in solution. They showed similar percentages of G₁ phase and S phase cells in case of cells treated with unloaded and TMX-loaded nanoparticles and TMX in solution to those obtained in case of control cells (70.21% G₁; 13.33% S and 16.46% G₂ +M). TMX, like other antiestrogens, exert its effects on cell cycle by binding to oestrogen receptor and then translocating it to the nucleus, where steps leading to oestrogen-regulated events such as tumor growth are inhibited.³⁵ As it was explained before, HeLa cells are ER-negative and TMX effect is mediated by a different mechanism in these cells, based on the activation of MAPKs, which play a critical role in phosphorylation and activation of various transcription factors as well as in apoptosis.^{36,37} Because of the absence of ER in these cells, and according to the different mechanism of the TMX in this cell line, specific differences in cell cycle parameters were not found in this study.

In case of MCF7, the DNA distribution histograms for MCF7 control cells and MCF7 cells that had been treated with various doses of TMX-loaded nanoparticles, unloaded nanoparticles, and TMX in solution for 48 h are shown in Figure 5. Percentages of G₁, S, and G₂+M phase cells are represented in the figure. As it was observed, both doses of TMX-loaded nanoparticles and TMX in solution caused a similar decrease in the percentage of S phase cells and a concomitant increase in the percentage of MCF7 cells in G₁ phase (Fig. 5). Unloaded nanoparticles were tested in cells as well at the concentration, which corresponded with the maximum concentration of nanoparticles used in the study. According to the obtained results, MCF7 treated with the unloaded-systems showed a similar behavior in their cell cycle kinetics as MCF7 control cells (Fig. 5). Thus, the observed effect on cell cycle in case of cells treated with drug-loaded systems was caused by the action of the drug and not by the nanoparticle structure itself as the changes in cell cycle parameters were comparable with those observed in cells treated with TMX in solution for 48 h. Different studies have reported the TMX effect on the growth of MCF7 at various intervals of time,^{38,39} and it was established that the majority of changes occurred during the first 24 h of exposure to the drug and thereafter remained constant.⁴⁰ According to the results, the effect of released TMX from nanoparticles on cellular cycle was similar to that observed with TMX in solution, which shows that entrapped TMX into nanoparticles has not suffered any chemical modification which could affect to the mechanism of action of the drug. Therefore, as the same effect on MCF-7 cells has been described, TMX-loaded nanoparticles would be consider as effective as TMX in solution.

Previous studies had demonstrated that TMX treatment of asynchronous cultures of MCF7 cells resulted in growth inhibition, which was associated with the accumulation of cells in the G₀–G₁ phase of the cell cycle.^{40,41} Furthermore, it was described that changes in cell cycle kinetic parameters seen with doses of 1–12.5 μM TMX were compatible with TMX acting at the same loci as oestrogen within cell cycle.⁴² A dose-dependent reduction in cell survival with exposure of exponentially growing cells to TMX was also found, correlating to some extent with the growth inhibitory effects.³⁹ In the present study, it has been found that 6 and 10 μM TMX doses acted modifying the percentage of G₁ phase and S phase cells in a similar way, not allowing the dose-dependent effect to be observed. Studies in different laboratories have shown that the response of human breast cancer lines to TMX *in vitro* is strongly influenced by the culture conditions employed,⁴³ making difficult to compare various studies on TMX sensitivity performed under different experimental conditions.

CONCLUSION

Nanoparticles based on BSA-SH and BSA-SH/ALG-CYS mixtures have been prepared by coacervation method. The loading procedure of TMX was performed after freeze drying the systems and the obtained nanoparticles were characterized. TMX was successfully incorporated into nanoparticles after the freeze-drying process (4–6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ NP), and a higher amount of loaded drug was achieved into TMX-C-70-30 and TMX-BSA-SH systems. Total release of the drug was not achieved in any case; only the 45–52% was released. Unloaded nanoparticles were not toxic to MCF-7 and HeLa cells *in vitro*, except at high concentrations in case of polysaccharide-based systems in MCF-7 cells. The study of nanoparticle uptake by both cellular lines showed that the presence of polysaccharide in nanoparticle composition allowed a better interaction between the systems and the cells. Viability studies of the systems showed effective elimination of carcinoma cells, and the mechanism of action of the released drug from nanoparticles on the cell cycle of MCF-7 cells was the same as TMX when administered in solution, showing the efficacy of the drug-loaded systems.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. von Kobbe (Chimera Pharma of Bionostra Group) and Dr. Tierrez (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, CNIC, Spain) for the gift of MCF7 and HeLa cells.

REFERENCES

1. Sancey L, Dufort S, Josserand V, Keramidas M, Righini C, Rome C, Faure AC, Foillard S, Roux S, Boturyn D, et al. Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging. *Int J Pharm* 2009;379:309–316.
2. Gullotti E, Yeo Y. Extracellularly activated nanocarriers: A new paradigm of tumor targeted drug delivery. *Mol Pharm* 2009;6:1041–1051.
3. Kratz F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release* 2008;132:171–183.
4. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J Control Release* 2000;65:271–284.

5. Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol* 2008;26:57–64.
6. Karmali PP, Kotamraju VR, Kastantin M, Black M, Missirlis D, Tirrell M, Ruoslahti E. Targeting of albumin-embedded paclitaxel nanoparticles to tumors. *Nanomedicine* 2009;5:73–82.
7. Sarmah JK, Bhattacharjee SK, Mahanta R, Mahanta R. Preparation of cross-linked guar gum nanospheres containing tamoxifen citrate by single step emulsion in situ polymer cross-linking method. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2009;65:329–334.
8. Cohen I. Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. *Gynecol Oncol* 2004;94:256–266.
9. Chawla JS, Amiji MM. Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *Int J Pharm* 2002;249:127–138.
10. Dreaden EC, Mwakwari SC, Sodji QH, Oyelere AK, El-Sayed MA. Tamoxifen-poly(ethylene glycol)-thiol gold nanoparticle conjugates: Enhanced potency and selective delivery for breast cancer treatment. *Bioconjug Chem* 2009;20:2247–2253.
11. Martínez A, Iglesias I, Lozano R, Teijón JM, Blanco MD. Synthesis and characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. Evaluation as drug delivery systems. *Carbohydr Polym* 2011;83:1311–1321.
12. Lee KH, Ward BA, Desta Z, Flockhart DA, Jones DR. Quantification of tamoxifen and three metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: Application to a clinical trial. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2003;791:245–253.
13. MacCallum J, Cummings J, Dixon JM, Miller WR. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of tamoxifen and its major metabolites in plasma. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;678:317–323.
14. Hu FX, Neoh KG, Kang ET. Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles. *Biomaterials* 2006;27:5725–5733.
15. Han X, Liu J, Liu M, Xie C, Zhan C, Gu B, Liu Y, Feng L, Lu W. 9-NC-loaded folate-conjugated polymer micelles as tumor targeted drug delivery system: Preparation and evaluation in vitro. *Int J Pharm* 2009;372:125–131.
16. Garcia-Fuentes M, Prego C, Torres D, Alonso MJ. A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery. *Eur J Pharm Sci* 2005;25:133–143.
17. Hu H, Ahn NS, Yang X, Lee YS, Kang KS. Ganoderma lucidum extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *Int J Cancer* 2002;102:250–253.
18. Arnedo A, Espuelas S, Irache JM. Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *Int J Pharm* 2002;244:59–72.
19. Aynie I, Vauthier C, Chacun H, Fattal E, Couvreur P. Spongelike alginate nanoparticles as a new potential system for the delivery of antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1999;9:301–312.
20. Brigger I, Chaminade P, Marsaud V, Appel M, Besnard M, Gurny R, Renoir M, Couvreur P. Tamoxifen encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. A new antiestrogen formulation. *Int J Pharm* 2001;214:37–42.
21. Abbasalipurkabir R, Salehzadeh A, Abdullah R. Delivering tamoxifen within solid lipid nanoparticles. *Pharm Technol* 2011;35:74–79.
22. Lee MK, Kim MY, Kim S, Lee J. Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: Effect of freezing rate. *J Pharm Sci* 2009;98:4808–4817.
23. Morello KC, Wurz GT, DeGregorio MW. Pharmacokinetics of selective estrogen receptor modulators. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:361–372.
24. Blanco MD, Guerrero S, Benito M, Teijon C, Olmo R, Muniz E, Katime I, Teijon JM. Tamoxifen-loaded folate-conjugate poly([p-nitrophenyl acrylate]-co-(N-isopropylacrylamide)) sub-microgel as antitumoral drug delivery system. *J Biomed Mater Res A* 2010;95:1028–1040.
25. Sonvico F, Mornet S, Vasseur S, Dubernet C, Jaillard D, Degrouard J, Hoebeke J, Duguet E, Colombo P, Couvreur P. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: Synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjug Chem* 2005;16:1181–1188.
26. Coezy E, Borgna JL, Rochefort H. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: Correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res* 1982;42:317–323.
27. Grenman S, Shapira A, Carey TE. In vitro response of cervical cancer cell lines CaSki, HeLa, and ME-180 to the antiestrogen tamoxifen. *Gynecol Oncol* 1988;30:228–238.
28. Panyam J, Sahoo SK, Prabha S, Bargar T, Labhasetwar V. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Int J Pharm* 2003;262:1–11.
29. Ding L, Lee T, Wang CH. Fabrication of monodispersed Taxol-loaded particles using electrohydrodynamic atomization. *J Control Release* 2005;102:395–413.
30. Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 2002;295:2465–2468.
31. Miller MA, Katzenellenbogen BS. Characterization and quantitation of antiestrogen binding sites in estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1983;43:3094–3100.
32. Reddel RR, Murphy LC, Hall RE, Sutherland RL. Differential sensitivity of human breast cancer cell lines to the growth-inhibitory effects of tamoxifen. *Cancer Res* 1985;45:1525–1531.
33. Gundimeda U, Chen ZH, Gopalakrishna R. Tamoxifen modulates protein kinase C via oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J Biol Chem* 1996;271:13504–13514.
34. Duh JL, Yu R, Jiao JJ, Matwyshyn GA, Li W, Tan TH, Kong AN. Activation of signal transduction kinases by tamoxifen. *Pharm Res* 1997;14:186–189.
35. Ameller T, Legrand P, Marsaud V, Renoir JM. Drug delivery systems for oestrogenic hormones and antagonists: The need for selective targeting in estradiol-dependent cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;92:1–18.
36. Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y, Nishida E. ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci* 2006;97:697–702.
37. Sumbayev VV, Yasinska IM. Role of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in innate immune responses and viral infection. *Scand J Immunol* 2006;63:391–400.
38. Osborne CK, Boldt DH, Clark GM, Trent JM. Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: Accumulation of cells in early G1 phase. *Cancer Res* 1983;43:3583–3585.
39. Taylor IW, Hodson PJ, Green MD, Sutherland RL. Effects of tamoxifen on cell cycle progression of synchronous MCF-7 human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 1983;43:4007–4010.
40. Sutherland RL, Green MD, Hall RE, Reddel RR, Taylor IW. Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983;19:615–621.
41. Cover CM, Hsieh SJ, Cram EJ, Hong C, Riby JE, Bjeldanes LF, Firestone GL. Indole-3-carbinol and tamoxifen cooperate to arrest the cell cycle of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1999;59:1244–1251.
42. Sutherland RL, Reddel RR, Green MD. Effects of oestrogens on cell proliferation and cell cycle kinetics. A hypothesis on the cell cycle effects of antioestrogens. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983;19:307–318.
43. Butler WB, Kelsey WH, Goran N. Effects of serum and insulin on the sensitivity of the human breast cancer cell line MCF-7 to estrogen and antiestrogens. *Cancer Res* 1981;41:82–88.

3. Eficacia preclínica mejorada del tamoxifeno formulado en nanopartículas de alginato-cisteína/albúmina reducida.

[Enhanced preclinical efficacy of tamoxifen developed as alginate-cysteine/disulfide bond reduced albumin nanoparticles. A. Martínez, E. Muñiz, I. Iglesias, J.M. Teijón y M.D. Blanco. *International Journal of Pharmaceutics*, 436: 574-581 (2012)].

Objetivo:

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la eficacia antitumoral *in vivo* del tamoxifeno incorporado en nanopartículas basadas en diferentes mezclas de BSA-SH/ALG-CYS, previamente caracterizadas *in vitro*, mediante la administración subcutánea de los sistemas en un modelo de cáncer de mama xenograft (MCF-7) desarrollado en ratones atómicos. La efectividad de los sistemas se valoró comparativamente respecto a la acción del fármaco administrado en disolución sin vehiculizar.

Metodología:

Las nanopartículas con tamoxifeno que se evaluaron en este estudio fueron preparadas siguiendo el protocolo desarrollado en los estudios anteriores, realizando el proceso de inclusión del fármaco de acuerdo al método de optimización llevado a cabo en el trabajo previo (partiendo de las nanopartículas liofilizadas y empleando una disolución de tamoxifeno con una concentración elevada). Las composiciones seleccionadas para este estudio *in vivo* fueron aquellas formadas por mezclas de proteína y polisacárido modificados: B-50-50 NP y TMX-B-50-50 NP, las cuales partían inicialmente de 50% de ALG-CYS y 50% BSA-SH en su composición, y C-70-30 NP y TMX-C-70-30 NP, que partían inicialmente de 70% de ALG-CYS y 30% BSA-SH. La cantidad de fármaco incluida en estas composiciones fue $3,96 \pm 0,09 \mu\text{TMX}/\text{mg NP}$ en el sistema TMX-B-50-50 NP, y $6,1 \pm 0,2 \mu\text{TMX}/\text{mg NP}$ en el sistema TMX-C-70-30 NP.

La línea celular seleccionada para el desarrollo de los tumores xenograft fue la línea celular MCF-7 de cáncer de mama humano. Las células se cultivaron

siguiendo el procedimiento rutinario, y antes de la inoculación en los ratones se tripsinizaron y se resuspendieron en medio de cultivo, manteniéndolas en hielo hasta su inyección.

En cuanto a los ratones empleados para el estudio, se seleccionaron ratones hembra atímicos nu/nu de 4 semanas de edad, que se mantuvieron en condiciones de esterilidad y comida y bebida a demanda. Las células se inyectaron subcutáneamente en el lateral derecho de los ratones (10^7 células/0,3 ml) que se mantuvieron anestesiados con isoflurano durante la inoculación. Los animales recibieron inyecciones subcutáneas semanales de valerato de $17\text{-}\beta$ -estradiol tras la implantación de las células para favorecer el crecimiento del tumor. Una vez que los ratones hubieron desarrollado un tumor palpable ($\sim 400\text{ mm}^3$), el tratamiento hormonal se suspendió y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 6 grupos de cinco ratones cada uno: grupo control (a los que se les administró suero salino), dos grupos placebo tratados con los sistemas B-50-50 NP y C-70-30 NP, un grupo tratado con las nanopartículas TMX-B-50-50 NP, un grupo tratado con las nanopartículas TMX-C-70-30 NP y, finalmente, un grupo tratado con el fármaco en disolución. La cantidad de fármaco administrada en cada inyección fue de $36\text{ }\mu\text{g}$, y las inyecciones se llevaron a cabo cada 3 días durante 21 días. El tamaño del tumor se obtuvo midiendo cada tres días dos diámetros perpendiculares del mismo y calculando el volumen de cada tumor aplicando la ecuación incluida en la metodología del trabajo.

Una vez se finalizó el tratamiento, un ratón de cada grupo se perfundió con paraformaldehído 4%, y su tumor se aisló y post-fijó de nuevo en paraformaldehído 4%. El resto de los ratones se sacrificaron y se extrajeron muestras de plasma, del útero y de los ovarios, y de los tumores. Las muestras se congelaron para ser procesadas después en el estudio de biodistribución del fármaco.

Las muestras de tumores post-fijadas en paraformaldehído 4% se incluyeron en parafina para la preparación de bloques sólidos con los que llevar a cabo los

cortes de tejido necesarios para las tinciones histológicas y los estudios de inmunohistoquímica.

El estudio histológico de los tumores se llevó a cabo mediante la realización de tres tinciones básicas: hematoxilina-eosina, azul de toluidina y azul alcian hemalumbre picro-indigo.

El estudio de inmunohistoquímica se basó en la detección de Ki-67, un antígeno nuclear presente en células proliferativas y ausente en células quiescentes, a través de un anticuerpo primario específico de dicho antígeno (anticuerpo anti-Ki 67 humano realizado en ratón). Para revelar la presencia de dicho antígeno, se llevaron a cabo dos métodos diferentes tras la incubación con el anticuerpo primario: el primero consistió en un revelado en campo claro y el segundo empleó la fluorescencia para detectar la presencia del antígeno. Para el método del campo claro se empleó un anticuerpo secundario IgG biotinilado, que se incubó posteriormente con una mezcla avidina-biotina y se reveló empleando diaminobenzidina. Para el método fluorescente se empleó un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (anticuerpo realizado en conejo anti-ratón y unido a rodamina). Para asegurar la especificidad del anticuerpo primario, algunos cortes se incubaron sólo en presencia de ambos anticuerpos secundarios para emplearlos como control negativo.

Para estudiar la biodistribución del tamoxifeno y uno de sus metabolitos más importantes, el 4-hidroxitamoxifeno, las muestras de plasma, útero y ovarios y tumores se homogenizaron siguiendo el procedimiento descrito en la metodología. A continuación se llevó a cabo la extracción del fármaco de cada una de ellas mediante un disolvente orgánico y los extractos fueron procesados mediante HPLC.

Resultados:

Para evaluar la actividad antitumoral del tamoxifeno administrado en las nanopartículas se empleó un modelo de tumor de mama xenograft desarrollado en ratones atímicos. Antes del inicio de cada uno de los tratamientos, se

realizaron estudios preliminares de biocompatibilidad de las nanopartículas administrando una dosis única de cada tipo de sistema en ratones sin tumor para comprobar que no se producía el rechazo del tratamiento. Se comprobó que las nanopartículas se toleraban bien y se degradaban por completo en 15 días tras su administración (resultados no mostrados en el trabajo). Así pues, tras realizar esta comprobación, el tratamiento con las nanopartículas con fármaco y sin él, así como con el fármaco en disolución, comenzó una vez los ratones hubieran desarrollado tumores palpables, administrando la dosis correspondiente de cada tipo de tratamiento cada 3 días durante 21 días. Todos los tratamientos fueron bien tolerados por los animales ya que no se produjeron pérdidas de peso significativas (Datos no mostrados).

La medida del volumen del tumor se realizó cada tres días para estudiar su evolución (Figura 1). Además, con estos valores se establecieron dos velocidades de crecimiento del tumor (Tabla 1): V_1 o velocidad de crecimiento del tumor antes de comenzar los tratamientos, la cual se determinó para un grupo único que incluía todos los ratones antes de distribuirlos en los grupos, obteniéndose un valor de $23 \text{ mm}^3/\text{día}$ (0,928); y V_2 o velocidad de crecimiento del tumor tras el comienzo los tratamientos y que se estableció para cada uno de los grupos, cuyos valores se recogen en la Tabla 1. Con estos valores, se calculó el índice V_2/V_1 para analizar posibles diferencias entre el crecimiento del tumor en cada grupo antes y después del tratamiento.

Como se puede apreciar en la Figura 1, los tumores de los ratones pertenecientes al grupo control y al grupo de las nanopartículas placebo C-70-30 NP crecieron rápidamente y se mantuvieron así durante todo el experimento. Además, los índices V_2/V_1 de ambos grupos fueron muy similares (Tabla 1), indicando que no había diferencias en el crecimiento del tumor de ambos grupos. En el caso del grupo de las nanopartículas placebo B-50-50 NP, se encontraron volúmenes de tumor significativamente más bajos que los del grupo control al comienzo del tratamiento; sin embargo, estas diferencias desaparecieron a partir del día 40 hasta el final del experimento, cuando los tumores comenzaron a

crecer más rápido, detectándose finalmente un índice V_2/V_1 similar al del grupo control y al de las nanopartículas placebo C-70-30 NP (Tabla 1).

En cuanto a los grupos de ratones tratados con tamoxifeno, los volúmenes de los tumores tratados con las nanopartículas TMX-B-50-50 NP, y especialmente con las nanopartículas TMX-C-70-30 NP, fueron significativamente más pequeños que los tumores tratados con el fármaco en disolución (Figura 1), aunque en el caso de las nanopartículas TMX-B-50-50 NP los volúmenes parecían igualarse a los del fármaco libre al final del experimento. El índice V_2/V_1 fue < 1 en todos los grupos tratados con tamoxifeno, pero la administración del fármaco incluido en los sistemas condujo a la obtención de volúmenes de tumor más pequeños, indicando una mejora en la eficacia terapéutica del fármaco.

Con el objetivo de confirmar la efectividad de los sistemas con fármaco incluido, se realizaron estudios histológicos e inmunohistoquímicos de los tumores procedentes de cada grupo de tratamiento.

Los resultados de los estudios histológicos mediante la tinción de azul de toluidina y hematoxilina-eosina se mostraron en las Figuras 2 y 3, respectivamente. La tinción con azul alcian hemalumbre picro-indigo se incluyó como material suplementario (Figura S-1). La interpretación de las tres tinciones básicas permitió obtener las siguientes conclusiones. En el caso de los tumores del grupo control, se observó la presencia de células con morfología poliédrica, en cuyos núcleos se podía observar la cromatina dispersa y nucléolos prominentes (Figura 2A), agrupadas en grandes masas sólidas sin apenas presencia de tejido conectivo (Figura S-1A).

Además, se encontraron muchas células en diferentes fases de división celular (Figura 2A y 3A). Los tumores obtenidos de los grupos tratados con las nanopartículas placebo, tanto las B-50-50 NP como las C-70-30 NP presentaron un aspecto muy similar a los del grupo control, con lo que las conclusiones extraídas fueron las mismas (imágenes no mostradas). Sin embargo, se observaron diferencias estructurales muy claras entre estos grupos y los tratados

con las nanopartículas cargadas con tamoxifeno, especialmente respecto al sistema TMX-C-70-30 NP. Los tumores tratados con estas nanopartículas mostraron una elevada desorganización estructural, como muestran las Figuras 2C y 2D, 3C y 3D, y S-1C y S-1D. Se encontraron zonas de tejido retraído, con organizaciones sincitiales y células muy adheridas. Además, también se observó la ausencia o poca presencia de mitosis y la elevada presencia de tejido conectivo, confirmando la elevada desorganización de estos tejidos, y muy especialmente en los tratados con la composición TMX-C-70-30 NP. En el caso de los tumores tratados con tamoxifeno en disolución también se apreciaron algunas diferencias respecto a los tumores del grupo control, como una mayor presencia de tejido conectivo (Figura S-1B) así como de áreas más desorganizadas. Sin embargo, la presencia de células en estado de división mitótica era notable y casi comparable a las encontradas en el caso de los tumores control (Figura 2B y 3B). Por tanto, la eficacia antitumoral del tamoxifeno fue mayor cuando se administró incluido en las nanopartículas que cuando se administró sin vehiculizar en disolución.

Para diferenciar más específicamente las células proliferantes de las quiescentes se llevó a cabo la detección del antígeno nuclear Ki-67 en los tejidos tumorales. Su presencia se reveló mediante dos métodos diferentes, en campo claro y fluorescencia. Los resultados obtenidos del revelado en campo claro mostraron las diferencias existentes entre los tumores control (Figura 4B) y los tratados con el fármaco en disolución (Figura 4D), respecto a los tratados con el tamoxifeno incluido en los sistemas (Figura 4C). En esta técnica se consideran positivas en Ki-67 las células que presentan un marcaje negro.

La densidad de marcaje oscuro, es decir, de células con capacidad proliferativa, fue más elevada en el caso de los tumores sin tratar, los tumores tratados con las nanopartículas placebo (imágenes no mostradas) y en los tumores tratados con el fármaco en disolución, especialmente en aquellas zonas con mayor presencia de vasos sanguíneos. Sin embargo, en el caso de los tumores tratados con el tamoxifeno incluido en las nanopartículas, la coloración oscura era casi imperceptible, incluso en las zonas más irrigadas. En el caso del revelado

mediante el método fluorescente, los resultados observados fueron equivalentes a los obtenidos en el método de campo claro, sólo que en este caso la presencia del antígeno Ki-67 venía determinada por marcaje fluorescente de color rojo. Como se observa en la Figura 5, la intensidad de señal roja fue mucho más evidente en los tumores control, placebo y tratados con el fármaco en disolución (Figura 5D), mientras que era mucho más débil en el caso de los tumores tratados con las nanopartículas TMX-B-50-50 NP, y especialmente con la composición TMX-C-70-30 NP (Figura 5F). Por tanto, estos resultados apuntaban también a la mayor eficacia del tamoxifeno cuando se administra incluido en los sistemas nanoparticulados.

Finalmente, se realizó un estudio de biodistribución del fármaco y uno de sus metabolitos, el 4-hidroxitamoxifeno, en muestras de plasma, útero y ovarios y tumor de los diferentes grupos tratados con tamoxifeno con el objetivo de detectar posibles diferencias entre los tratamientos. Las concentraciones obtenidas de tamoxifeno y de 4-hidroxitamoxifeno en las muestras analizadas se recogieron en la Tabla 2. La presencia del metabolito fue solamente detectada en el caso del útero y ovarios de los tres grupos de ratones, sin existir diferencias significativas entre ellos. En el caso del tamoxifeno, sí se encontraron diferencias entre los diferentes grupos. Las muestras de plasma procedentes de los ratones tratados con el fármaco en disolución fueron las únicas que presentaron niveles de tamoxifeno detectables (Tabla 2), mientras que no fue así en el caso de las muestras de los ratones tratados con las nanopartículas. El nivel de tamoxifeno detectado en útero y ovarios de los ratones tratados con el fármaco sin vehicular fue significativamente superior (4 veces más elevado) al detectado cuando era administrado incluido en los sistemas poliméricos. Sin embargo, cuando se analizaron las muestras tumorales, la concentración de tamoxifeno fue significativamente más elevada tras el tratamiento con las nanopartículas TMX-C-70-30 NP que cuando era administrado con TMX-B-50-50 NP o el fármaco en disolución, los cuales no mostraron diferencias significativas entre sí.

Consecuentemente, la acumulación de tamoxifeno en útero, ovarios y plasma (tejidos no diana) fue mayor cuando se administró de forma libre que cuando se administró incluido en los sistemas nanoparticulados, mientras que en el tejido tumoral se favoreció su acumulación cuando el fármaco se administró vehiculizado, especialmente en las nanopartículas TMX-C-70-30 NP con las que se alcanzó la concentración de tamoxifeno en tumor más elevada.



Pharmaceutical Nanotechnology

Enhanced preclinical efficacy of tamoxifen developed as alginate–cysteine/disulfide bond reduced albumin nanoparticles

A. Martínez^a, E. Muñoz^b, I. Iglesias^a, J.M. Teijón^c, M.D. Blanco^{c,*}^a Group of Polymeric Materials for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicine, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Spain^b Group of Polymeric Materials for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicine, Departamento de Biología Celular, Facultad de Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain^c Group of Polymeric Materials for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicine, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2012

Received in revised form 18 July 2012

Accepted 20 July 2012

Available online xxx

Keywords:

Tamoxifen

Breast cancer

Alginate–cysteine

Bovine serum albumin

Nanoparticles

Xenograft tumor

ABSTRACT

Tamoxifen (TMX) is the most common clinical choice for the treatment of advanced or metastatic estrogen-dependent breast cancer. However, research on new challenging therapies is necessary due to its undesirable side effects and the limitation of the treatment only to the oral route. In this study, the antitumor activity of TMX-loaded nanoparticles based on different mixtures of alginate–cysteine and disulfide bond reduced bovine serum albumin was tested *in vivo* in MCF-7 nude mice xenograft model. These systems showed an enhancement of the TMX antitumor activity, since lower tumor evolutions and lower tumor growth rates were observed in mice treated with them. Moreover, histological and immunohistochemical studies revealed that treatments with TMX-loaded nanoparticles showed the most regressive and less proliferative tumor tissues. TMX biodistribution studies determined that TMX-loaded nanoparticles caused more accumulation of the drug into the tumor site with undetectable levels of TMX in plasma, reducing the possibility of delivering TMX to other not-targeted organs and, consequently, developing possible side effects. Thus, these TMX nanoparticulate systems are expected to provide a novel approach to the treatment of breast cancer in the future.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer has become one of the most important leading causes of death worldwide. In fact, it has been reported that cancer was the main cause of 13% of all deaths during 2008, and 11 millions are projected in 2030 (World Health Organization, 2012). To date, the most common treatments of cancer are focused on systemic application of chemotherapeutics and radiotherapeutics, which frequently fail due to the development of tumor resistance and undesirable side effects caused by the lack of selectivity of the drug against tumor cells, affecting also healthy tissues (Park et al., 2010). As regards to estrogen-dependent advanced or metastatic breast cancer, tamoxifen (TMX) has been the first election treatment among the family of drugs known as “selective estrogen receptor modulators” (SERMs) (Ameller et al., 2004). However, its low water solubility, as well as its action as an estrogen-agonist to the uterus, that increase the probability of developing endometrial cancer among other side

effects, make necessary the development of new challenging therapeutic approaches (Cohen, 2004).

Nanomedicine, the branch of nanotechnology applied to medicine and healthcare (Moghimi et al., 2005), has emerged as one approach to overcome the lack of specificity of conventional chemotherapeutic agents, using different nanovehicles between 10 and 200 nm in size, ideal because of their intracellular uptake, high loading capacity and specific targeting to tumor cells (Davis et al., 2008). Among these nanosystems, nanoparticles used as vehicles of drug delivery offer many advantages compared to conventional drug delivery approaches.

There are currently many different materials reported in the literature that have been evaluated for their use in nanoparticle based drug delivery (Galvin et al., 2012), but natural polymers, especially polysaccharides and proteins, have been widely used due to their advantages against synthetic polymers, such as versatility, biodegradability and biodisponibility. Some of these polymers have been recently used for nanoparticles preparation with anti-cancer agents, such as tamoxifen, showing good and hopeful results (Cavalli et al., 2011; Karmali et al., 2009; Sarmah et al., 2011).

Tamoxifen-loaded nanoparticles based on different mixtures of modified alginate and albumin were previously evaluated *in vitro* as controlled drug delivery systems (Martínez et al., 2011), and

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Pabellón IV, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913941447; fax: +34 913941691.

E-mail address: mdblanco@med.ucm.es (M.D. Blanco).

tested against different carcinoma cell lines, one of them human breast carcinoma cell line (MCF-7 cells), showing good and promising results (Martínez et al., 2012). The aim of this study was to evaluate the *in vivo* antitumor activity of two of these formulations in xenograft nude mice comparatively with the use of TMX free administered.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Alginate sodium salt, tamoxifen (TMX), 4-hydroxytamoxifen (4OH-TMX), 17- β -estradiol valerate, sesame oil and paraformaldehyde were purchased from Sigma–Aldrich (Barcelona, Spain). Sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl; 37%), ethanol absolute, xylene, acetonitrile, tris(hydroxymethyl) aminomethane and potassium dihydrogenphosphate were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Bovine serum albumin (BSA, Fraction V) and disodium hydrogen phosphate dehydrated were purchased from Merck (Barcelona, Spain). Dulbecco's modified Eagle medium + GlutaMax (DMEM) was purchased from Lonza (Belgium). 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA was purchased from Invitrogen Life Technologies (Grand Island, NY).

2.2. Preparation of tamoxifen-loaded nanoparticles

Tamoxifen-loaded and unloaded nanoparticles based on disulfide bond reduced bovine serum albumin (BSA-SH) and alginate–cysteine conjugate (ALG–CYS) mixtures were prepared according to the methodology developed in previous studies (Martínez et al., 2011, 2012). Briefly, a determined amount of BSA-SH and ALG–CYS was dissolved in 20 ml 1 mM HCl under intense stirring conditions. The obtained suspension was sonicated (Branson sonifier 450) and the pH of the suspension was adjusted to 6.5–6.8 with 1 M NaOH. The formation of disulfide bonds was allowed to proceed for 12 h under intense stirring conditions. After this time, the resulting suspension was centrifuged (41,000 rpm, 15 min, Beckman Coulter Optima L-100 XP Ultracentrifuge), and nanoparticles were freeze dried for 24 h at -110°C . Then, 20 mg of the obtained nanoparticles was suspended in 1 ml of a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TMX solution (in ethanol) and it was incubated for 12 h at room temperature. Finally, the suspension was centrifuged (41,000 rpm, 15 min) and nanoparticles were again freeze-dried. TMX-loaded and unloaded nanoparticles with 50% ALG–CYS and 50% BSA-SH (B-50-50 NP) and 70% ALG–CYS and 30% BSA-SH (C-70-30 NP) in their composition were selected for the *in vivo* studies. The amount of TMX loaded into B-50-50 and C-70-30 NP was 3.96 ± 0.09 and 6.1 ± 0.2 μg TMX/mg NP, respectively (Martínez et al., 2012).

2.3. Cell culture

MCF-7 cells (tamoxifen-sensitive, estrogen receptor-positive human breast cancer cell line) were obtained from Dr. von Kobbe and cultured routinely as previously described (Martínez et al., 2012). For inoculation into nude mice, cells were washed in phosphate buffer saline (PBS), incubated in PBS-trypsin for 5 min, and then resuspended in DMEM prior to injection.

2.4. Animals and implantation of tumor cells

The study protocol was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of Complutense University of Madrid. Four-week-old female nu/nu athymic nude mice were purchased from Harlan Inc. (Indianapolis, IN, USA) and maintained under specific pathogen-free conditions with food and water ad libitum. Cultured cells were adjusted to a concentration of 10^7 cells/0.3 ml DMEM, placed on ice until needed and finally inoculated

subcutaneously into the right flank of each mouse through a 23-G needle tunnelled 1–2 cm to prevent leakage of the inoculum under isofluran anaesthesia conditions. Animals received 50 μg of 17- β estradiol valerate dissolved in 0.1 ml of sesame oil as repository vehicle immediately after cell transplantation, by s.c. injection. Estradiol injections were repeated once a week to sustain tumor growth (Behrens et al., 2007). After the mice developed palpable solid tumors (of an average tumor of ~ 400 mm³), hormonal treatment was stopped and mice were randomly divided into six groups of five mice each: untreated (saline serum), treated with placebo B-50-50 NP and C-70-30 NP (drug-unloaded) at the same concentration than that used for drug-loaded nanoparticles, treated with 36 μg of free tamoxifen and treated with tamoxifen-loaded B-50-50 NP and C-70-30 NP (36 μg equiv. of tamoxifen). Subcutaneous injections were performed close to the tumor site every 3 days during 21 days.

Tumor size was evaluated every three days by measuring two perpendicular diameters with an electronic caliper, and tumor size was estimated using the following equation: tumor volume = $0.5 \times (W^2 \times L)$, where W is the smaller perpendicular diameter and L is the larger perpendicular diameter. Following the completion of treatment schedule, one mouse of each group was perfused with paraformaldehyde 4% and the tumors were isolated and post-fixed in paraformaldehyde 4%. The rest of mice were sacrificed, and uterus and ovaries, plasma and tumor samples were extracted and frozen for later TMX quantification studies.

2.5. Tumor histology and immunohistochemistry studies

After the post-fixation step, tumors were washed by successive dipping in ethanol and xylene, and embedded in Paraplast[®] (Surgipath[®], Leica). For histological observations, the tumors were cut into 8 μm sized sections using a microtome blade, fixed on the glass slide for overnight at 37°C , and mounted using glass coverslip for observation under a microscope. The tumor sections were analyzed for histology by optical microscopy using the alcian blue hemalum picro-indigo, the toluidine blue, and the hematoxylin–eosin methods (Humason, 1979).

5 μm sized tumor sections were cut in order to develop immunohistochemical studies. These studies were carried out using the Ki-67 labeling test (Patel and Amiji, 1996). Ki-67, a nuclear antigen expressed in proliferating cells and absent in resting cells, was qualitatively determined incubating the samples with purified mouse anti-human Ki-67 antibody (1:25, BD Biosciences Pharmingen, USA) and revealed them after by two different methods. The first one used an antimouse IgG biotinylated antibody (1:100, Vector Laboratories Inc., USA) as second antibody; then samples were incubated using an avidin–biotin mixture (Vector Laboratories Inc., USA) and finally revealed with diaminobenzidine (Vector Laboratories Inc., USA). Tissue sections were washed and mounted for observation under a microscope (Arias et al., 2009). The second method used a fluorescence dye for revealing the presence of the antigen. In this case, after the incubation with the mouse antihuman Ki-67 antibody, samples were incubated with a rabbit antimouse-rhodamine as second antibody (1:100, BD Biosciences Pharmingen), then washed and mounted with Dapi-Fluoromount-G (SouthernBiotech, AL, USA) for observation by light fluorescence microscopy. To ensure specific staining of the Ki-67 positive cells, some tissue sections were treated only with the second antibody of both methods.

2.6. Quantification of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen in plasma and tissues

Tissue samples from tumor, uterus and ovaries were weighted and homogenized (Heidolph RZR 2050 electronic) at 1200 rpm

in ice-cold 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4. The homogenates were mixed with an equal volume of 100% of acetonitrile and the precipitated proteins were removed by centrifugation at 13,250 rpm for 6 min. Plasma samples followed a similar protocol, being mixed with an equal volume of 100% of acetonitrile and then centrifuged. The supernatants were transferred to sample vials for analysis by high performance liquid chromatography with fluorescence detector technique (Kisanga et al., 2003). The chromatographic separation was performed on a 25 cm × 4.6 mm RP-Spherisorb ODS2 C₁₈ column (5 μm particle size, Waters). The mobile phase consisted of 1% aqueous solution of triethylamine and acetonitrile 9/91 (v/v). A flow rate of 1 ml/min was established. The fluorescence detector was set at an excitation wavelength of 250 nm and an emission wavelength of 370 nm. A photochemical reactor unit with a wavelength of 254 nm was placed between the detector and the column. Chromquest 4.2 software (Thermo) was used to process the obtained data. The detection limits established by this method were 1 ng/ml and the coefficient of variation for inter-run of TMX and 4-OHTMX was 9–10% and 6–14%, respectively, for concentrations between 2.5 and 200 ng/mL. Standard solutions (5–500 ng/ml) of TMX and 4OH-TMX in acetonitrile/water (50/50, (v/v)) were used to obtain the calibration curves and a good linear correlation ($r^2 = 0.99$) was determined.

2.7. Statistical analysis

Results were expressed as a mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using one way analysis of variance (ANOVA) following by Bonferroni post hoc analysis with computer software SPSS 19.0. A p -value < 0.05 and p < 0.01 were considered significant and very significant, respectively.

3. Results

3.1. In vivo antitumor activity of TMX-loaded nanoparticles in xenograft mice

The antitumor activity of TMX-loaded nanoparticles was assessed comparatively to free TMX using a xenograft nude mouse model with human breast cancer MCF-7 cells. After the mice developed palpable solid tumors, they were randomly divided into six groups to receive different treatments. In order to ensure the biodegradability of the systems and to establish the nanoparticles-treatment dosage, preliminary experiments were carried out with a unique dose of both types of nanoparticles in mice without tumors. Nanoparticles were well tolerated and totally degraded within 15 days (data not shown). Thus, subcutaneous injections were performed close to the tumor site every three days during 21 days. No significant weight loss was observed in any of the treatment groups, indicating that all the treatments were well tolerated (data not shown).

Tumor volume was measured every three days until Day 49 in order to evaluate the tumor evolution (Fig. 1). Moreover, tumor growth rate values were determined from first day of treatment until the end of the experiment (V_2), and the tumor growth ratio for each group was calculated using the tumor growth rate established before the beginning of the treatment when mice formed and unique group (V_1 ; $V_1 = 23 \text{ mm}^3/\text{day}$ (0.928)) (Table 1).

As shown in Fig. 1, tumor volume increased rapidly when the mice were treated with saline serum or unloaded C-70-30 NP. Little differences were found between the tumor evolution of these two groups, and similar tumor growth rate and tumor growth ratio were observed in both cases (Table 1). In case of tumors treated with unloaded B-50-50 NP, a very significant difference ($p < 0.01$) was observed when compared with control and unloaded C-70-30 NP

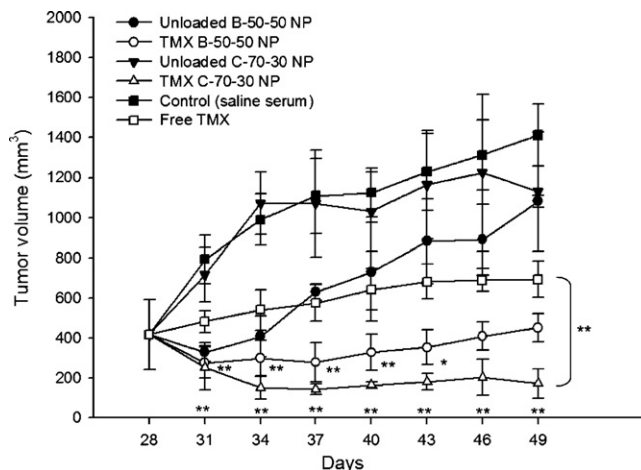


Fig. 1. Improved antitumor activity of TMX-loaded nanoparticles compared with that of free TMX, untreated and placebo nanoparticles in breast cancer xenograft mice. Data marked with * showed significant differences ($p < 0.05$) and those marked with ** showed very significant differences ($p < 0.01$).

treated group from Day 31 until Day 37 (Fig. 1). However, this initial significant difference disappeared from Day 40 until the end of the experiment, recovering a high growing rate and tumor growth ratio similar to control and unloaded C-70-30 NP groups (Table 1).

As regards to TMX treated groups, the antitumor activity of TMX-loaded nanoparticles treatment was higher than the observed with free TMX (Fig. 1). Lower tumor growth rates and lower tumor growth ratios (Table 1) were observed in case of mice treated with TMX-loaded nanoparticles, especially in case of TMX-loaded C-70-30 NP which showed the lowest values and very significant differences in the tumor evolution with the free TMX treated group during the whole treatment. In case of TMX-loaded B-50-50 NP, very significant and significant differences with the free TMX treated group were observed from Day 31 to Day 43. However, it seems that tumor volume values were closer to that of the free TMX treated group at the end of the experiment, and no significant differences were found between these groups in the last part of the treatment.

These results might indicate that the administration of TMX entrapped into these systems improved the antitumor activity of the drug, enhancing the efficacy of the treatment with TMX.

3.2. Tumor histology and immunohistochemistry studies

To further evidence the observed anticancer activity, the tumor tissues of mice either untreated or treated were subjected to histological observation, employing the toluidine blue (Fig. 2), the hematoxylin-eosin (Fig. 3), and the alcian blue hemalum picroindigo (Fig. S-1; Supplementary Pages) methods.

Table 1

Tumor growth rates during the treatment period and tumor growth ratios of different groups.

Tumor growth rate and tumor growth ratio		
Group of treatment	From Day 28 to Day 49 (V_2) (mm^3/day)	Ratio V_2/V_1^b
Control (saline serum)	35 (0.954) ^a	1.5
Unloaded B-50-50 NP	39 (0.975) ^a	1.6
Unloaded C-70-30 NP	35 (0.940) ^a	1.5
TMX-loaded B-50-50 NP	9 (0.933) ^a	0.4
TMX-loaded C-70-30 NP	6 (0.998) ^a	0.3
Free TMX	13 (0.949) ^a	0.5

^a Value in parenthesis is r^2 .

^b V_1 represents tumor growth rate before TMX treatment; $V_1 = 23 \text{ mm}^3/\text{day}$.

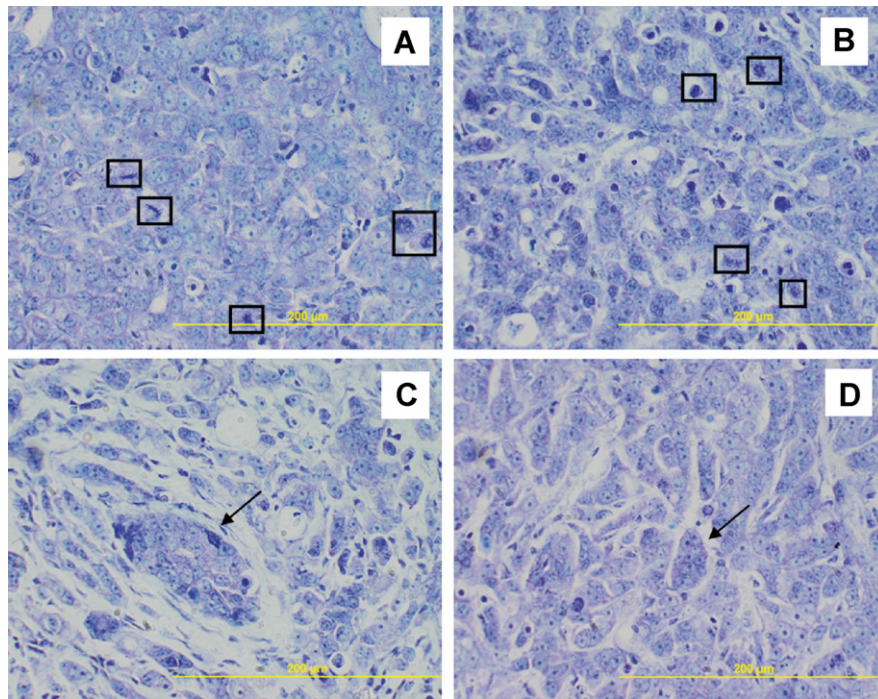


Fig. 2. Histological appearance of the epithelial-like cortex of MCF-7 cell untreated tumor (A), free TMX treated tumor (B), TMX-loaded C-70-30 NP treated tumor (C) and TMX-loaded B-50-50 NP treated tumor (D), using the toluidine blue staining method (magnification 40 \times). Boxes indicate the presence of cells in different stages of mitotic division, and arrows indicate the presence of syncytial structures. Yellow bars represent 200 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

As it can be observed in Fig. 2A, the epithelial-like cortex of the untreated tumors was composed of cells, mostly polyhedral in shape, with nuclei containing dispersed chromatin and prominent nucleoli, and arranged in solid masses with almost no intervening connective tissue septa. Mitoses were frequently seen. The

slightly basophilic character of the cytoplasm was better observed in Fig. 3A, where various mitoses were also observed and the low presence of connective tissue was confirmed. The same observation could be made when Fig. S-1A was analyzed, being this tumor the one whose connective tissue presence was almost insignificant,

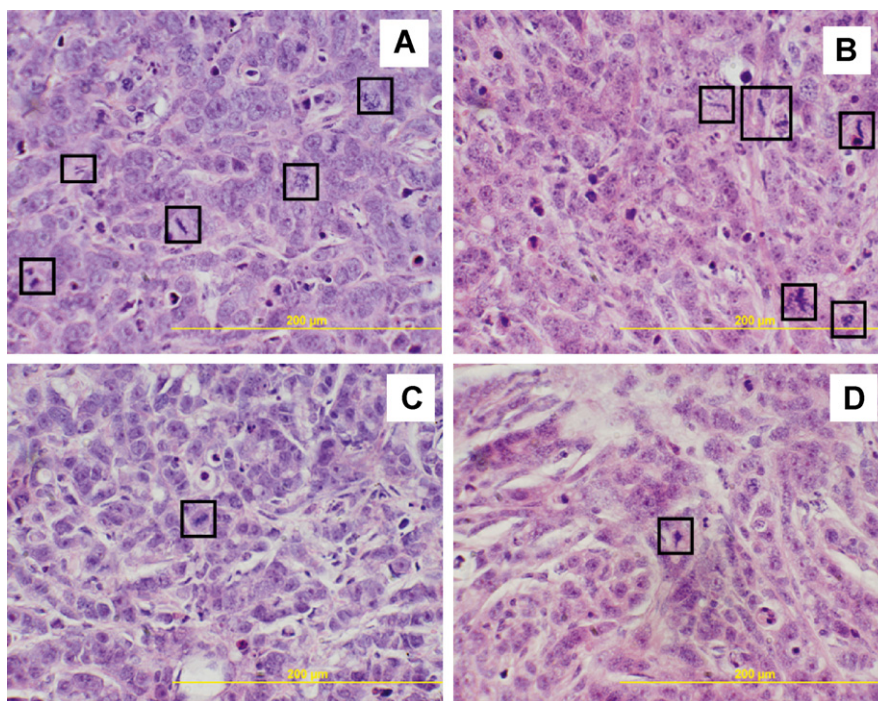


Fig. 3. Histological appearance of the epithelial-like cortex of MCF-7 cell untreated tumor (A), free TMX treated tumor (B), TMX-loaded C-70-30 NP treated tumor (C) and TMX-loaded B-50-50 NP treated tumor (D), using the hematoxylin-eosin staining method (magnification 40 \times). Boxes indicate the presence of cells in different stages of mitotic division. Yellow bars represent 200 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

with the lightest green color intensity. Images of epithelial-like cortex of tumors treated with unloaded nanoparticles, either B-50-50 NP or C-70-30 NP, were very similar to that obtained from the untreated group. Thus, the same conclusions were achieved (pictures not shown). Clear differences could be observed in the tumor cells of the epithelial-like cortex of TMX-loaded NP treated mice. First, a high disorganized tissue could be observed in Fig. 2C and D, but also in Fig. 3C and D and Fig S-1C and D. In some areas, cells formed syncytial structures, and a high cellular adhesion and cellular contraction could be observed (Fig. 2C and D). The tissue was more retracted, especially in case of tumors treated with TMX-loaded C-70-30 NP, which presented the most disorganized structure (Fig. 2C). Moreover, the absence or low presence of mitoses was appreciated, not only in Fig. 2 but also in Fig. 3C and D, where the disorganization of the tissue was easily observed. This disorganization was partially caused by the high presence of connective tissue, which can be easily observed in Fig. 3C and D, but especially in Fig S-1C and D. Again, tumors treated with TMX-loaded C-70-30 NP showed the most intense green color, indicating the presence of a lot of collagen fibers.

When free TMX treated tumor samples were analyzed, some differences with untreated tissues were found, such as more disorganized tissue areas (Figs. 2B and 3B) and higher presence of connective tissue (Fig. S-1B). However, these differences were more significant when TMX was administered entrapped into the nanoparticles. In addition, as it could be observed in Figs. 2B and 3B, the presence of frequent mitoses observed when TMX is free administered indicated a lower tumor inhibition efficacy of the drug. Thus, the entrapment of the drug into these polymeric systems might indicate an enhancement of the treatment efficacy since the structure of the tumor was more affected in these cases than that observed when TMX is administered alone.

Additionally, in order to differentiate proliferating cells remaining in the tumor tissue from dead cell populations, Ki-67 cell proliferation assay was carried out by immunohistochemical staining of the tumor sections. Two different methods were used to visualize the presence of Ki-67 antigen.

The first one was developed via a three-step staining procedure in combination with antimouse IgG biotinylated antibody, an avidin–biotin mixture and diaminobenzidine (light microscopy, Fig. 4). Positive cells should appear black stained due to the presence of the antigen. As it can be observed in Fig. 4B and D, samples of untreated and free tamoxifen treated tumors showed the most intense black color, especially the areas next to blood vessels. Tumors treated with placebo nanoparticles showed similar results to untreated samples (picture not shown). However, tumors treated with TMX-loaded nanoparticles (Fig. 4C), either B-50-50 or C-70-30, showed low presence of the antigen, since the intensity of the black color was very low, even in blood vessel surrounding sites. Thus, it seemed that there was a higher number of proliferating cells in case of untreated or free tamoxifen treated tumors than in case of TMX-loaded nanoparticles treated tumors. Consequently, the entrapment of the drug into the systems enhanced the antitumor activity of the drug.

The second method used a fluorescence dye for revealing the presence of the antigen (fluorescence microscopy, Fig. 5). As it is shown in Fig. 5, the highest fluorescent signals were obtained with tumors treated with tamoxifen (Fig. 5C and D), especially in the central area of the tumor section, where more blood vessels were located. Similar results were obtained in case of untreated and placebo treated tumors (pictures not shown). In contrast, very low fluorescent signal was observed in case of samples treated with both TMX-loaded nanoparticles (Fig. 5E and F), indicating a lower presence of the antigen in these tissues, even in the blood vessel surrounding area, and thus an enhanced efficacy of the drug, which

Table 2

Tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen concentrations in serum and tissues of nude mice after 21 days of treatment with 36 µg TMX administered free or entrapped into nanoparticles.

Group of treatment and tissues	TMX (ng/g)	4OH-TMX (ng/g)
<i>Free TMX</i>		
Plasma	7 ± 2 (ng/ml) [†]	–
Uterus and ovaries	125 ± 39 [†]	21 ± 6
Tumor	618 ± 76	–
<i>TMX-B-50-50 NP</i>		
Plasma	–	–
Uterus and ovaries	34 ± 18	16 ± 3
Tumor	776 ± 86	–
<i>TMX-C-70-30 NP</i>		
Plasma	–	–
Uterus and ovaries	15 ± 8	17 ± 4
Tumor	2191 ± 895 [†]	–

[†] Showed significant differences $p < 0.05$.

is in accordance with results obtained with the first immunohistochemical method.

3.3. Quantification of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen in plasma and tissues

Plasma and tissue samples from tumor, uterus and ovaries were treated in order to quantify the concentration of TMX and 4OH-TMX, and, consequently, to study possible differences between the drug biodistribution when TMX is free administered, or when it is entrapped into the systems before its administration.

Table 2 shows the concentration of TMX and 4OH-TMX in plasma and tissues of mice after 21 days of treatment with free TMX and TMX-loaded nanoparticles. As it can be observed, 4OH-TMX was only detected in uterus and ovaries samples, and no significant differences were found between treatments. In case of TMX, the highest concentration detected in uterus and ovaries was reached when TMX was free administered, showing significant differences with the levels determined when it is administered by nanoparticles. In case of plasma, TMX was only detected when the drug was free administered, and no detectable levels were found in case of using nanoparticles, showing significant differences too. And finally, in case of tumor samples, TMX was detected in all the cases but TMX levels in case of the treatment with TMX-C-70-30 NP were significantly higher. Thus, it seemed that TMX accumulation in not-targeted organs was significantly lower when it is administered using nanoparticles, which might reduce the possibility of developing undesirable side effects. However, the highest accumulation of drug in tumor was detected in case of using TMX-C-70-30 NP, which might enhance the effectiveness of the drug in tumor tissues.

4. Discussion

TMX is the most common clinical choice for the treatment of advanced or metastatic estrogen-dependent breast cancer, but its undesirable side effects and the limitation of the treatment only to the oral route, have contributed to the necessity of researching on new challenging therapies. In previous works (Martínez et al., 2011, 2012), the entrapment of TMX into nanoparticles based on mixtures of modified alginate and albumin showed good efficacy when they were used *in vitro* as controlled drug delivery systems, and their antitumor potential was tested *in vitro* against some carcinoma cell lines, obtaining hopeful results. Additionally, the presence of alginate in the nanoparticle composition seemed to be important for a higher cell internalization to be achieved, showing higher values of cell uptake and being more effective in reducing cell

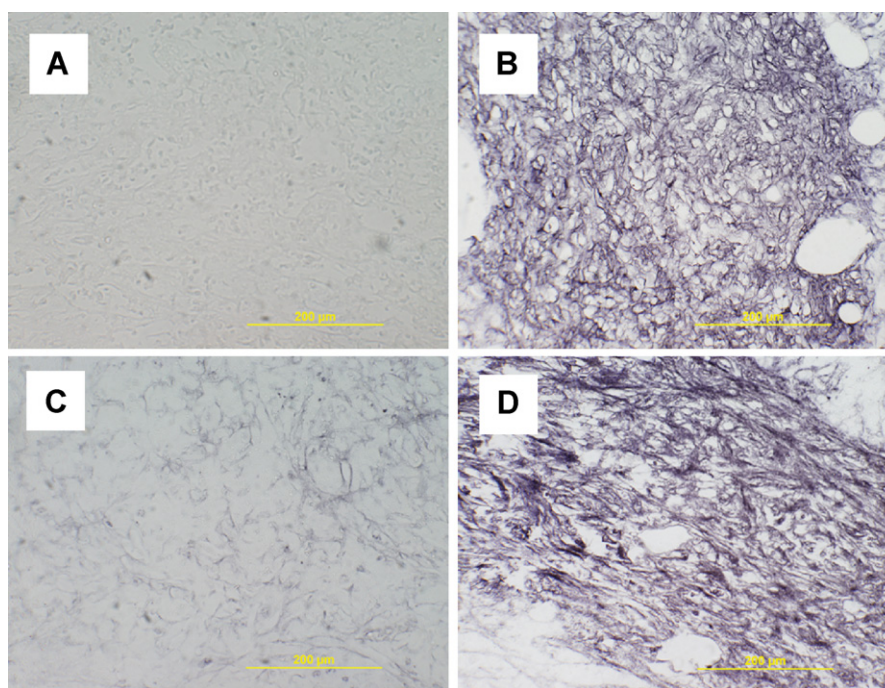


Fig. 4. Representative images of the immunohistochemical detection of Ki-67 antigen in MCF-7 xenograft tumor samples using a three-step staining procedure in combination with antimouse IgG biotinylated antibody, an avidin–biotin mixture and diaminobenzidine (magnification 40 \times): negative control (A), untreated group (B), TMX-B-50-50 NP treated group (C) and free TMX treated group (D). Yellow bars represent 200 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

viability of these tumor cells. Consequently, the evaluation of these alginate–albumin based systems in a tumor xenograft model was considered necessary and useful in order to test their *in vivo* efficacy and to evaluate their potential use as a possible alternative of drug administration.

The development and growth of MCF-7 tumor xenograft in immunodeficient mice was carried out in the presence of 17- β -estradiol, since previous studies demonstrated that the growth of MCF-7 tumors was dependent upon the dose of 17- β -estradiol administered subcutaneously (Osborne et al., 1985). These studies, as well as other *in vitro* investigations of breast cancer cell cultures (Kyprianou et al., 1991) indicated that TMX acts more as a cytostatic agent than a cytotoxic agent. Consequently, antiestrogen treatment with TMX normally results in cessation of tumor growth and following tumor regression. During this study, tumor evolution was reduced in the three groups of mice treated with TMX, either administered free or entrapped into nanoparticles (Fig. 1). However, very significant lower values of tumor volume and tumor growth rate (Table 1) were obtained when TMX was administered into nanoparticles than when it was free administered, showing a higher antitumor efficacy. Moreover, the antitumor activity of the free drug was only comparable to that of nanoparticles in the last days of the treatment. Other studies (Haran et al., 1994), where TMX was free administered using a subcutaneous pellet of drug, reported significant inhibition of tumor growth as well as significant tumor regression mostly after two weeks of treatment with TMX, confirming the results obtained in the present study. Thus, tumor inhibition was observed earlier in case of the administration of TMX entrapped into nanoparticles, probably due to the increased half-life and the passive targeting mediated by the polymeric nanoparticles. This would be in accordance with previous studies that showed the internalization of these systems into tumor cells, such as MCF-7 cells (Martínez et al., 2012). Moreover, recent studies with other anticancer drugs have demonstrated similar results with an enhancement in the treatment efficacy when these

drugs were administered entrapped into polymeric nanoparticles (Arias et al., 2011; Graeser et al., 2010; Kim et al., 2012).

The enhanced antitumor activity of TMX-loaded nanoparticles observed in the analysis of tumor evolution was later confirmed by histological and immunohistochemical studies. Histological studies of tumors treated with TMX-nanoparticles have shown more structural disorganization, due to a high presence of connective tissue, and less mitotic cells than when TMX was free administered, especially in case of TMX-C-70-30 NP. Arias et al. (2011), who observed the enhanced efficacy of the anticancer drug gemcitabine entrapped into a polymeric system, analyzed differences at cell structural level comparatively when the drug was free administered in order to study the efficacy of the systems; Bani et al. (1999) also observed differences in structural features of relaxin-treated and not treated tumor tissues using similar histological staining methods. In both cases, the high presence of connective tissue as well as low density of mitotic cells, were considered signs of tumor remission. Thus, similar conclusions could be extracted from the comparatively used of TMX when it was entrapped into these nanoparticles, resulting in an improved tumor-activity of the drug and, consequently, a higher tumor regression. Despite histological studies revealed the presence of less proliferating cells in tissues treated with TMX-nanoparticles, the quantification of the Ki-67 antigen in tumor tissues was carried out in order to confirm these observations. Previous studies have reported the important prognostic value of proliferation index by Ki-67 immunohistochemistry, especially in breast cancer (Liu et al., 2001). A low proliferation index is related with a higher antitumor efficacy of the treatment. It has been reported in previous studies (Li et al., 2009) that free administered tamoxifen had no effect on proliferation index after 7 days of treatment with 5 mg, 60-day release TMX pellets, and a reduction in proliferation index was detected only after 14 days of treatment. Since the amount of free TMX administered in this study was lower, it might be logical that untreated, placebo and free TMX treated resulted in similar presence of proliferating cells. However,

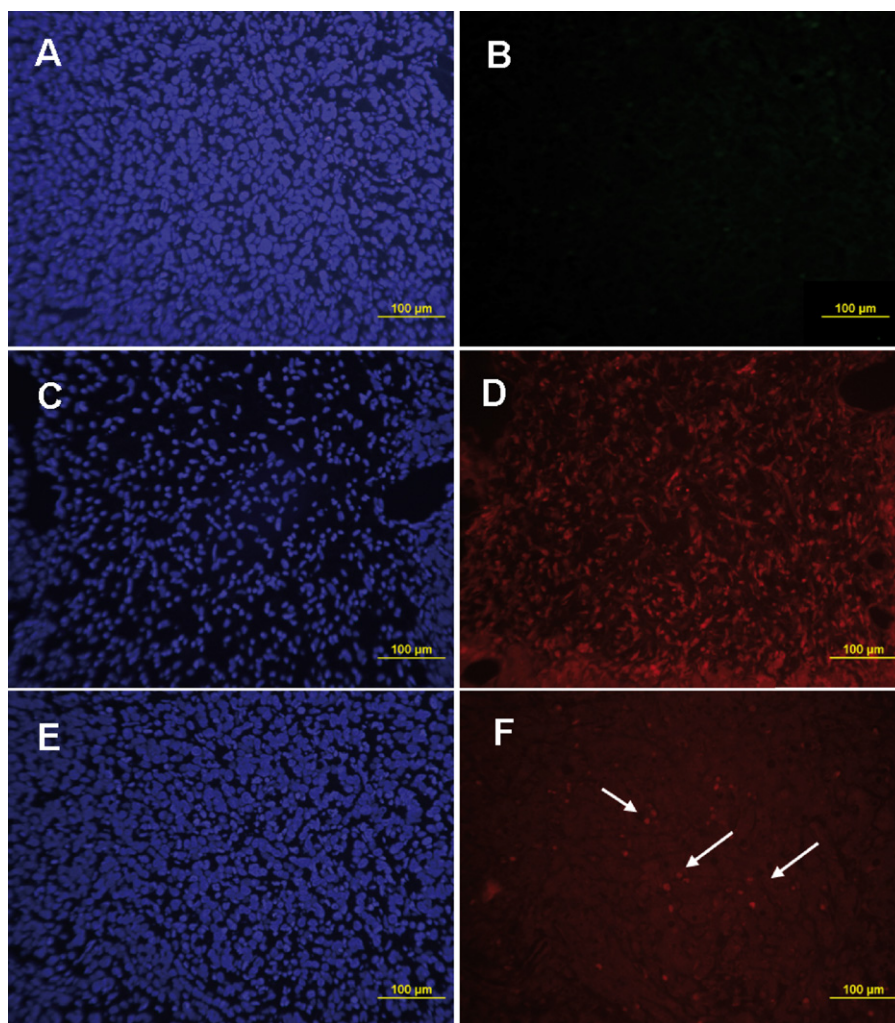


Fig. 5. Representative images of the immunohistochemical detection of Ki-67 antigen in MCF-7 xenograft tumor samples using the fluorescent method: negative control (A and B), free TMX treated tumor tissues (C and D) and TMX-NP-C-70-30 treated tumor tissues (E and F). In blue is represented the nuclear staining with DAPI. In red, the nuclear fluorescent signal due to the presence of Ki-67 proliferating antigen. Arrows indicate the presence of some Ki-67 positive nuclei in tumor tissue treated with TMX-loaded NP. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

when TMX was administered using nanoparticles, a low presence of proliferating cells was observed even in blood vessels surrounding areas. Fluorescent and colorimetric method showed the same results. Thus, it might confirm the enhanced antitumor activity of the treatment with TMX-loaded nanoparticles.

Finally, the concentration of TMX in tumor, plasma, uterus and ovaries samples was studied in order to analyze possible differences between the administration of free TMX or TMX-loaded nanoparticles. Biologic effects of TMX, such as saturation of tumor estrogen receptors and growth inhibition, have been observed in previous studies (Osborne et al., 1985) with s.c. doses producing undetectable serum levels of TMX. Thus, it is interesting to consider if low doses of TMX can provide a tumor TMX concentration sufficient to antagonize the effects of residual estrogen and to produce tumor growth inhibition. TMX administered by nanoparticles showed no detectable levels in plasma and detectable levels in tumor tissues, which were sufficient to inhibit tumor growth. It has been shown that TMX-C-70-30 NP presented the highest antitumor activity when tumor growth and tumor tissue structure were analysed. Moreover, they showed the highest TMX concentration in tumor sample. This study is in accordance with the results of previous studies (DeGregorio et al., 1989) where tumor tamoxifen levels were detected at low s.c. doses despite undetectable serum TMX

levels were observed. In contrast, when TMX was free administered, detectable levels of TMX were found either in tumor and plasma samples, but the efficacy of this treatment was found to be lower. Furthermore, plasma levels of TMX are directly related with the drug distribution to other not-targeted organs and the undesirable side effects which could derive from this non specific distribution. Thus, levels of TMX were determined in uterus and ovaries since TMX treatment increases the possibility of developing an endometrial carcinoma among other side effects (Cohen, 2004; Gao et al., 2011). Levels of TMX in uterus and ovaries were almost 4 and 8 times significantly lower when TMX was administered using nanoparticles than when it was free administered. Taking into account these results, TMX-loaded nanoparticles might produce less undesirable effects in this tissue. Levels of 4OH-TMX were also measured in order to study TMX metabolism. In this study, 4OH-TMX was only detected in uterus and ovaries either administering TMX free or by nanoparticles, and no significant differences were found between these data. In this study, 4OH-TMX levels were lower than TMX levels, which is in accordance with previous studies where TMX was subcutaneously administered in nude mice (Robinson et al., 1989). In contrast, when TMX is orally administered, higher levels of 4OH-TMX are found when compared with those of TMX due to the first-pass metabolism in the liver

which is circumvented when s.c. route is used (Kisanga et al., 2003). The absence or low levels of this metabolite have been reported to be characteristic of the metabolite profile produced by sustained release preparations, which confirm the good controlled release profile of the TMX-loaded systems.

In conclusion, this study demonstrates the *in vivo* promising anti-cancer efficacy of these new TMX-loaded nanoparticles for breast cancer, especially the composition TMX-C-70-30 NP which allowed the lowest tumor growth rate and the highest TMX concentration into tumor tissue to be achieved. Further studies need to be done before the application of these formulations for cancer patients.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Jesús López (Cellular Biology Department from Faculty of Biologics, Universidad Complutense de Madrid) for his technical assistance and useful help in the immunohistochemical study development, and to Dr. von Kobbe (Chimera Pharma of Bionostra Group) for the gift of MCF7 cells. The financial support of the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (FIS PS09/01513 and MAT2010-21509-C03-03), Universidad Complutense de Madrid (UCM) Grupos UCM (920613), and the FPI grant from UCM to A. Martínez are gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.045>.

References

- Ameller, T., Legrand, P., Marsaud, V., Renoir, J.M., 2004. Drug delivery systems for oestrogenic hormones and antagonists: the need for selective targeting in estradiol-dependent cancers. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 92, 1–18.
- Arias, J.L., Reddy, L.H., Couvreur, P., 2009. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *J. Drug Target* 17, 586–598.
- Arias, J.L., Reddy, L.H., Couvreur, P., 2011. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules* 12, 97–104.
- Bani, D., Flagiello, D., Poupon, M.F., Nistri, S., Poirson-Bichat, F., Bigazzi, M., Bani Sacchi, T., 1999. Relaxin promotes differentiation of human breast cancer cells MCF-7 transplanted into nude mice. *Virchows Arch.* 435, 509–519.
- Behrens, D., Gill, J.H., Fichtner, I., 2007. Loss of tumorigenicity of stably ERbeta-transfected MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 274, 19–29.
- Cavalli, R., Bisazza, A., Bussano, R., Trotta, M., Civra, A., Lembo, D., Ranucci, E., Ferruti, P., 2011. Poly(amidoamine)-cholesterol conjugate nanoparticles obtained by electrospraying as novel tamoxifen delivery system. *J. Drug Deliv.*, 587604.
- Cohen, I., 2004. Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. *Gynecol. Oncol.* 94, 256–266.
- Davis, M.E., Chen, Z.G., Shin, D.M., 2008. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 771–782.
- DeGregorio, M.W., Coronado, E., Osborne, C.K., 1989. Tumor and serum tamoxifen concentrations in the athymic nude mouse. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 23, 68–70.
- Galvin, P., Thompson, D., Ryan, K.B., McCarthy, A., Moore, A.C., Burke, C.S., Dyson, M., Maccraith, B.D., Gun'ko, Y.K., Byrne, M.T., Volkov, Y., Keely, C., Keehan, E., Howe, M., Duffy, C., MacLoughlin, R., 2012. Nanoparticle-based drug delivery: case studies for cancer and cardiovascular applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 389–404.
- Gao, W.L., Zhang, L.P., Feng, L.M., 2011. Comparative study of transvaginal ultrasonographic and diagnostic hysteroscopic findings in postmenopausal breast cancer patients treated with tamoxifen. *Chin. Med. J. (Engl.)* 124, 2335–2339.
- Graeser, R., Esser, N., Unger, H., Fichtner, I., Zhu, A., Unger, C., Kratz, F., 2010. INNO-206 the (6-maleimidocaproyl) hydrazone derivative of doxorubicin, shows superior antitumor efficacy compared to doxorubicin in different tumor xenograft models and in an orthotopic pancreas carcinoma model. *Invest. New Drugs* 28, 14–19.
- Haran, E.F., Marezek, A.F., Goldberg, I., Horowitz, A., Degani, H., 1994. Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth. *Cancer Res.* 54, 5511–5514.
- Humason, G.L., 1979. *Animal Tissue Techniques*, 4th ed. W.H. Freeman, New York.
- Karmali, P.P., Kotamraju, V.R., Kastantin, M., Black, M., Missirlis, D., Tirrell, M., Ruoslahti, E., 2009. Targeting of albumin-embedded paclitaxel nanoparticles to tumors. *Nanomedicine* 5, 73–82.
- Kim, C.E., Lim, S.K., Kim, J.S., 2012. *In vivo* antitumor effect of cromolyn in PEGylated liposomes for pancreatic cancer. *J. Control. Release* 157, 190–195.
- Kisanga, E.R., Gjerde, J., Schjott, J., Mellgren, G., Lien, E.A., 2003. Tamoxifen administration and metabolism in nude mice and nude rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84, 361–367.
- Kyprianou, N., English, H.F., Davidson, N.E., Isaacs, J.T., 1991. Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer Res.* 51, 162–166.
- Li, Z., Carrier, L., Belame, A., Thiagarajah, A., Salvo, V.A., Burow, M.E., Rowan, B.G., 2009. Combination of methylselenocysteine with tamoxifen inhibits MCF-7 breast cancer xenografts in nude mice through elevated apoptosis and reduced angiogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 118, 33–43.
- Liu, S., Edgerton, S.M., Moore 2nd, D.H., Thor, A.D., 2001. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 1716–1723.
- Martínez, A., Benito-Miguel, M., Iglesias, I., Teijón, J.M., Blanco, M.D., 2012. Tamoxifen-loaded thiolated alginate-albumin nanoparticles as antitumoral drug delivery systems. *J. Biomed. Mater. Res. A* 100A, 1467–1476.
- Martínez, A., Iglesias, I., Lozano, R., Teijón, J.M., Blanco, M.D., 2011. Synthesis and characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds evaluation as drug delivery systems. *Carbohydr. Polym.* 83, 1311–1321.
- Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C., 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* 19, 311–330.
- Osborne, C.K., Hobbs, K., Clark, G.M., 1985. Effect of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Res.* 45, 584–590.
- Park, J.H., von Maltzahn, G., Xu, M.J., Fogal, V., Kotamraju, V.R., Ruoslahti, E., Bhatia, S.N., Sailor, M.J., 2010. Cooperative nanomaterial system to sensitize target, and treat tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 981–986.
- Patel, V.R., Amiji, M.M., 1996. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. *Pharm. Res.* 13, 588–593.
- Robinson, S.P., Langan-Fahey, S.M., Jordan, V.C., 1989. Implications of tamoxifen metabolism in the athymic mouse for the study of antitumor effects upon human breast cancer xenografts. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 25, 1769–1776.
- Sarmah, J.K., Mahanta, R., Bhattacharjee, S.K., Biswas, A., 2011. Controlled release of tamoxifen citrate encapsulated in cross-linked guar gum nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 49, 390–396.
- World Health Organization, 2012. *Cancer. Fact sheet. 297*. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en>.

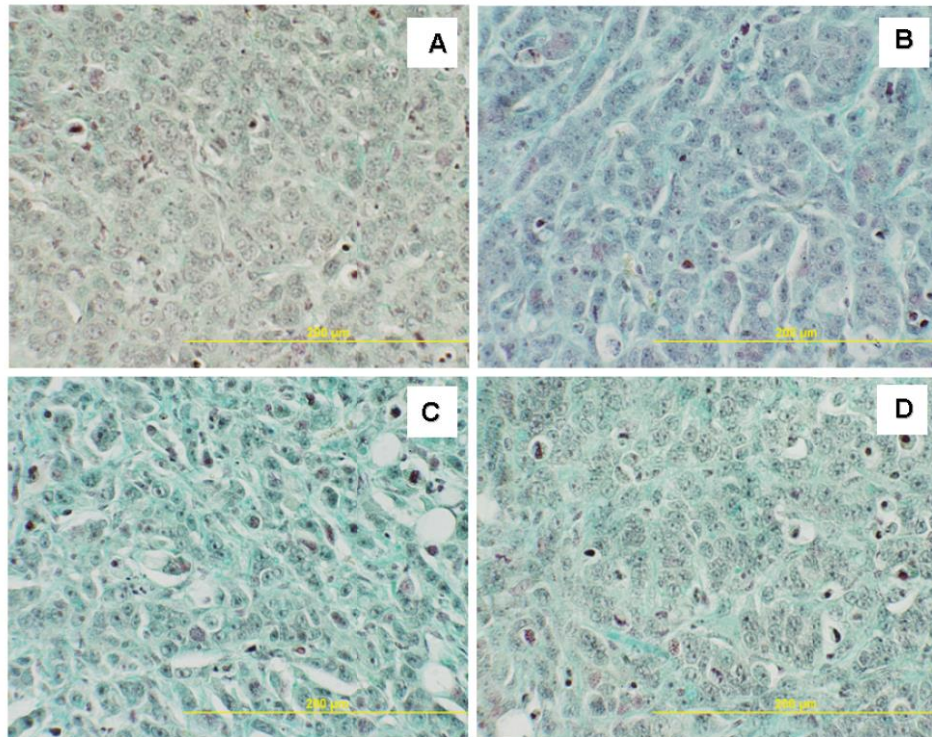


Fig. S-1. Histological appearance of the epithelial-like cortex of MCF-7 cell untreated tumor (A), free TMX treated tumor (B), TMX-loaded C-70-30 NP treated tumor (C) and TMX-loaded B-50-50 NP treated tumor (D), using the alcian blue hemalum picro-indigo staining method (magnification 40X). Yellow bars represent 200 µm.

4. Nanopartículas basadas en albúmina y mezclas albúmina/alginate funcionalizadas con ácido fólico como sistemas de liberación controlada de tamoxifeno. Síntesis y caracterización *in vitro*.

[Folate-targeted nanoparticles based on albumin and albumin/alginate mixtures as controlled release systems of tamoxifen. Synthesis and *in vitro* characterization. A. Martínez, R. Olmo, I. Iglesias, J.M. Teijón and M.D. Blanco. *Pharmaceutical Research* DOI 10.1007/s11095-013-1151-z (2013)].

Objetivo:

El objetivo de este trabajo fue la funcionalización de las nanopartículas basadas en alginato tiolado y albúmina modificada mediante la unión de ácido fólico a la superficie de la nanopartícula con el objetivo de vectorizar la terapia con tamoxifeno en el cáncer de mama. Se llevó a cabo la funcionalización de las nanopartículas y su caracterización *in vitro*, incluyendo la realización de ensayos en cultivos celulares frente a diferentes líneas celulares tumorales positivas en la expresión de receptores de folato.

Metodología:

En primer lugar se llevó a cabo la síntesis por coacervación de las nanopartículas compuestas por BSA-SH (BSA-SH NP) así como por mezclas 50/50 (p/p) y 70/30 (p/p) de ALG-CYS/BSA-SH (B-50-50 NP y C-70-30 NP) siguiendo la metodología descrita en trabajos anteriores.

A continuación se realizó la funcionalización de las nanopartículas con ácido fólico. La unión con el ácido fólico se produjo a través de los grupos amino libres de la proteína. Para ello, se obtuvo en primer lugar un éster del ácido fólico (NHS-folato) siguiendo la metodología descrita en el trabajo. Posteriormente, una disolución de dicho éster se añadió a la suspensión de nanopartículas, y se mantuvo en agitación para favorecer la incorporación del ácido fólico a los grupos amino de la albúmina. Finalmente la suspensión se centrifugó para recuperar las nanopartículas funcionalizadas (B-50-50-FOL, C-70-30-FOL and

BSA-SH-FOL NP) que, tras varios lavados para retirar el exceso de ácido fólico libre, se liofilizaron.

Tras la funcionalización con ácido fólico se procedió a la valoración de la cantidad de folato unido a las nanopartículas. Para ello se realizó un análisis espectrofotométrico tras una digestión enzimática de las nanopartículas, lo que permitió determinar la cantidad de ácido fólico unido por gramo de nanopartícula.

Una vez funcionalizadas, se incluyó el tamoxifeno por incubación de las nanopartículas liofilizadas en una solución etanólica del mismo durante 12 h, siguiendo el protocolo ya empleado en estudios previos.

A continuación se procedió a la caracterización *in vitro* de las nanopartículas. En primer lugar, se estudió su morfología y tamaño a través de microscopía electrónica de barrido (SEM). Además, se llevó a cabo el estudio de tamaño medio, distribución de tamaño y potencial zeta de las partículas mediante la difusión de la luz cuasielástica.

Para determinar la cantidad de fármaco incorporada a los sistemas se realizó la degradación enzimática de las nanopartículas mediante tripsinización, seguida de la posterior extracción del fármaco mediante disolventes orgánicos. Para estudiar la intensidad de las interacciones entre el fármaco y los sistemas se llevó a cabo una extracción directa del fármaco con metanol. En ambos casos se siguió la metodología descrita en trabajos anteriores. Todas las muestras procedentes de estos estudios fueron procesadas mediante HPLC.

Los estudios de liberación del fármaco se llevaron a cabo en PBS con 0,5% SDS a 37°C y agitación orbital. Las muestras recogidas a diferentes tiempos se procesaron mediante HPLC.

Para los ensayos en cultivos celulares se seleccionaron tres líneas celulares diferentes: células MCF-7 y T47D, de cáncer de mama humano y positivas en la

expresión de receptores de estrógenos; y células HeLa, de cáncer de ovario humano y negativas en la expresión de receptores de estrógenos.

Tanto las células HeLa como las T47D han sido descritas en la literatura como positivas en la expresión de receptores de folato. Sin embargo, en el caso de las MCF-7 se comprobó que existía cierta controversia respecto a la expresión de este receptor, por lo que se procedió a realizar una titulación del receptor de ácido fólico en las tres líneas celulares empleando un anticuerpo específico frente a este receptor y mediante citometría de flujo.

Tras la titulación de receptores, se llevaron a cabo los ensayos de cuantificación de la internalización de las nanopartículas y los de viabilidad celular.

El estudio de la internalización de los sistemas en ambas líneas celulares se llevó a cabo de forma cuantitativa y cualitativa. Para ello, se prepararon nanopartículas cargadas con un fluoróforo (6-cumarina) de forma que pudiera realizarse la determinación a través de la señal de fluorescencia emitida por los sistemas internalizados, como ya se realizó en estudios anteriores. La determinación cuantitativa de la internalización de los sistemas se valoró tras la incubación de las nanopartículas con cumarina a diferentes tiempos (2 y 24 h), un lavado posterior para eliminar el exceso de los sistemas no internalizados, la lisis de las células y la cuantificación de la señal fluorescente emitida tras la misma, siguiendo el protocolo ya empleado en un trabajo previo. Este estudio se llevó a cabo tanto con los sistemas funcionalizados con ácido fólico como con los no vectorizados para poder establecer una comparación entre ellos. Además, se realizó un ensayo competitivo en presencia de ácido fólico en el medio con el objetivo de estudiar la implicación del receptor de ácido fólico en la internalización de los sistemas. En el caso de la determinación cualitativa, se fotografiaron las células con un microscopio de fluorescencia tras el lavado del excedente de nanopartículas no internalizadas.

El ensayo de viabilidad celular se realizó tanto con las nanopartículas sin fármaco, para el estudio de la citocompatibilidad de los sistemas, como con los sistemas cargados con tamoxifeno, para la evaluación de la actividad citotóxica de los mismos. Se seleccionó la concentración 10 μM de tamoxifeno, y después de 1, 2, 3, 6, y 9 días de incubación con el fármaco y las nanopartículas se llevó a cabo la evaluación de la viabilidad celular mediante el método del MTT.

Resultados:

Tras la reacción de funcionalización con el ácido fólico, se cuantificó la cantidad de folato unido a las nanopartículas. Se empleó un método espectrofotométrico que dio como resultado los siguientes valores: 170 ± 13 , 143 ± 25 y 79 ± 29 μmol folato/g NP para las nanopartículas BSA-SH-FOL NP, B-50-50-FOL NP y C-70-30-FOL NP, respectivamente. La cantidad de ácido fólico unido al sistema C-70-30-FOL NP fue significativamente menor que el unido a las nanopartículas BSA-SH-FOL NP y B-50-50-FOL NP.

La morfología de las nanopartículas BSA-SH-FOL NP, B-50-50-FOL NP y C-70-30-FOL NP se analizó mediante SEM, obteniéndose las imágenes que se muestran en la Figura 1. En todos los casos se obtuvieron partículas nanométricas individualizadas, con cierta tendencia esférica y una superficie no porosa y aparentemente lisa.

El tamaño medio se estudió mediante difusión de la luz cuasielástica y se obtuvieron los siguientes valores: 350, 68 y 98 nm para los sistemas BSASH-FOL NP, B-50-50-FOL NP y C-70-30-FOL NP, respectivamente (Figura S-1 del material suplementario). Las nanopartículas cargadas con tamoxifeno TMX-BSA-SH-FOL NP, TMX-B-50-50-FOL NP y TMX-C-70-30-FOL mostraron un diámetro medio de 417, 76 and 104 nm, respectivamente (Figura S-1).

Así mismo, el estudio de potencial zeta de las nanopartículas sin fármaco BSA-SH-FOL NP, B-50-50-FOL NP y C-70-30-FOL NP dio valores de -10 ± 4 , $-23,4 \pm 0,6$ y -43 ± 3 mV, respectivamente. En el caso de los sistemas cargados con

tamoxifeno TMX-BSA-SH-FOL NP, TMX-B-50-50-FOL NP y TMX-C-70-30-FOL NP se obtuvieron valores de 5 ± 2 , 42 ± 2 y 32 ± 6 mV, respectivamente.

Tras la determinación del tamaño y potencial zeta de las nanopartículas se procedió a cuantificar la cantidad de fármaco incluido en los sistemas. Tras la degradación enzimática de las nanopartículas y la posterior extracción del fármaco, se determinaron los siguientes valores de carga de tamoxifeno en los sistemas: $4,9 \pm 0,5$, $4,2 \pm 0,3$ and $7,7 \pm 0,8$ $\mu\text{g TMX/mg NP}$ para las nanopartículas TMX-BSA-SH-FOL NP, TMX-B-50-50-FOL NP y TMX-C-70-30-FOL NP, respectivamente. Por tanto, las nanopartículas TMX-C-70-30-FOL NP incluyeron significativamente más fármaco que los sistemas TMX-B-50-50-FOL NP y TMX-BSA-SH-FOL NP, que obtuvieron valores similares de carga.

En cuanto a la extracción con metanol, en el caso de las nanopartículas TMX-BSA-SH-FOL NP, TMX-B-50-50-FOL NP y TMX-C-70-30-FOL NP se obtuvieron valores de $1,9 \pm 0,3$, $4,1 \pm 0,5$ y $6,1 \pm 0,7$ $\mu\text{g TMX extraído/mg NP}$, respectivamente. De acuerdo a estos valores, la única composición que aún conservaba fármaco incluido en su estructura tras la extracción con este disolvente orgánico fue la formada por BSA-SH, de la cual sólo se pudo extraer un 38% del fármaco incluido mediante este método, mientras que en las nanopartículas compuestas por proteína y polisacárido la extracción fue completa.

Se estudió la liberación del fármaco desde los sistemas, y las curvas de liberación obtenidas en presencia del surfactante SDS en el medio de liberación se representaron en la Figura 2. Los valores de liberación máxima se recogieron en la Tabla 1. Se produjo la liberación completa del tamoxifeno en todos los casos al no existir diferencias significativas entre los máximos de liberación y los valores de carga del fármaco obtenidos mediante degradación enzimática. La liberación se llevó a cabo en dos fases: una primera fase rápida de 3 h, 2 h y 1,5 h, en la que se liberó el 39%, 36% and 62% de tamoxifeno desde los sistemas TMX-BSA-SH-FOL NP, TMX-B-50-50-FOL NP y TMX-C-70-30-FOL NP, respectivamente; tras

esta primera fase, se produjo una segunda más lenta donde se pudo cuantificar la velocidad con la que el fármaco se liberaba. Los valores de velocidad de liberación del fármaco se recogieron en la Tabla 1.

A continuación, se llevó a cabo la evaluación de los sistemas frente a diferentes líneas tumorales: MCF-7, T47D y HeLa. Para ello, lo primero que se realizó fue la cuantificación de la presencia de receptores de folato en las tres líneas celulares a través de citometría de flujo empleando un marcaje fluorescente específico de estos receptores (Figura 3). Se obtuvieron índices de fluorescencia (FI) de 8,9, 7,7 y 24,9 para las células MCF-7, T47D y HeLa, respectivamente. Es decir, las tres líneas resultaron positivas en la expresión de receptores de folato aunque las células HeLa mostraron una expresión mucho mayor que las MCF-7 y T47D, que expresaban de forma similar.

Se evaluó de forma cuantitativa y cualitativa la internalización de los sistemas a 2 h y 24 h por las tres líneas celulares, tanto los funcionalizados con ácido fólico como sin funcionalizar. Los resultados se recogieron en la Figura 4. La presencia de las nanopartículas pudo apreciarse mediante la presencia de zonas con elevada fluorescencia verde en las imágenes obtenidas por microscopía, como se aprecia en la Figura 4.

En cuanto a la determinación cuantitativa, se observó la internalización de todos los sistemas, incluyendo los no funcionalizados. Sin embargo, en el caso de las nanopartículas B-50-50-FOL NP y BSA-SH-FOL NP se apreció un aumento significativo en su internalización cuando fueron funcionalizados con ácido fólico respecto a su composición no vectorizada. En cambio, las nanopartículas C-70-30-FOL NP no demostraron una mejor captación celular que sus análogas no funcionalizadas. El sistema B-50-50-FOL NP fue altamente internalizado de forma general en las tres líneas celulares, mientras que la captación del sistema BSA-SH-FOL NP fue significativamente más alta en las células HeLa.

La realización del ensayo competitivo en presencia del ácido fólico se llevó a cabo con el objetivo de determinar si el receptor de ácido fólico era el responsable

del aumento de la internalización de los sistemas B-50-50-FOL NP y BSA-SH-FOL NP. Esta implicación fue claramente determinada en el caso de las BSA-SH-FOL NP en las tres líneas celulares (Figura 4C, 4F y 4I) y de las nanopartículas B-50-50-FOL NP en las T47D (Figura 4G), ya que la presencia de ácido fólico en el medio disminuyó de forma significativa la cantidad de nanopartículas internalizadas a las 2 h de estos sistemas. Sin embargo, la internalización de los sistemas B-50-50-FOL NP en las células MCF-7 y HeLa no pudo atribuirse exclusivamente al papel del receptor de ácido fólico, ya que no se detectaron diferencias significativas entre la captación en presencia y ausencia del ácido fólico en el medio (Figura 4A y 4D).

Los estudios de citocompatibilidad realizados con las nanopartículas sin fármaco permitieron concluir que en general las nanopartículas basadas en las mezclas albúmina/polisacárido eran citocompatibles en las líneas celulares MCF-7 y T47D. Sin embargo, se detectaron valores más bajos de viabilidad celular en el caso de las nanopartículas BSA-SH-FOL NP desde el primer día de incubación en las tres líneas celulares, y en el caso de las nanopartículas B-50-50-FOL NP y C-70-30-FOL NP en la línea celular HeLa.

Finalmente, los resultados de los ensayos de viabilidad celular llevados a cabo con las nanopartículas cargadas con tamoxifeno se reflejan en la Figura 5. Cuando el fármaco y los sistemas se administraron a la concentración 10 μ M se apreciaron diferencias entre los sistemas cargados con tamoxifeno y la disolución del fármaco, observándose una disminución más gradual de la viabilidad al administrar las nanopartículas que la obtenida con el fármaco en disolución. Estas diferencias fueron evidentes desde el primer día en el caso de las células HeLa y T47D, y desde el tercer día en el caso de las MCF-7.

Folate-Targeted Nanoparticles Based on Albumin and Albumin/Alginate Mixtures as Controlled Release Systems of Tamoxifen: Synthesis and *In Vitro* Characterization

A. Martínez · R. Olmo · I. Iglesias · J. M. Teijón · M. D. Blanco

Received: 26 February 2013 / Accepted: 16 July 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

ABSTRACT

Purpose Preparation and *in vitro* characterization of tamoxifen (TMX)-loaded folate-targeted nanoparticles based on disulfide bond reduced bovine serum albumin (BSA-SH) and BSA-SH/alginate-cysteine (BSA-SH/ALG-CYS) mixtures as drug delivery systems.

Methods Folate-nanoparticles were characterized in terms of folate content, morphology, size, zeta potential, TMX load and drug release kinetics. Additionally, cell viability and cellular uptake of nanoparticles were determined using different cancer cell lines.

Results Folic acid (FOL) was successfully attached to nanoparticles (ranging between 79 and 170 μmol folate/g NP). Nanoparticles with 76–417 nm mean size were obtained and loaded with TMX (4.2–7.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ NP). Zeta potential and drug extraction revealed major superficial placement of the drug, especially in the case of BSA/ALG-FOL systems. Drug release studies in the presence of surfactant showed a gradual release of the drug between 4–7 h. In general, low cytotoxicity of unloaded systems was found. Internalization of the systems was achieved and mediated by folate receptor, especially in the case of BSA NP-FOL. The administration of 10 μM TMX by TMX-FOL NP showed their efficacy as controlled TMX release systems.

Conclusions Promising anticancer action of these new TMX-loaded folate-targeted systems was demonstrated, allowing a new administration route to be studied in further *in vivo* studies in order to improve current TMX therapy.

KEY WORDS folic acid · nanoparticles · natural polymers · tamoxifen · targeted therapy

ABBREVIATIONS

ALG-CYS	Alginate-cysteine conjugate
ANOVA	One way analysis of variance
B-50-50 NP	Nanoparticles based on 50% ALG-CYS and 50% BSA-SH
BSA	Bovine serum albumin
BSA-SH	Disulfide bond reduced bovine serum albumin
BSA-SH NP	Nanoparticles based on 100% BSA-SH
C-70-30 NP	Nanoparticles based on 70% ALG-CYS and 30% BSA-SH
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DMSO	Dimethyl sulphoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
FOL	Folic acid
KCl	Potassium chloride
MTT	Methylthiazolotetrazolium
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
NP	Nanoparticles
PBS	Phosphate buffered saline
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TMX	Tamoxifen

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11095-013-1151-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Martínez · I. Iglesias
Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

R. Olmo · J. M. Teijón · M. D. Blanco (✉)
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid, Avenida Complutense s/n 28040
Madrid, Spain
e-mail: mdblanco@med.ucm.es

INTRODUCTION

Recent advances in medicine and health care have significantly improved human life expectancy. Consequently, diseases associated with the elderly, such as cancer, have greatly increased over the past few years. Cancer has been set to become a major cause of morbidity and mortality in coming

decades, the number of new cancer cases being estimated at 20 million by 2013 (1). Thus, there is an increasing need to develop new therapeutic agents, which could be used either singly or combined with conventional therapies, and which would cause less toxicity and provide a better quality of life to patients.

Nanomedicine is the branch of nanotechnology that applies the emerging properties of materials on a nanoscale to achieve faster diagnosis, improved imaging, enhanced therapeutics and prevention of various clinical conditions (2). The technology has been especially focused in cancer treatment and diagnosis to overcome the lack of specificity and resistance developed to conventional chemotherapeutic agents (3).

Nanoparticle-based drug-delivery systems have made a remarkable difference to controlled drug delivery of chemotherapeutic agents during the last two decades. Their physical, biological and chemical attributes play an important role in their intracellular uptake, high loading capacity and specific targeting to tumour cells (4). However, only a selected number of these new nanoparticulated systems have been released to the market, which are routinely used in clinics (5), such as Abraxane™ (albumin-paclitaxel nanoparticles) or Nanoxel™ (N-isopropyl acrylamide paclitaxel embedded micelles).

Due to their small size, nanoparticles are capable of taking advantage of the leaky vasculature and poor lymphatic drainage system of tumours to enhance the retention time of packed drugs (passive targeting) by a factor of 10 (6). However, a new and promising strategy is being developed using biological ligands covalently attached to nanoparticles which can be selectively recognized by tumour cells (active targeting). That leads to a reduction in the minimum effective dose of the drug and its toxicity, while also improving its therapeutic efficacy (7). Among the several molecules that have been identified as possible ligands for coupling to nanoparticulated systems, folic acid has been one of the most commonly used since folate receptor (FR) over expression has been identified in a wide range of tumours, such as in ovarian, endometrial, colorectal or breast cancer (8). Some recent works have shown the enhanced uptake of folate-conjugated nanoparticles based on natural polymers by cancer cells (9,10). These systems combine the advantages of biocompatibility and biodegradability which natural polymers offer with the enhanced uptake of the systems mediated by folate-targeting.

Proteins and polysaccharides have been widely used separately as biopolymers to develop new drug delivery systems. However, the combination of both types of polymers offers new possibilities and better functional properties than that of each molecule alone (11). Several properties of protein-polysaccharide complexes, such as solubility, viscosity, aggregation or gelation, allow their application into different fields. Moreover, some of these properties can be modulated by controlling pH, biopolymer ratio and weight, temperature

or ionic strength, which make them very versatile complexes with different applications.

Alginate/BSA nanoparticles prepared by an emulsion method have been previously used for the controlled delivery of anticancer drugs, such as 5-fluorouracil (12). However, the combination of disulfide bond reduced albumin and thiolated alginate offers all the advantages of protein/polysaccharide complexes, and also the possibility of stabilizing particles through disulfide bond formation. This is a simple process that is totally carried out in aqueous medium, and it can be induced by changing pH conditions. Additionally, disulfide bonds are present in biological environment, which contributes to the aim of biocompatibility and biodegradability of these systems.

In this study, folate-targeted nanoparticles based on disulfide bond reduced bovine serum albumin (BSA-SH) and BSA-SH/alginate-cysteine conjugate (ALG-CYS) mixtures have been prepared and loaded with tamoxifen (TMX), a selective oestrogen receptor modulator widely used in breast cancer treatment (13). They were also *in vitro* characterized in order to evaluate their application in targeted tumour therapy.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Alginic acid sodium salt (viscosity 200.000–400.000 cps), folic acid, *N*-Hydroxysuccinimide (NHS), *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), trypsin from bovine pancreas (13,000 units/mg solid), gentamicin (50 µg/mL), dimethyl sulphoxide (DMSO), methylthiazolotetrazolium (MTT), Coumarin 6 and tamoxifen (TMX) were purchased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). Sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl; 35%), ethanol absolute, triethylamine, methanol (HPLC gradient grade), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), potassium chloride (KCl) and potassium di-hydrogenphosphate were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Bovine serum albumin (BSA, Fraction V), sodium chloride (NaCl), di-sodium hydrogenphosphate dihydrated and sodium dodecyl sulphate (SDS) were purchased from Merck (Barcelona, Spain). Fetal bovine serum (FBS), penicillin (50 U/mL), streptomycin (50 µg/mL), L-glutamine (200 mM) and 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA were purchased from Invitrogen Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Dulbecco's modified Eagle medium was purchased from Lonza (Belgium).

Methods

Preparation of Nanoparticles

Nanoparticles of disulfide bond reduced bovine serum albumin (BSA-SH) and BSA-SH/alginate-cysteine conjugate

(ALG-CYS) mixtures were prepared according to the methodology developed in previous studies (14,15). Briefly, an aqueous solution of BSA 5% (w/v) was treated with 2-mercaptoethanol in order to obtain BSA-SH, and ALG-CYS conjugate was synthesised by attaching L-cysteine molecules to alginate backbone by a carbodiimide-mediated reaction (15). Then, a determined amount of BSA-SH and ALG-CYS was dissolved in 20 ml 1 mM HCl with vigorous stirring. The suspension obtained was sonicated (Branson sonifier 450) and, in order to oxidize free thiol groups and form disulfide bonds, pH was adjusted to 6.5–6.8 with 1 M NaOH (16). The reaction was allowed to proceed for 12 h under intense stirring conditions. Then, 5 ml of a solution of L-cysteine (0.06 mM) was added and the reaction was maintained for a further 5 h with vigorous stirring to block any free thiol groups possibly remaining. After this time the resulting suspension was centrifuged (41,000 rpm, 15 min, Beckman Coulter Optima L-100 XP Ultracentrifuge), and nanoparticles were freeze dried for 24 h at -110°C . Nanoparticles with 50% ALG-CYS and 50% BSA-SH (v/v, B-50-50 nanoparticles), 70% ALG-CYS and 30% BSA-SH (v/v, C-70-30 nanoparticles), and 100% BSA-SH (v/v, BSA-SH nanoparticles) were prepared. The final BSA-SH/ALG-CYS ratio in nanoparticle composition was 1.16/1 and 0.49/1 in the case of B-50-50 and C-70-30 nanoparticles, respectively, as previous studies indicated (15). Nanoparticles with the three compositions were prepared and selected to be conjugated with folic acid.

Preparation of Folate-Conjugated Nanoparticles

The *N*-Hydroxysuccinimide ester of folic acid (NHS-folate) was prepared according to the method developed by Lee and Low (17). Folic acid (2.5 g) was dissolved in 50 ml of dry dimethyl sulfoxide (DMSO) plus 1.25 ml of triethylamine, and reacted with *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (1.3 g) in the presence of dicyclohexylcarbodiimide (2.35 g) overnight at room temperature. The by-product, dicyclohexylurea, was removed by filtration. The DMSO solution was then freeze-dried, and NHS-folate was precipitated in diethylether. The final product, NHS-folate, was washed several times with anhydrous ether, dried under vacuum, and yielded a yellow powder.

The conjugation of folate to nanoparticles was carried out following the method developed by Zhang and co-workers (18): NHS-folate (50 mg) was dissolved in 1.0 ml DMSO and added slowly to 2 ml of the stirred nanoparticle suspension (10 mg NP/ml, pH adjusted to 10 using 1 M carbonate/bicarbonate buffer). After stirring for 45 min at room temperature, the reaction mixture was centrifuged and washed (41,000 rpm, 20 min) in order to separate the folate-conjugated nanoparticles from unreacted folic acid and other by-products. Finally, folate-conjugated nanoparticles (B-50-

50-FOL, C-70-30-FOL and BSA-SH-FOL NP), were freeze dried for 24 h at -110°C .

Determination of Folate Content

The amount of folate conjugated to albumin amine groups was determined by spectrophotometric analysis (18). 2 mg folate-conjugated nanoparticles were hydrolysed by trypsin (0.05 mg/mg NP) with stirring at 37°C for 2 h. After the digestion process, the quantification of folate-conjugation was performed by spectrophotometric measurement of its absorbance at 358 nm (folic acid $\epsilon=8643.5\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

Preparation of TMX-Folate-Conjugated Nanoparticles

TMX loading into folate-conjugated nanoparticles was based on the methodology used in previous studies (14). Briefly, after folate-conjugated nanoparticles were obtained, 20 mg of nanoparticles were suspended in 1 ml of a 500 $\mu\text{g/ml}$ TMX solution (in ethanol) and incubated for 12 h at room temperature. Finally, the suspension was centrifuged (41,000 rpm, 15 min) and the nanoparticles were again freeze-dried. All the experiments with TMX were performed under subdued light as the drug is highly photosensitive.

Morphology, Size and Zeta Potential Measurements

The appearance and size of folate-conjugated nanoparticles were studied by scanning electron microscopy (FE-SEM) (Jeol JSM-6400 Electron Microscope, resolution 3.5 nm from Centro de Microscopía y Citometría, UCM). Size and zeta potential measurements of TMX-loaded and unloaded systems were performed in deionized distilled water using a back-scattered quasi-elastic light scattering device (Zetatrac NPA-152, Microtrac). Data was processed with Microtrac Flex Software.

Estimation of Drug Content

In order to determine the amount of TMX loaded into folate-conjugated nanoparticles, an enzymatic digestion of TMX-loaded folate-conjugated nanoparticles was carried out based on the methodology developed in previous works (14). Briefly, 2 mg of TMX-loaded nanoparticles were suspended in 2 ml of phosphate buffered saline (PBS, pH=7.4) and 100 μg trypsin were added to the solution. The digestion process was performed under stirring at 37°C for 24 h. After this time, TMX was extracted from PBS solution by the addition of 4 ml of dichloromethane. The tubes were mixed in a vortex mixer for 10 min and then centrifuged for 20 min at 3,000 rpm. The organic phase was transferred to vials and evaporated to dryness. The resulting residue was reconstituted in methanol and then evaluated by HPLC. In order to establish the efficacy

of the extraction process, 2 mg of unloaded nanoparticles were suspended with a known concentration of TMX in PBS and 100 μg of trypsin, and the same extraction protocol was followed.

A direct extraction of the drug from TMX-loaded nanoparticles was carried out using methanol in order to study the strength of the interaction between the drug and the system (14,15): 3 mg of TMX-loaded nanoparticles were suspended in 1 ml of methanol with stirring for 5 h. After this time, the suspension was centrifuged (13,000 rpm, 5 min) and the supernatant liquid was collected for measurement. The samples obtained in all processes were analyzed by HPLC.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with a fluorescence detector was required to determine the drug content (19,20). The chromatographic separation was performed on a 25 cm \times 4.6 mm RP-Spherisorb ODS2 C₁₈ column (5 μm particle size, Waters). The mobile phase consisted of 1% aqueous solution of triethylamine and methanol 11/89 (v/v). A flow rate of 1 ml/min was established. The fluorescence detector was set at an excitation wavelength of 250 nm and an emission wavelength of 370 nm. A photochemical reactor unit with a wavelength of 254 nm was placed between the detector and the column. Chromquest 4.2 software (Thermo) was used to process the data obtained. The limit of detection of TMX established by this method was 1 ng/ml. Standard solutions (10–2,000 ng/ml) of TMX in methanol were used to obtain the calibration curve and a good linear correlation ($r^2=0.99$) was obtained.

Drug Release Studies

For drug release studies from TMX-loaded folate-conjugated nanoparticles, 5 mg of drug-loaded nanoparticles was added to 5 ml PBS (pH=7.4) with 0.5% SDS contained in a flask vial at a constant temperature (37°C) and at orbital shaking (100 rpm, Ecotron INFORS HT). TMX is relatively insoluble in the aqueous medium and SDS is an anionic surfactant used to make the release of the drug easier in phosphate buffer (21). At intervals, 50 μL samples were withdrawn from the solution in order to follow the change in drug concentration using HPLC. The volume removed from the vial was replaced with PBS with 0.5% SDS. Additionally, a parallel drug release study was performed in PBS (pH=7.4) without SDS to compare the amount of drug released at 24 h under more physiological conditions with TMX released in the presence of SDS. Sink conditions were maintained during drug release experiments (22).

In Vitro Cell Culture Studies

Cell Culture. Human breast adenocarcinoma MCF-7 and T47D cells were obtained from Dr. von Kobbe and Dr. Pérez-Castillo, respectively, and human cervical cancer HeLa cells were obtained from Dr. Tierrez, whose original source

was ATCC® and between 20 and 25 passage numbers. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium, supplemented with 10% heat inactivated FBS, penicillin (50 U/mL), streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), L-glutamine (200 mM) and gentamicin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂ atmosphere (HERA cell, Sorvall Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Germany). Cells were plated in 75-cm² flask (Sarstedt Ag and Co., Barcelona, Spain) and were passaged when reaching 95% confluence, by gentle trypsinization.

Immunofluorescence Analysis. The expression of FR- α in MCF-7, T47D and HeLa cell lines was determined and quantified by the immunofluorescence technique (23) using a specific monoclonal murine antibody (MAb Mov18/ZEL, Enzo Life Sciences, Switzerland) (24). Cells were seeded in 24-well flat-bottom plates at 50,000 cells per well for MCF-7 and T47D, and 25,000 cells per well for HeLa. Twenty-four hours later, cells were harvested and washed with fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (PBS containing 0.1% sodium azide and 5% FBS). Approximately, 10⁶ cells were then suspended in 200 μl of FACS buffer with saturating concentrations (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of the primary anti FR- α MOv18 or isotypic control IgG murine antibody Biologend, Germany). After incubation on ice for 1 h, the cells were washed twice in FACS buffer, and incubated for an additional 30 min at 4°C with optimal dilutions of goat anti-mouse-IgG Alexa488-conjugated second step antibody (Enzo Life Sciences, Switzerland). At the end of the incubation, the cells were washed 3 times with PBS at 4°C and fixed in 1% buffered paraformaldehyde. Samples were analyzed with a FACScan flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences, Mountain View, CA). Cells were analyzed by gating based on forward and side scatter. Results are expressed as fluorescence index (FI) defined as FR- α associated fluorescence divided by isotypic control fluorescence.

Cellular Uptake of Nanoparticles. Cellular uptake of folate-conjugated nanoparticles and non folate-conjugated nanoparticles was investigated with a monoculture of MCF-7, T47D and HeLa cells using the methodology developed in previous works (14). Briefly, nanoparticles were loaded with Coumarin following the protocol previously used (14). Cells were seeded in 96-well flat-bottom plates at 10,000 cells per well for MCF-7 and T47D cells and at 5,000 cells per well for HeLa. Twenty-four hours later, the medium was replaced with 100 μl medium with 1% FBS containing 1 mg of Coumarin-loaded folate-targeted and non-targeted nanoparticles per ml of growth medium. The plates were incubated at 37°C for 2 and 24 h. Then, the cells were washed thoroughly with PBS in order to remove the nanoparticles which had not been effectively internalized by the cells. Finally, MCF-7, T47D and HeLa cells were dried overnight and

dissolved in 100 μl of lysis reagent (PBS with 2% SDS and 50 mM EDTA). Remaining nanoparticles were quantified by fluorimetry at 488 nm using a spectrophotometer (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain). In order to calculate the amount of nanoparticles from fluorescence, calibration curves (fluorescence *versus* concentration) were prepared in the same lysis medium.

For a competitive binding assay (25), folate receptors were blocked with incubation medium including 1 mM free folic acid 2 h before adding nanoparticles. Then, the medium was replaced with nanoparticles suspended in medium +1 mM free folic. Plates were incubated at 37°C for 2 h and, after this time, the same protocol as previously described was followed.

Additionally, microscopy studies were carried out before removing PBS from the final wash. Localization of fluorescent dye was examined by light fluorescence microscopy (Leica DMIL microscope, Leica Microsystems Switzerland). Cells were photographed with a Leica DFC 300FX digital camera and Leica Application Suite software was used for processing the pictures (Leica Microsystems Switzerland). This experiment was carried out only with those systems that showed an enhanced uptake when they were functionalized with folate (B-50-50-FOL and BSA-SH-FOL NP), taking into account the results obtained in the uptake assay previously described.

Cell Viability. Cell viability was evaluated by using the MTT method. All experimental conditions were performed in quintuplicate. Each experiment was carried out in triplicate. 10 μM TMX was used, having been determined as the most effective concentration in preliminary experiments (14). Cells were seeded in 96-well flat-bottom plates at 5,000 cells/well, in the case of MCF-7 and T47D cells, and at 2,500 cells/well, in the case of HeLa cells. After 24 h, the medium was replaced with 100 μl medium with 1% FBS containing unloaded folate-conjugated nanoparticles, TMX-loaded folate-conjugated nanoparticles or the drug in solution. The amount of nanoparticles was 0.929 mg/mL in the case of B-50-50-FOL and BSA-SH-FOL NP, and 0.620 mg/ml for C-70-30-FOL NP which was in accordance with the concentration of TMX considering the TMX load of the particles. Medium was not removed or changed up to 1, 2, 3, 6 and 9 days, when 10 μl MTT solution (5 mg/ml) was added to each well. After 2 h incubation at 37°C, 5% CO₂, each well was replaced with 100 μl DMSO (26). Cell viability was determined by measuring the absorbance at 570 nm using a spectrophotometer (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain). Results are presented as the percentage survival in relation to untreated control cells.

Statistical Analysis

Statistical comparisons were performed using one way analysis of variance (ANOVA) following by Bonferroni post hoc

analysis with computer software SPSS 19.0. Values of $p < 0.05$ and $p < 0.01$ were considered significant and very significant, respectively.

RESULTS

Determination of Folate Content

A spectrophotometric measurement was carried out after the tryptic hydrolysis of nanoparticles to evaluate the extent of folate-conjugation in folate-conjugated nanoparticles. 170 ± 13 , 143 ± 25 and 79 ± 29 μmol folate/g NP were determined for BSA-SH-FOL, B-50-50-FOL and C-70-30-FOL NP, respectively. The amount of folate conjugated to C-70-30-FOL NP was significantly lower ($p < 0.05$) than that bound to BSA-SH-FOL and B-50-50-FOL NP.

Morphology, Size and Zeta Potential Measurements

Morphology of BSA-SH-FOL, B-50-50-FOL and C-70-30-FOL NP was analysed by FE-SEM. FE-SEM micrographs of nanoparticles (Fig. 1) showed individual nanometric particles, with certain spherical tendency, and apparently non porous and smooth surface.

Each nanoparticle formulation was also analysed using quasi-elastic light scattering in order to characterize TMX-loaded and unloaded folate-conjugated nanoparticles in terms of mean size and surface charge. All nanoparticles showed nanometric size. BSA-SH-FOL, B-50-50-FOL and C-70-30-FOL NP unloaded systems showed mean diameter of 350, 68 and 98 nm, respectively (Fig. S1; Supplementary Material). TMX-BSA-SH-FOL, TMX-B-50-50-FOL and TMX-C-70-30-FOL nanoparticles showed mean diameter of 417, 76 and 104 nm, respectively (Fig. S1; Supplementary Material).

Zeta potential analysis revealed that BSA-SH-FOL, B-50-50-FOL and C-70-30-FOL NP unloaded systems had zeta potential values of -10 ± 4 , -23.4 ± 0.6 and -43 ± 3 mV, respectively. In the case of TMX-loaded systems, TMX-BSA-SH-FOL, TMX-B-50-50-FOL and TMX-C-70-30-FOL nanoparticles showed zeta potential values of 5 ± 2 , 42 ± 2 and 32 ± 6 mV, respectively.

Estimation of Drug Content in Nanoparticles

An enzymatic degradation was carried out in order to quantify the TMX load of the folate-conjugated systems. TMX-BSA-SH-FOL, TMX-B-50-50-FOL and TMX-C-70-30-FOL nanoparticles showed values of 4.9 ± 0.5 , 4.2 ± 0.3 and 7.7 ± 0.8 μg TMX per mg nanoparticle, respectively. According to these results, TMX-C-70-30-FOL nanoparticles included significantly ($p < 0.01$) more drug than TMX-B-50-

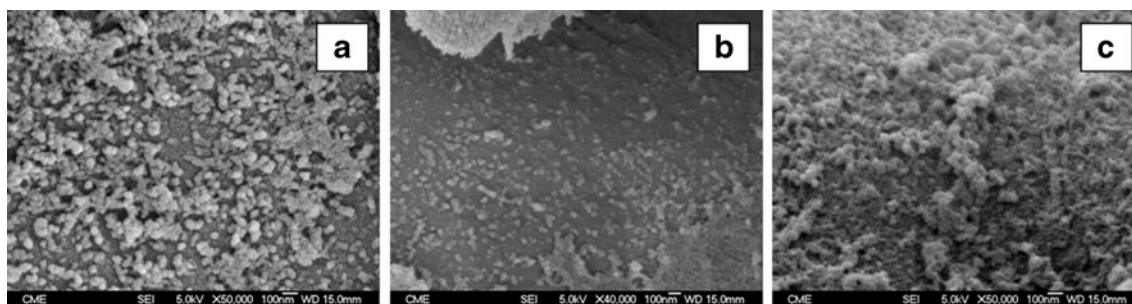


Fig. 1 FE-SEM micrographs of nanoparticles: BSA-SH-FOL NP (a), B-50-50-FOL NP (b) and C-70-30-FOL NP (c).

50-FOL and TMX-BSA-SH-FOL nanoparticles, which showed similar values.

In the case of TMX extraction with methanol, TMX-BSA-SH-FOL, TMX-B-50-50-FOL and TMX-C-70-30-FOL nanoparticles showed values of 1.9 ± 0.3 , 4.1 ± 0.5 and 6.1 ± 0.7 μg TMX per mg nanoparticle, respectively. Thus, this method allowed the complete extraction of the drug to be achieved in the case of nanoparticles with alginate in their composition, but only 38% of the average drug load value was extracted in the case of albumin nanoparticles.

Drug Release Studies

The cumulative release curve of TMX in the presence of SDS in the release medium is represented in Fig. 2. Maximum drug release obtained from each formulation is shown in Table I. TMX release was complete in all cases, since differences between maximum drug release values and TMX load of nanoparticles determined by enzymatic degradation were not found to be statistically significant ($p > 0.05$).

Drug release in the presence of SDS occurred rapidly for the first 3 h, 2 h and 1.5 h, when 39%, 36% and 62% of TMX was released from TMX-BSA-SH-FOL, TMX-B-50-50-FOL and TMX-C-70-30-FOL, respectively. From this point onward, a slower second stage was established and the TMX release rate could be determined. These values are shown in Table I.

Additionally, the amount of TMX released from the systems was quantified at 24 h in a parallel study performed in the absence of SDS. 0.2 ± 0.1 , 0.12 ± 0.03 and 0.18 ± 0.03 μg TMX/mg NP values were determined for TMX-BSA-SH-FOL, TMX-B-50-50-FOL and TMX-C-70-30-FOL, respectively. These data were significantly different ($p < 0.01$) from the respective values at 24 h in the presence of SDS in the release medium (3.99 ± 0.08 , 4.8 ± 0.2 and 5.8 ± 0.4 μg TMX/mg NP in the case of TMX-BSA-SH-FOL, TMX-B-50-50-FOL and TMX-C-70-30-FOL, respectively).

In Vitro Cell Culture Studies

Three different cellular lines, MCF-7, T47D and HeLa cells, were selected according to their expression of estrogen receptor (ER) and folate receptor (FR) to assay the nanoparticles and evaluate, not only the antiestrogenic action of the drug, but also the uptake of the systems mediated by the FR.

Immunofluorescence analysis was employed to quantify the expression of FR- α on MCF-7, T47D and HeLa cell surface using a specific monoclonal antibody. Figure 3 shows the histogram of associated FR- α fluorescence of the three cell lines. As can be observed, the receptor presence was confirmed in all the lines, but not in the same proportion. Very similar FR- α expression was observed in the case of MCF-7 and T47D cells, the MCF-7 cell line being slightly more FR- α expressive than T47D cells (8.9 and 7.7, respectively). HeLa cells were the most FR- α expressive and showed the highest FI value (24.9).

Folate-conjugated nanoparticles and non folate-conjugated nanoparticles were loaded with a fluorescent marker and added

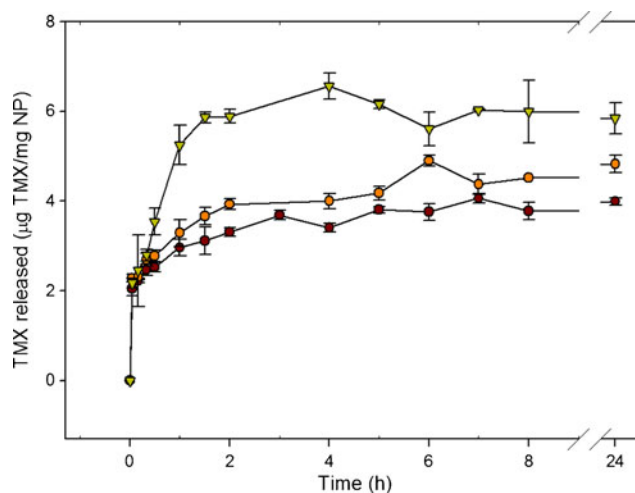


Fig. 2 Cumulative amount of TMX released from drug-loaded TMX-BSA-SH-FOL NP (●), TMX-B-50-50-FOL NP (■) and TMX-C-70-30-FOL NP (▲).

Table 1 Maximum Drug Release and Release Rates of Tamoxifen from Nanoparticle Formulations

Sample	Maximum drug release (μg TMX/mg NP)	Time	Release rate in second stage K (μg TMX/mg NP/h) ^a	Second stage time interval
TMX-BSA-SH-FOL	4.1 ± 0.1	7 h	0.018 (0.932) ^a	3–8 h
TMX-B-50-50-FOL	4.9 ± 0.1	6 h	0.124 (0.989) ^a	4–8 h
TMX-C-70-30-FOL	6.6 ± 0.3	4 h	0.023(0.905) ^a	1.5–8 h

^aValue in parenthesis is r^2

to cells in order to study their cellular uptake. Fluorescent signal into cells was quantitatively and qualitatively detected after 2 and 24 h of incubation. Results are shown in Fig. 4. As can be observed, either targeted or not targeted systems were internalized. However, B-50-50-FOL and BSA-SH-FOL NP enhanced their uptake when the systems were functionalized with folate while no differences were found in the case of C-70-30-FOL NP. B-50-50-FOL was highly internalized by the three lines, and BSA-SH-FOL uptake was especially relevant in case of HeLa cells.

Besides the quantitative assay, the internalization of these systems was easily observed due to the green fluorescence of coumarin attached to the particles, as shown by the images obtained from the fluorescence microscope (Fig. 4).

A competitive binding assay was carried out at 2 h to assess if FR was responsible for the increased uptake of B-50-50-FOL and BSA-SH-FOL NP by adding free folic acid to the incubation medium. FR seemed to be mainly involved in BSA-SH NP uptake by the three cell lines and in B-50-50-FOL NP uptake by T47D cells, as nanoparticle uptake values significantly decreased when free folic acid was added to the medium (Fig. 4). However, B-50-50-FOL NP uptake by MCF-7 and HeLa cells could not be exclusively attributed to

FR, since uptake reduction in the presence of free folic acid was not found to be statistically significant (Fig. 4).

Cytotoxicity studies were carried out over 1, 2, 3, 6 and 9 days with unloaded folate-conjugate nanoparticles using the equivalent concentration to 10 μM TMX when drug was administered by nanoparticles in later studies. In the case of MCF-7 cells, B-50-50-FOL and C-70-30-FOL NP generally caused low cytotoxicity (cell survival between $99 \pm 8\%$ and $73 \pm 8\%$), and showed the lowest viability values after 9 days of incubation. However, BSA-SH-FOL caused a significant decrease in cell viability from the first day of incubation (between $69 \pm 4\%$ and $57 \pm 8\%$). In the case of HeLa cells, cell survival was significantly reduced with B-50-50-FOL and BSA-SH-FOL NP from the third day of incubation (between $68 \pm 5\%$ and $50 \pm 12\%$). For C-70-30-FOL NP, low toxicity was observed during the first three days of incubation (between $108 \pm 9\%$ and $71 \pm 8\%$) but this value decreased to $44 \pm 8\%$ at day 9. Finally, in the case of T47D cells, a similar situation was observed to that of MCF-7 cells. B-50-50-FOL and C-70-30-FOL NP caused low cytotoxicity over the complete study (between $105 \pm 10\%$ and $78 \pm 11\%$) and showed the lowest values after 9 days of incubation. BSA-SH-FOL caused a significant decrease in cell viability from the first day of incubation (between $73 \pm 16\%$ and $62 \pm 7\%$).

Finally, 10 μM TMX was administered to cells in solution and entrapped into nanoparticles to check the efficacy on gradual reduction of cell survival at 1, 2, 3, 6 and 9 days (Fig. 5). TMX administered entrapped into folate-systems caused more gradual decrease in cell viability than when TMX was administered in solution from the first day, in the case of HeLa and T47D cells, and from the third day, in the case of MCF-7.

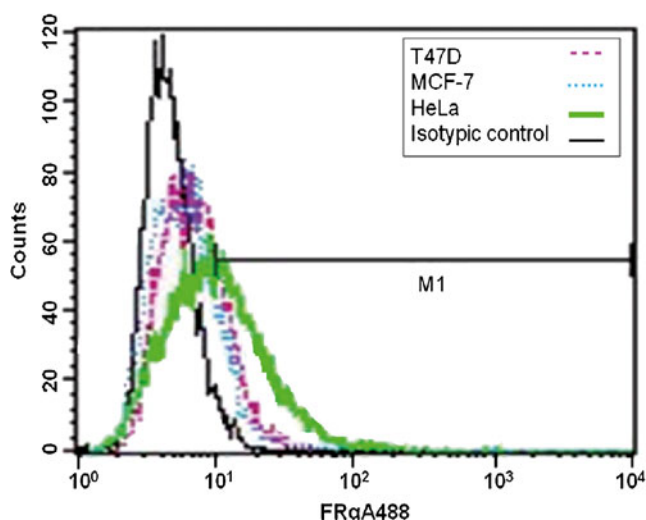
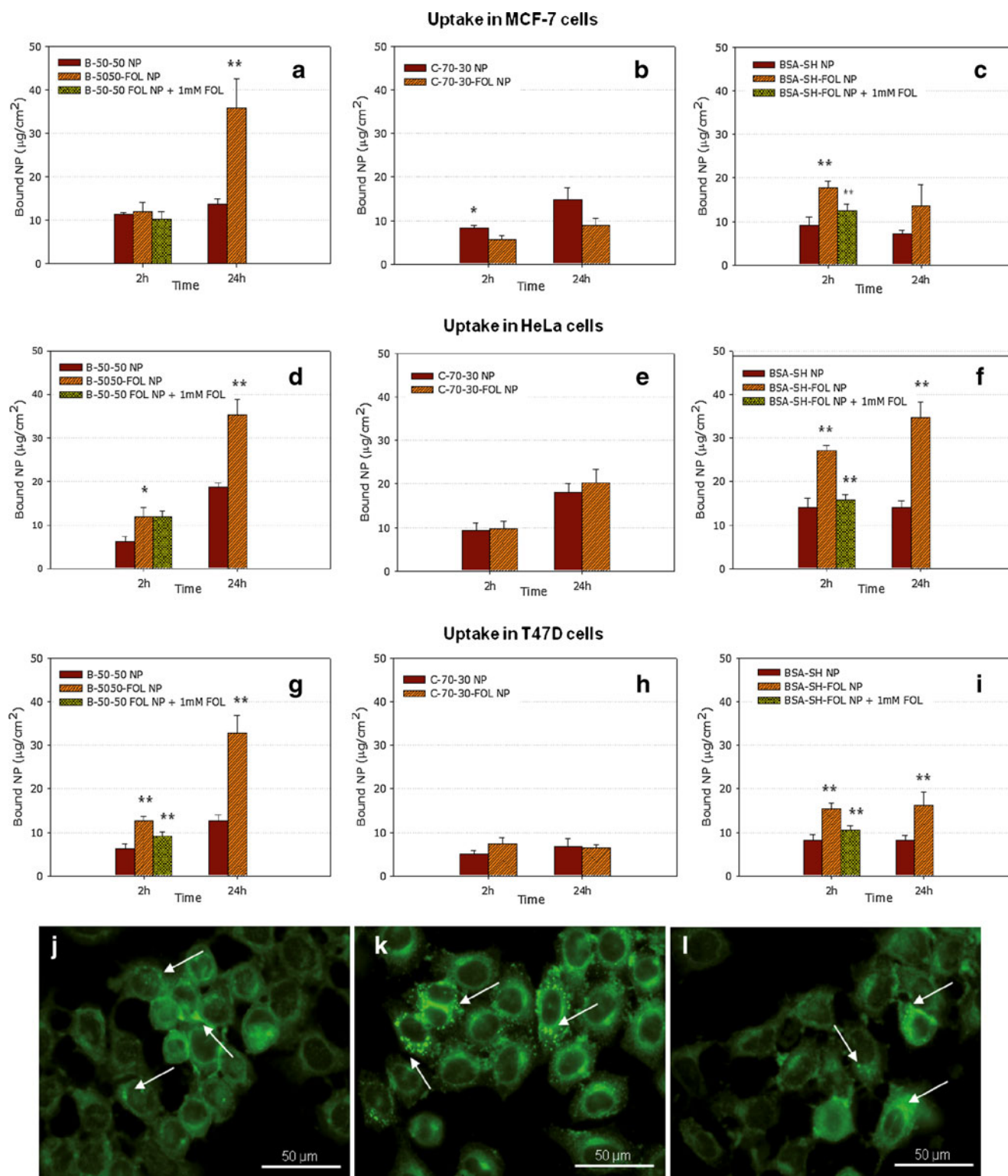


Fig. 3 Histogram with associated FR- α fluorescence of MCF-7, HeLa and T47D cells.

DISCUSSION

Current TMX therapy for advanced or metastatic oestrogen-dependent breast cancer has been associated with some serious side effects after long-term treatment. Thus, research on new challenging targeted therapies has become a necessity. Folate receptor plays a significant role in a wide range of tumour types, including breast cancer (7). It has been hypothesized that folate-attached therapeutic agents might reduce



off-site toxicity and enhance efficacy against tumour cells. Previous works (14,15) showed good *in vitro* efficacy of

TMX-loaded nanoparticles based on various mixtures of modified alginate and albumin as controlled drug delivery

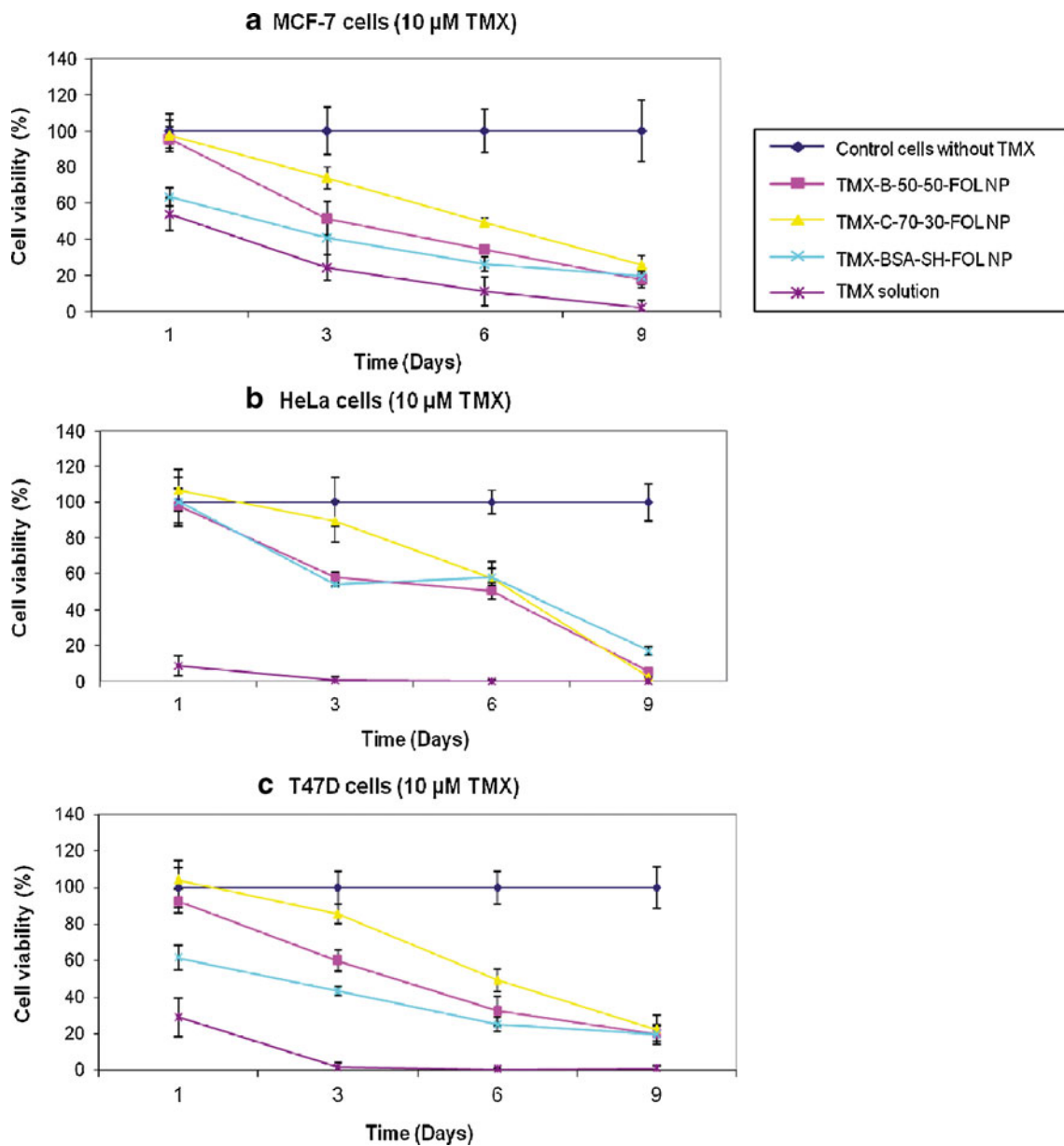


Fig. 5 Cell viability of MCF-7 (a), HeLa (b) and T47D (c) cells in presence of 10 μ M TMX: without drug (\blacklozenge); TMX solution (\blackstar); TMX-BSA-SH-FOLNP (\blacktimes); TMX-B-50-50-FOLNP (\blacklozenge) and TMX-C-70-30-FOLNP (\blacktriangle).

systems. Additionally, an improved *in vivo* antitumor activity of TMX was declared after subcutaneous administration of these TMX-loaded nanoparticles in a breast tumour xenograft model (27). Consequently, the attachment of folic acid to these systems already tested could possible make an improvement of the effectiveness of TMX, and also in the development of new administration routes for this drug, such as intravenously.

Covalent attachment of folic acid to the three systems was successfully achieved. A very similar amount of folate content to that reported by Zhang and co-workers, who used the same methodology for BSA nanoparticles (18), was obtained. It seemed that when the proportion of BSA into the composition was reduced, a lower value of folate content was obtained, this

being significantly different in the case of C-70-30-FOL NP. Since folic acid attachment occurred via amine groups of BSA, a lower value was expected in the composition with a lesser proportion of BSA in its composition.

Particles were characterized in terms of mean size and surface charge. Particles of very small size (≤ 100 nm) were obtained in all cases according to SEM micrographs. Quasi-elastic light scattering analysis confirmed this small size in the case of nanoparticles based on alginate/albumin mixtures. However, albumin nanoparticles showed a higher mean size value by this technique than deduced from the SEM micrographs. This difference could be explained in terms of nanoparticle aggregation phenomenon. Either unloaded or TMX-

loaded nanoparticles presented zeta potential values significantly lower than ± 30 mV, which has been established as the minimum to obtain a physically stable nanosuspension and avoid nanoparticle aggregation (28). Thus, BSA-SH-FOL NP aggregates could be formed in aqueous medium, resulting in an increased mean size value when quasi-elastic study was performed. In the case of B-50-50-FOL and C-7030-FOL NP, zeta potential values were close to ± 30 mV, resulting in stable nanosuspensions with similar mean size values by both techniques. Negative zeta potential values were obtained for unloaded formulations. This fact was expected due to the presence of BSA and alginate in nanoparticle composition, as other works have revealed (29,30). When nanoparticles were loaded with TMX, zeta potential values became positive in all cases. This fact could be attributed to the major superficial localization of the drug (31), according to the similar tendency observed in previous works (14,22).

TMX-load of nanoparticles was determined after tryptic hydrolysis of the systems. Results were very similar to those reported in previous studies (14), indicating that folate attachment did not affect TMX incorporation. Results of TMX extraction with methanol demonstrated again the superficial presence of TMX, as zeta potential values indicated. In the case of TMX-B-50-50-FOL and TMX-C-70-30-FOL NP, TMX extraction was complete; but in the case of TMX-BSA-SH-FOL NP, 62% of the drug was still trapped in the system. This fact was attributed to the strong interaction that can be established between TMX and the hydrophobic regions of albumin, as previous studies revealed (32). Superficial presence of the drug was additionally supported by fast TMX release during the first step of the release study performed with SDS, which is characteristic of hydrophobic drugs with this location (22). After this stage strongly retained TMX was released. Complete release of TMX was achieved within the first 24 h from all systems when SDS was included in the release medium. However, SDS would contribute to this fast and complete release, as previous studies showed (33). In fact, when a TMX release study was performed in PBS without SDS, the amount of drug released from the systems at 24 h diminished to 3–5% of total TMX load. SDS is a surfactant that is not present in physiological conditions. Consequently, if these nanoparticles were intravenously administered, almost all the loaded drug would remain intact and would be only released after the enzymatic digestion of nanoparticles, which would mainly occur after their cellular internalization. The presence of albumin into nanoparticle composition became a determinant factor for the release control (14,15). As a matter of fact, those compositions with a higher amount of albumin showed lower percentages of drug released in the first stage. Additionally, maximum drug release in these compositions was obtained later than in TMX-C-70-30-FOL.

Different cellular lines were used to test folate-targeted systems according to their expression of ER and FR. HeLa

and T47D cells have been described in the literature as ER(-)&FR(+) and ER(+)&FR(+), respectively (34,35). MCF-7 cells have been described as positive in the expression of ER (35), but controversy has arisen in the case of folate receptor expression. Some authors have described this line as deprived in FR and, indeed, they used this line as negative control (36). However, there are works that describe them as weakly FR expressive (34) or even positive in the expression of FR receptor (37). Taking into account this controversial aspect, an immunofluorescence analysis was carried out in order to determine the FR expression level of each cell line. Results showed that all lines were positive in the expression of FR, especially HeLa cells, allowing these three lines to be used as possible *in vitro* test of folate-targeted system efficacy.

In general, good cytocompatibility values were obtained with B-50-50-FOL and C-70-30-FOL NP. This is in accordance with results previously obtained using non targeted systems (14). However, BSA-SH-FOL NP showed lower values of cell viability in the three lines than non targeted formulations (80%–100%) (14), indicating that this composition itself was relatively toxic. Since FR was determined in uptake studies as the main mechanism used by cells to internalize BSA-SH-FOL NP, only cells with FR over-expression, such as cancer cells, would be principally affected by this toxicity. Thus, BSA-SH-FOL NP itself would have a synergic antitumor action with TMX when loaded with this drug. In the case of B-50-50-FOL NP, uptake results could not clearly point to FR as the only mechanism of internalization, with the exception of T47D cells. This fact might indicate the existence of an unspecified mechanism that would act additionally to FR-mediated internalization. Thus, the presence of free folic acid in the incubation medium would not be sufficient to inhibit the internalization of the system. Previous works detected the presence of this unspecific uptake mechanism in MCF-7 and HeLa cells due to the presence of alginate in nanoparticle composition (14). Some authors revealed that negative-charged nanoparticles showed high cellular uptake levels due to electrostatic interactions established with some parts of cellular membrane (38,39). B-50-50-FOL NP showed more negative zeta potential values than BSA-SH-FOL NP and consequently, this system could only interact directly with cells due to its anionic surface, and this aspect creates difficulty in identifying the internalization via FR by this methodology. However, folic acid attachment to the systems, either in B-50-50-FOL or BSA-SH-FOL NP, led to a great enhancement of the nanoparticle uptake in all cellular lines. Consequently, FR-mediated uptake might be implicated in the internalization of both systems despite the fact that significant evidence was only found in BSA-SH-FOL NP. In the case of C-70-30-FOL NP, the amount of folate attached to the system was not enough to enhance its uptake. It seemed that an unspecific mechanism had a predominant role in this composition, which in fact showed the most negative zeta potential value.

When TMX was loaded into the systems, a gradual decrease in cell viability values was observed when TMX was being released from the all the systems. TMX-BSA-SH-FOL and TMX-B-50-50-FOL NP were especially effective in reducing cell viability from the third day of incubation. The amount of TMX that would be available within the cells treated with TMX-loaded systems would be lower than the amount of drug available in cells treated with TMX solution at 24 h, considering the amount of NP bound to cells at 24 h in uptake studies. However, folate-targeted systems may enter cells via folate receptor mediated endocytosis pathway ($K_a \sim 5 \times 10^{10}$ M for folate) (40), where much of the material is released into the cell cytoplasm after endocytosis and vesicular trafficking, and unligate folate receptor may then recycle to the cell surface. Since the recycling rate for the folate receptor is in the range of 0.5 to 5 h (41), more NP are expected to be introduced into the cells over 9 days. Moreover, folate conjugates have been observed to remain stable and functional for several hours following uptake by cancer cells (42), and TMX would be released only after NP degradation. This would justify the delayed cytotoxic action of folate targeted NP compared to TMX solution effect. Thus, the efficacy of TMX-FOL NP as a controlled drug release systems was demonstrated *in vitro*, where the systems with high folate content were the most effective against tumour cell survival.

In conclusion, this study demonstrates the promising *in vitro* anticancer action of these new TMX-loaded folate-targeted systems, especially TMX-BSA-SH-FOL and TMX-B-50-50 NP-FOL, which showed the highest cell uptake values and effectiveness in reducing carcinoma cell survival. TMX incorporation to these folate-targeted systems may allow a new administration route to be studied in further *in vivo* studies in order to improve current TMX therapy.

ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURES

Authors are grateful to Dr. Von Kobbe, Dr. Tierrez and Dr. Perez-Castillo for the gift of MCF-7, HeLa and T47D cells, respectively. The financial support of the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (FIS PS09/01513 and MAT2010-21509-C03-03) and the FPI grant to A. Martínez are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol*. 2012;13(8):790–801.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J*. 2005;19(3):311–30.
- Park JH, von Maltzahn G, Xu MJ, Fogal V, Kotamraju VR, Ruoslahti E, et al. Cooperative nanomaterial system to sensitize, target, and treat tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(3):981–6.
- Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(9):771–82.
- Ranganathan R, Madanmohan S, Kesavan A, Baskar G, Krishnamoorthy YR, Santosham R, et al. Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. *Int J Nanomed*. 2012;7:1043–60.
- Puri A, Loomis K, Smith B, Lee JH, Yavlovich A, Heldman E, et al. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst*. 2009;26(6):523–80.
- Sudimack J, Lee RJ. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;41(2):147–62.
- Xia W, Low PS. Folate-targeted therapies for cancer. *J Med Chem*. 2010;53(19):6811–24.
- Ulbrich K, Michaelis M, Rothweiler F, Knobloch T, Sithisarn P, Cinatl J, et al. Interaction of folate-conjugated human serum albumin (HSA) nanoparticles with tumour cells. *Int J Pharm*. 2011;406(1–2):128–34.
- Yang SJ, Lin FH, Tsai HM, Lin CF, Chin HC, Wong JM, et al. Alginate-folic acid-modified chitosan nanoparticles for photodynamic detection of intestinal neoplasms. *Biomaterials*. 2011;32(8):2174–82.
- Benichou A, Ascrin A, Garti N. Protein-Polysaccharide Interactions for Stabilization of Food Emulsions. *J Dispers Sci Technol*. 2002;23(1–3):93–123.
- Yi YM, Yang TY, Pan WM. Preparation and distribution of 5-fluorouracil (125)I sodium alginate-bovine serum albumin nanoparticles. *World J Gastroenterol*. 1999;5(1):57–60.
- Ameller T, Legrand P, Marsaud V, Renoir JM. Drug delivery systems for oestrogenic hormones and antagonists: the need for selective targeting in estradiol-dependent cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;92(1–2):1–18.
- Martinez A, Benito-Miguel M, Iglesias I, Teijon JM, Blanco MD. Tamoxifen-loaded thiolated alginate-albumin nanoparticles as antitumoral drug delivery systems. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100A(6):1467–76.
- Martinez A, Iglesias I, Lozano R, Teijón JM, Blanco MD. Synthesis and characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. Evaluation as drug delivery systems. *Carbohydr Polym*. 2011;83(3):1311–21.
- Bernkop-Schnurch A. Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(11):1569–82.
- Lee RJ, Low PS. Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem*. 1994;269(5):3198–204.
- Zhang L, Hou S, Mao S, Wei D, Song X, Lu Y. Uptake of folate-conjugated albumin nanoparticles to the SKOV3 cells. *Int J Pharm*. 2004;287(1–2):155–62.
- Lee KH, Ward BA, Desta Z, Flockhart DA, Jones DR. Quantification of tamoxifen and three metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to a clinical trial. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2003;791(1–2):245–53.
- MacCallum J, Cummings J, Dixon JM, Miller WR. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of tamoxifen and its major metabolites in plasma. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996;678(2):317–23.
- Hu FX, Neoh KG, Kang ET. Synthesis and *in vitro* anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles. *Biomaterials*. 2006;27(33):5725–33.
- Chawla JS, Amiji MM. Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *Int J Pharm*. 2002;249(1–2):127–38.
- Beerli RR, Dreier B, Barbas 3rd CF. Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1495–500.

24. Corona G, Giannini F, Fabris M, Toffoli G, Boiocchi M. Role of folate receptor and reduced folate carrier in the transport of 5-methyltetrahydrofolic acid in human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer*. 1998;75(1):125–33.
25. Shi G, Guo W, Stephenson SM, Lee RJ. Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic/anionic lipid combinations. *J Control Release*. 2002;80(1–3):309–19.
26. Han X, Liu J, Liu M, Xie C, Zhan C, Gu B, et al. 9-NC-loaded folate-conjugated polymer micelles as tumor targeted drug delivery system: preparation and evaluation in vitro. *Int J Pharm*. 2009;372(1–2):125–31.
27. Martínez A, Muniz E, Iglesias I, Teijón JM, Blanco MD. Enhanced preclinical efficacy of tamoxifen developed as alginate-cysteine/disulfide bond reduced albumin nanoparticles. *Int J Pharm*. 2012;436(1–2):574–81.
28. Muller RH, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;47(1):3–19.
29. Arnedo A, Espuelas S, Irache JM. Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *Int J Pharm*. 2002;244(1–2):59–72.
30. Aynic I, Vauthier C, Chacun H, Fattal E, Couvreur P. Spongelike alginate nanoparticles as a new potential system for the delivery of antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 1999;9(3):301–12.
31. Abbaslipurkabir R, Salehzadeh A, Abdullah R. Delivering Tamoxifen within Solid Lipid Nanoparticles. *Pharm Technol*. 2011;35(4):74–9.
32. Morello KC, Wurz GT, DeGregorio MW. Pharmacokinetics of selective estrogen receptor modulators. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(4):361–72.
33. Martínez A, Arana P, Fernández A, Olmo R, Teijón C, Blanco MD. Synthesis and characterisation of alginate/chitosan nanoparticles as tamoxifen controlled delivery systems. *Journal of Microencapsulation*.
34. Geszke M, Murias M, Balan L, Medjahdi G, Korczynski J, Moritz M, et al. Folic acid-conjugated core/shell ZnS:Mn/ZnS quantum dots as targeted probes for two photon fluorescence imaging of cancer cells. *Acta Biomater*. 2011;7(3):1327–38.
35. Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(23):7889–93.
36. Sonvico F, Mornet S, Vasseur S, Dubernet C, Jaillard D, Degrouard J, et al. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjug Chem*. 2005;16(5):1181–8.
37. Suzuki T, Hisakawa S, Itoh Y, Suzuki N, Takahashi K, Kawahata M, et al. Design, synthesis, and biological activity of folate receptor-targeted prodrugs of thiolate histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17(15):4208–12.
38. Wilhelm C, Gazeau F, Roger J, Pons JN, Bacri JC. Interaction of Anionic Superparamagnetic Nanoparticles with Cells: Kinetic Analyses of Membrane Adsorption and Subsequent Internalization. *Langmuir*. 2002;18(21):8148–55.
39. Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri JC, Gazeau F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*. 2003;24(6):1001–11.
40. Jansen G. Receptor-, and carrier-mediated transport systems for folates, and antifolates. In: Jackman AL, editor. *Antifolate drugs in cancer therapy*. Totowa: Humana Press; 1999. p. 293–321.
41. Ke CY, Mathias CJ, Green MA. The folate receptor as a molecular target for tumor-selective radionuclide delivery. *Nucl Med Biol*. 2003;30(8):811–7.
42. Leamon CP, Low PS. Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(13):5572–6.

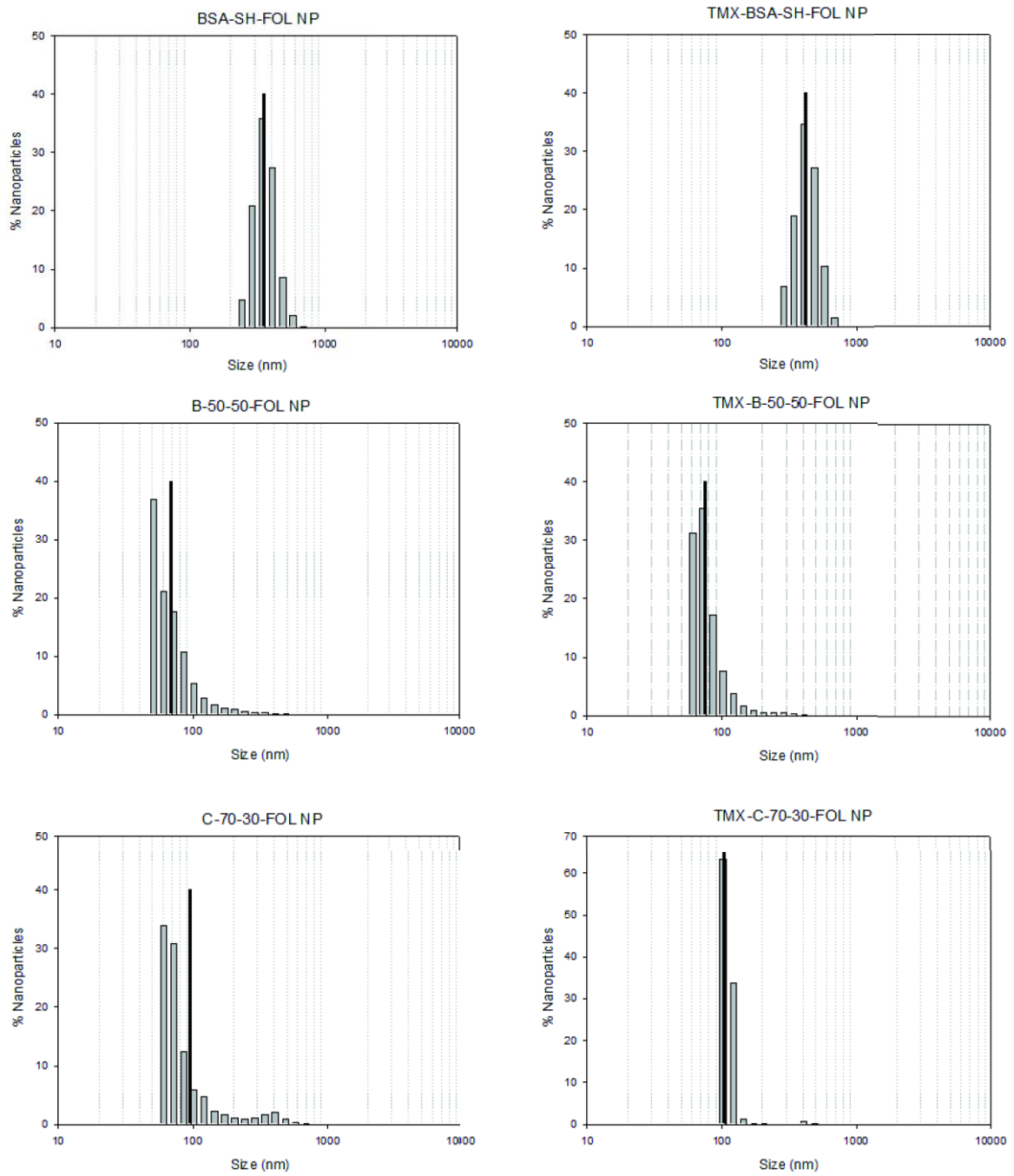


Fig. S-1. Size distribution of nanoparticles obtained by quasielastic-light scattering technique. Average diameter: solid line.

5. Vectorizando el tamoxifeno a tumores de mama xenograft: eficacia preclínica de nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico basadas en una combinación de alginato-cisteína/albúmina con puentes disulfuro reducidos.

[Targeting tamoxifen to breast cancer xenograft tumours: preclinical efficacy of folate-attached nanoparticles based on alginate-cysteine / disulphide-bond-reduced albumin. A. Martínez, E. Muñiz, C. Teijón, I. Iglesias, J.M. Teijón y M.D. Blanco. *Pharmaceutical Research* DOI 10.1007/s11095-013-1247-5 (2013)].

Objetivo:

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la eficacia antitumoral *in vivo* del tamoxifeno incorporado en nanopartículas compuestas por BSA-SH/ALG-CYS funcionalizadas con ácido fólico, previamente caracterizadas *in vitro*, así como de la capacidad de vectorización del tratamiento a través de estos sistemas mediante su administración intravenosa en un modelo de cáncer de mama xenograft (MCF-7) desarrollado en ratones atímicos. La efectividad de los sistemas se valoró comparativamente respecto a la acción del fármaco administrado en disolución y también respecto a los sistemas análogos sin funcionalizar con ácido fólico.

Metodología:

Las nanopartículas vectorizadas y sin vectorizar con ácido fólico cargadas con tamoxifeno que se evaluaron en este estudio fueron preparadas siguiendo el protocolo desarrollado en los estudios anteriores. Las composiciones seleccionadas para este estudio *in vivo* fueron aquellas formadas por mezclas de proteína y polisacárido modificados que partían inicialmente de 50% de ALG-CYS y 50% BSA-SH en su composición: las nanopartículas B-50-50 NP y TMX-B-50-50 NP, sin funcionalizar, y las nanopartículas B-50-50-FOL NP y TMX-B-50-50-FOL NP, funcionalizadas con ácido fólico. En la Tabla 1 se recogió un resumen de las características físico-químicas, determinadas en estudios previos, de cada tipo de nanopartícula.

La línea celular seleccionada para el desarrollo de los tumores xenograft fue la línea celular MCF-7 de cáncer de mama humano. Las células se cultivaron siguiendo el procedimiento rutinario, y antes de la inoculación en los ratones se tripsinizaron y se resuspendieron en medio de cultivo, manteniéndolas en hielo hasta su inyección.

En cuanto a los ratones empleados para el estudio, se seleccionaron ratones hembra atímicos nu/nu de 4 semanas de edad, que se mantuvieron en condiciones de esterilidad y comida y bebida a demanda. Las células se inyectaron subcutáneamente en el lateral derecho de los ratones (10^7 células/0,3 ml) que se mantuvieron anestesiados con isoflurano durante la inoculación. Los animales recibieron inyecciones subcutáneas semanales de valerato de 17β -estradiol tras la implantación de las células para favorecer el crecimiento del tumor.

Una vez que los ratones hubieron desarrollado un tumor palpable (~ 400 mm³), el tratamiento hormonal se suspendió y los ratones se distribuyeron en 6 grupos de cinco ratones cada uno: grupo control (a los que se les administró suero salino), dos grupos placebo tratados con 5 mg/ml de las nanopartículas B-50-50 NP y de B-50-50-FOL NP, un grupo tratado con 5 mg/ml del sistema TMX-B-50-50 NP, un grupo tratado con 5 mg/ml de las nanopartículas TMX-B-50-50-FOL NP y, finalmente, un grupo tratado con 20 μ g/ml del fármaco en disolución. La cantidad de fármaco administrada en cada inyección (200 μ l) fue de 4 μ g, y las inyecciones se llevaron a cabo cada 3 días durante 12 días por vía intravenosa a través de la vena de la cola.

La distribución de los ratones en los diferentes grupos no pudo realizarse de manera aleatoria debido a la elevada variabilidad que se observó en el volumen de los tumores de los ratones. Por ello, se decidió reservar aquellos ratones con los tumores más grandes y más vascularizados para los tratamientos con fármaco, bien en forma de disolución o vehiculizado en los sistemas, ya que se esperaba que el fármaco hiciera su efecto y detuviera o disminuyera la

progresión de dichos tumores. De esta manera, se evitaría el posible sacrificio de los ratones por el desarrollo de un tumor excesivamente grande. Los ratones con tumores más pequeños se reservaron para los tratamientos con suero salino y con las nanopartículas placebo, los cuales se esperaba que no afectaran al crecimiento del tumor, y por tanto no hubiera riesgo de desarrollar tumores demasiado grandes que pudieran implicar el sacrificio de los ratones antes de lo previsto.

El tamaño del tumor se obtuvo midiendo dos diámetros perpendiculares del mismo cada tres días y calculando el volumen de cada tumor aplicando la ecuación incluida en la metodología del trabajo. Una vez se finalizó el tratamiento, los ratones se sacrificaron, su tumor se aisló y una sección del mismo se fijó en paraformaldehído 4%. El resto del tumor, junto con muestras de plasma, el útero y los ovarios, hígado, bazo, pulmones y riñones se congelaron para ser procesadas después en el estudio de biodistribución del fármaco.

Las muestras de tumores fijadas en paraformaldehído 4% se incluyeron en parafina para la preparación de bloques sólidos con los que llevar a cabo los cortes de tejido necesarios para las tinciones histológicas y los estudios de inmunohistoquímica.

El estudio histológico de los tumores se llevó a cabo mediante la realización de dos tinciones básicas: hematoxilina-eosina y azul de toluidina.

El estudio de inmunohistoquímica se basó en la detección de Ki-67, un antígeno nuclear presente en células proliferativas y ausente en células quiescentes, a través de un anticuerpo primario específico de dicho antígeno (anticuerpo anti-Ki 67 humano realizado en ratón). Para revelar la presencia de dicho antígeno, se empleó un método de fluorescencia tras la incubación con el anticuerpo primario, usando un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (anticuerpo realizado en conejo anti-ratón y unido a rodamina). Para asegurar la especificidad del anticuerpo primario, algunos cortes se incubaron sólo en presencia del anticuerpo secundario para emplearlos como control negativo.

Para estudiar la biodistribución del tamoxifeno y uno de sus metabolitos más importantes, el 4-hidroxitamoxifeno, las muestras de plasma, órganos y tumores se homogenizaron siguiendo el procedimiento descrito en la metodología. A continuación se llevó a cabo la extracción del fármaco de cada una de ellas mediante un disolvente orgánico y los extractos fueron procesados mediante HPLC.

Resultados:

Para evaluar la actividad antitumoral del tamoxifeno administrado en las nanopartículas y la capacidad de vectorización del tratamiento empleando nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico se empleó un modelo de tumor de mama xenograft desarrollado en ratones atímicos. El tratamiento con las nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar, con fármaco y sin él, así como con el fármaco en disolución, comenzó una vez los ratones hubieran desarrollado tumores palpables, administrando la dosis correspondiente de cada tipo de tratamiento cada 3 días durante 12 días. Todos los tratamientos fueron bien tolerados por los animales ya que no se produjeron pérdidas de peso significativas (Datos no mostrados).

La medida del volumen del tumor se realizó cada tres días para estudiar la evolución del tumor (Figura 1). Además, con estos valores se establecieron dos velocidades de crecimiento del tumor (Tabla 1): V_1 o velocidad de crecimiento del tumor en cada grupo antes de comenzar los tratamientos; y V_2 o velocidad de crecimiento del tumor tras el comienzo los tratamientos, cuyos valores se recogen en la Tabla 2. Con estos valores, se calculó el índice V_2/V_1 para analizar posibles diferencias entre el crecimiento del tumor en cada grupo antes y después del tratamiento.

Como se puede apreciar en la Figura 1A, los tumores de los ratones pertenecientes al grupo control y al grupo de las nanopartículas placebo crecieron rápidamente y se mantuvieron así durante todo el experimento. Estos grupos presentaron valores de V_1 muy similares, lo que indicó que el crecimiento

de todos los tumores era muy similar antes de comenzar los tratamientos. Sin embargo, se obtuvieron diferentes índices V_2/V_1 (Tabla 2). En el caso del grupo control, la velocidad de crecimiento del tumor antes y después de las inyecciones de suero salino fue igual, con lo que estas inyecciones no modificaron la progresión de los tumores. En cambio, los tumores tratados con las nanopartículas placebo obtuvieron un valor de $V_2/V_1 > 1$ (Tabla 2), lo que indicó que las nanopartículas sin fármaco, especialmente la composición B-50-50-FOL NP, parecían estimular el crecimiento del tumor.

En cuanto a los tumores tratados con tamoxifeno se observó una disminución de la velocidad de crecimiento del tumor tras el comienzo de los tratamientos con fármaco ($V_2 < 1$, Tabla 2), independientemente de su velocidad de crecimiento V_1 . Esto fue indicativo de que en los tres casos el fármaco estaba ejerciendo su acción antitumoral. Sin embargo, en el caso de los ratones tratados con las nanopartículas vectorizadas TMX-B-50-50-FOL NP se detectó la remisión de los tumores desde el comienzo de este tratamiento, con volúmenes de tumor significativamente más bajos a día 27 y 33 que a día 24 cuando comenzó la terapia. Como resultado, se obtuvo un valor negativo de V_2 para este grupo (Tabla 2). Esta misma tendencia parecía observarse con las nanopartículas TMX-B-50-50 NP a partir del día 30, pero no pudo establecerse una remisión de tumor estadísticamente significativa. Consecuentemente, la administración de tamoxifeno vehiculizado en las nanopartículas funcionalizadas TMX-B-50-50-FOL NP pareció resultar más efectivo que sus análogos sin funcionalizar y el propio fármaco en disolución.

Con el objetivo de confirmar la efectividad del sistema vectorizado, se realizaron estudios histológicos e inmunohistoquímicos de los tumores procedentes de cada grupo de tratamiento.

Los resultados de los estudios histológicos mediante la tinción de azul de toluidina y hematoxilina-eosina se mostraron en la Figura 2 y Figura 3, respectivamente. La interpretación de las ambas tinciones permitió obtener las

siguientes conclusiones. En el caso de los tumores del grupo control, se observó la presencia de células bien definidas, en cuyos núcleos se podía observar la cromatina dispersa y nucléolos prominentes (Figura 2A). Además, se encontraron muchas células en diferentes fases de división celular (Figura 2A y 3A). Los tumores obtenidos de los grupos tratados con las nanopartículas placebo, tanto B-50-50 NP como B-50-50-FOL NP presentaron un aspecto muy similar a los del grupo control, con lo que las conclusiones extraídas fueron las mismas (imágenes no mostradas). Sin embargo, se detectaron diferencias estructurales muy claras entre estos grupos y los tratados con tamoxifeno, especialmente respecto a las nanopartículas TMX-B-50-50-FOL NP.

Los tumores tratados con estas nanopartículas mostraron una elevada desorganización estructural, como muestran las Figuras 2C y 3C. Se encontraron zonas de tejido retraído, con células muy adheridas y cuyas estructuras no estaban claramente definidas. Además, se observó la ausencia o poca presencia de mitosis, confirmando la actividad citostática del fármaco en estos tejidos. En el caso de los tumores tratados con tamoxifeno en disolución (Figura 2D y 3D) y con las nanopartículas TMX-B-50-50 NP (Figuras 3B y 3C) también se apreciaron algunas diferencias respecto a los tumores del grupo control, como la presencia de áreas más desorganizadas y menos células en fase mitótica que en el caso control. Sin embargo, estos tratamientos no parecieron ser tan efectivos como el realizado con las nanopartículas funcionalizadas. De hecho, se encontraron restos de estas nanopartículas en las tinciones de los cortes procedentes de este grupo de tratamiento, indicando que el sistema TMX-B-50-50-FOL NP llegó con éxito a la región tumoral tras su administración sistémica (Figura 4).

Para diferenciar más específicamente las células proliferantes de las quiescentes se llevó a cabo la detección del antígeno nuclear Ki-67 en los tejidos tumorales. Su presencia se reveló mediante fluorescencia. Los resultados obtenidos del revelado se recogen en la Figura 5. Como se puede comprobar, la intensidad de la señal fluorescente roja fue muy superior en el caso de los tumores control (Figura 5B), especialmente localizada en las áreas centrales más

irrigadas. Lo mismo ocurrió en el caso de los tumores tratados con las nanopartículas placebo (imágenes no mostradas). La densidad de la señal fluorescente fue menor en el caso de los tumores tratados con tamoxifeno, tanto en disolución y con las nanopartículas TMX-B-50-50 NP (Figura 5K y 5E, respectivamente), pero notablemente baja en el caso del tratamiento con el sistema TMX-B-50-50-FOL NP, incluso en las zonas de mayor irrigación. Por tanto, estos resultados apuntaban también a la mayor eficacia del tamoxifeno cuando era administrado incluido en los sistemas nanoparticulados vectorizados.

Finalmente, se realizó un estudio de biodistribución del fármaco y uno de sus metabolitos, el 4-hidroxitamoxifeno, en muestras de plasma, el útero y los ovarios, hígado, bazo, pulmones, riñones y tumor de los diferentes grupos tratados con tamoxifeno con el objetivo de detectar posibles diferencias entre los tratamientos. Las concentraciones obtenidas de tamoxifeno y de 4-hidroxitamoxifeno en las muestras analizadas se recogieron en la Tabla 3. La presencia del metabolito fue detectada en el caso del hígado y pulmones de los tres grupos de ratones, sin existir diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, también se detectó en el útero y los ovarios de los ratones tratados con el fármaco en disolución, mientras que cuando se vehiculizó el tratamiento con las nanopartículas no se alcanzaron niveles detectables en estos órganos.

En el caso del tamoxifeno, sí se encontraron niveles detectables en todos los órganos con la excepción del plasma. El tamoxifeno se acumuló en gran medida en los pulmones de los ratones, independientemente del tratamiento que recibieran, pero la concentración de tamoxifeno fue significativamente más elevada en el caso de los tratados con el fármaco en disolución que en los tejidos de ratones tratados con ambas formulaciones nanoparticuladas. La misma tendencia se observó en el caso de útero y ovarios, hígado, bazo y riñones. En el caso de la acumulación de fármaco en los tejidos tumorales, se detectaron niveles similares en los tumores de ratones tratados con tamoxifeno en disolución que los tratados con las nanopartículas TMX-B-50-50-FOL NP, mientras que se determinaron niveles significativamente más bajos al tratarlos con el sistema

TMX-B-50-50 NP. Por tanto, la acumulación de fármaco en órganos no diana fue mayor cuando se administraba en disolución que cuando se administraba vehiculizado en los sistemas poliméricos, salvo en el caso del tejido tumoral donde las nanopartículas TMX-B-50-50-FOL NP alcanzaron niveles de fármaco similares a los del fármaco libre.

Targeting Tamoxifen to Breast Cancer Xenograft Tumours: Preclinical Efficacy of Folate-Attached Nanoparticles Based on Alginate-Cysteine/Disulphide-Bond-Reduced Albumin

A. Martínez · E. Muñoz · C. Teji3n · I. Iglesias · J. M. Teji3n · M. D. Blanco

Received: 27 July 2013 / Accepted: 20 October 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

ABSTRACT

Purpose *In vivo* evaluation of tamoxifen (TMX)-loaded folate-targeted nanoparticles prepared from a mixture of disulphide bond reduced bovine serum albumin (BSA-SH) and alginate-cysteine (ALG-CYS) as targeted delivery systems of TMX to tumour tissues.

Methods TMX in solution, TMX included into folate-nanoparticles and their non-targeted analogues were intravenously administered to nude mice carrying xenograft MCF-7 tumours. The antitumor activity of these systems was characterized in terms of tumour growth rate, histological and immunohistochemical analysis of tumour tissues and TMX biodistribution.

Results TMX-folate-attached nanoparticles caused tumour remission whereas free TMX or TMX-non-targeted nanoparticles could only stop the tumour development. The histological evaluation of tumour tissues showed that those treated with folate-conjugated systems presented the most quiescent and disorganized structures. Additionally, the lowest concentrations of TMX accumulated in non-targeted organs were also found after administration of the drug using this formulation.

Conclusions This study demonstrated that TMX-loaded folate-targeted systems were capable of reaching tumour sites, so enhancing the *in vivo* anticancer action of TMX, and allowing a new administration route to be applied and some of the current TMX therapy problems to be overcome.

KEY WORDS folic acid · nanoparticles · natural polymers · tamoxifen · targeted breast cancer therapy

ABBREVIATIONS

ALG-CYS	Alginate-cysteine conjugate
ANOVA	One way analysis of variance
BSA	Bovine serum albumin
BSA-SH	Disulphide bond reduced bovine serum albumin
B-50-50 NP	Nanoparticles based on 50% ALG-CYS and 50% BSA-SH
B-50-50-FOL NP	Folate-conjugated nanoparticles based on 50% ALG-CYS and 50% BSA-SH
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DMSO	Dimethyl sulphoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Foetal bovine serum
i.v	Intravenous administration
KCl	Potassium chloride
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
NP	Nanoparticles
PBS	Phosphate buffered saline
s.c	Subcutaneous administration

A. Martínez · I. Iglesias
Departamento de Farmacología Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid Madrid, Spain

E. Muñoz
Departamento de Biología Celular Facultad de Biológicas
Universidad Complutense de Madrid Madrid, Spain

C. Teji3n
Departamento de Enfermería Escuela Universitaria de Enfermería
Fisioterapia y Podología, Universidad Complutense de Madrid
Madrid, Spain

J. M. Teji3n · M. D. Blanco
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid
Madrid, Spain

M. D. Blanco (✉)
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Pabell3n IV
Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid
Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain
e-mail: mdblanc@med.ucm.es

TMX- B-50-50-FOL NP	Tamoxifen-loaded folate-conjugated nanoparticles based on 50% ALG-CYS and 50% BSA-SH
TMX- B-50-50 NP	Tamoxifen-loaded nanoparticles based on 50% ALG-CYS and 50% BSA-SH
4-OH-TMX	4-hydroxytamoxifen

INTRODUCTION

Targeting emerges as a new strategy to make drug delivery more specific, in that it allows more localised drug administration to be achieved and reduces the development of undesirable side effects derived from unspecific drug accumulation (1). The promising possibilities that drug targeting strategies have to offer are of notable importance in the case of cancer therapy, where the majority of anticancer treatments cause toxic side effects which considerably affect a patient's quality of life. With these new challenging opportunities we are able to face some problematic issues of cancer management, and to design personalized therapies that cause less adverse effects (2).

Advanced or metastatic breast cancer has been treated for more than 20 years with TMX (3), a selective oestrogen-receptor modulator (SERM), which presents certain limitations, such as low solubility in water, which forces its oral administration, and some important side effects, like endometrial cancer development due to its oestrogen-agonist role in the uterus. Thus, the vectorization of TMX therapy could overcome some of these problems and would enhance the efficacy of this drug.

The functionalization of nanoparticle surfaces with biomolecules that interact with specific receptors over-expressed in targeted cells is an useful approach to achieve drug targeting at the cellular level (4). Folic acid is a common ligand frequently used in targeting strategies due to the over-expression of folate receptors (FR) in several types of human cancer cells (e.g. prostate, ovarian and breast cancer cells) and its high binding affinity for FR (FR, $K_d \sim 10^{-10}$ M) (5). Additionally, folic acid offers a ligand-activated endocytosis pathway for drugs, such as TMX, that need to be internalized by cells in order to carry out their function (6).

Tamoxifen-loaded nanoparticles prepared from several mixtures of thiolated-alginate (ALG-CYS) and modified albumin (BSA-SH) have been shown to be good candidates for use as controlled delivery systems, either *in vitro* (7,8) or *in vivo* (9), where TMX antitumor efficacy was enhanced following their subcutaneous administration.

In this study, the anticancer activity of TMX-loaded folate-targeted nanoparticles, which have recently been characterized

in vitro (10), was evaluated by using a xenograft breast cancer model developed in nude mice by intravenous administration, and by comparing their anticancer action to their non folate-targeted analogue nanoparticles and to TMX administered free in solution.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Folic acid, alginate sodium salt (viscosity 200.00–400.000 cps), tamoxifen (TMX), 4-hydroxytamoxifen (4OH-TMX), 17- β -estradiol valerate, sesame oil, *N*-hydroxysuccinimide (NHS), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), gentamicin (50 μ g/ml), dimethyl sulphoxide (DMSO) and paraformaldehyde were purchased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). Sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl; 37%), absolute ethanol, xylene, acetonitrile, triethylamine, tris(hydroxymethyl) aminomethane and potassium dihydrogenphosphate were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Bovine serum albumin (BSA, Fraction V) and dehydrated disodium hydrogen phosphate were purchased from Merck (Barcelona, Spain). Foetal bovine serum (FBS), penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 μ g/ml), L-glutamine (200 mM) and 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA were purchased from Invitrogen Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Dulbecco's modified Eagle medium was purchased from Lonza (Belgium).

Preparation of Non-folate-Conjugated Nanoparticles

Non folate-conjugated nanoparticles based on a mixture of BSA-SH and ALG-CYS were prepared following the protocol described in previous works (7). Briefly, disulphide bonds of BSA were reduced with 2-mercaptoethanol to prepare BSA-SH, and L-cysteine molecules were attached to the alginate structure using a carbodiimide-mediated reaction to synthesized ALG-CYS conjugate. (8). Then, 100 mg BSA-SH and 100 mg ALG-CYS were dissolved in 20 ml 1 mM HCl with vigorous stirring. The suspension was sonicated (Branson sonifier 450) and the pH was raised to 6.5–6.8 with 1 M NaOH. The reaction proceeded for 12 h under vigorous stirring. 5 ml of a solution of L-cysteine (0.06 mM) were then added and the reaction was maintained for a further 5 h to block residual free thiol groups. After this time the resulting suspension was centrifuged (41000 rpm, 15 min, Beckman Coulter Optima L-100 XP Ultracentrifuge), and the nanoparticles (B-50-50 NP) were freeze dried for 24 h at -110°C . As previous studies indicated, the final BSA-SH/ALG-CYS ratio in the nanoparticle composition was 1.16/1 (8).

Preparation of Folate-Conjugated Nanoparticles

Folate-conjugated B-50-50 nanoparticles (B-50-50-FOL NP) were prepared according to the method carried out in previous studies (10). Briefly, NHS-folate (50 mg), obtained by following the protocol developed by Lee and Low (11) was dissolved in 1.0 ml DMSO and added slowly to 2 ml of the stirred nanoparticle suspension (10 mg NP/ml, while the pH was adjusted to 10 using 1 M carbonate/bicarbonate buffer). After stirring for 45 min at room temperature the reaction mixture was centrifuged and washed (41000 rpm, 20 min) to separate unreacted folic acid and other by-products. Finally, B-50-50-FOL nanoparticles were freeze dried for 24 h at -110°C .

Preparation of Tamoxifen-Loaded Nanoparticles

B-50-50 NP and B-50-50-FOL NP were loaded with tamoxifen following the protocol described in a previous work (7). Briefly, 20 mg B-50-50 NP and 20 mg B-50-50-FOL NP were suspended in 1 ml 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TMX solution (in ethanol), and incubated for 12 h at room temperature. The suspensions were then centrifuged (41000 rpm, 15 min) and the nanoparticles were again freeze-dried. TMX-B-50-50 NP and TMX-B-50-50-FOL NP were obtained and, together with their respective unloaded nanoparticles, were used for the *in vivo* studies. Some of their physicochemical characteristics, which were determined in previous works (7,10), have been collected in Table I.

Cell Culture

Human breast adenocarcinoma MCF-7 cells were obtained from Dr. von Kobbe (Chimera Pharma of Bionostra group), whose original source was ATCC® and between 20 and 25 passage numbers. The folate receptor expression in this cell line was previously assessed (10), and a Fluorescent Index FI=8.9 was obtained. The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium, supplemented with 10% heat inactivated FBS, penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), L-glutamine (200 mM) and gentamicin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in an humidified incubator at 37°C and 5% CO_2

atmosphere (HERA cell, Sorvall Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Germany). The cells were plated in a 75-cm^2 flask (Sarstedt Ag and Co., Barcelona, Spain) and were passaged when reaching 95% confluence, by gentle trypsinization. For inoculation into nude mice, the cells were suspended in DMEM prior to injection.

Animals and Implantation of Tumour Cells

The implantation of tumour cells into animals in order to develop palpable tumours was carried out in accordance with the following protocol, which was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of Complutense University of Madrid, and which had already been utilised in a previous work (9). Briefly, four-week-old female nu/nu athymic nude mice (Harlan Inc, Indianapolis, IN, USA) were maintained under sterile conditions with food and water *ad libitum*. Cultured cells (10^7 cells/0.3 ml DMEM) were inoculated subcutaneously into the right flank of each mouse through a 23-G needle under isofluran anaesthesia conditions. $17\text{-}\beta$ estradiol valerate s.c. injections (50 μg in 0.1 ml sesame oil) were performed immediately after cell transplantation and repeated once a week to sustain tumour growth (12). After the development of palpable solid tumours ($\sim 400\text{ mm}^3$), hormonal treatment was stopped and the mice were divided into six groups of five each: untreated mice (saline serum); mice treated with 5 mg/ml placebo B-50-50 NP and B-50-50-FOL NP (drug-unloaded); mice treated with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ free tamoxifen, and mice treated with 5 mg/ml TMX-B-50-50 NP and TMX-B-50-50-FOL NP (eq. to 4 μg tamoxifen). Intravenous injections (200 μl) were administered through the tail vein every 3 days over 12 days.

Since very different tumour volumes were obtained before the start of each treatment, the groups were organized according to the following criterion: the biggest and the most vascularised tumours were selected for the formation of TMX treatment groups (free TMX and TMX-loaded NP) because TMX treatment was expected to slow down tumour growth and might avoid an excessive tumour growth, which could imply the sacrifice of those mice. The smallest tumours were reserved for control and unloaded-NP groups, because it

Table I Physicochemical Characteristics of the Nanoparticles Used in the *in vivo* Study

	Mean size (nm)	Zeta potential (mV)	Folic acid content ($\mu\text{mol}/\text{g}$ NP)	Amount of TMX loaded ($\mu\text{g}/\text{mg}$ NP)	Uptake of Coumarin-loaded NP by MCF-7 cells at 24 h (μg NP/ cm^2)
B-50-50 NP	449 [7]	-50 ± 6 [7]	–	–	13 ± 1 [10]
B-50-50-FOL NP	68 [10]	-23.4 ± 0.6 [10]	143 ± 25 [10]	–	36 ± 7 [10]
TMX-B-50-50 NP	446 [7]	-37 ± 9 [7]	–	4.1 ± 0.6 [7]	–
TMX-B-50-50-FOL NP	76 [7]	42 ± 2 [10]	143 ± 25 [10]	4.2 ± 0.3 [10]	–

Values in square brackets correspond to the number of the reference

was hypothesized that those treatments would not have any effect on tumour growth. Thus, tumours could continue growing without sacrificing any animal due to excessive tumour size. Additionally, mice with similar tumour volumes were selectively grouped together to diminish intra-group standard deviation.

Tumour size was evaluated every three days and its value was estimated using the following equation: tumour volume = $0.5 \times (W^2 \times L)$, where W is the smaller perpendicular diameter and L is the larger perpendicular diameter. Following completion of the treatment schedule, the mice were sacrificed. The tumours were isolated, and sections of these were taken and fixed in paraformaldehyde 4%. The remaining tumour samples, together with selected extracted organs (liver, lungs, uterus and ovaries, spleen and kidneys) and plasma samples, were frozen for later TMX quantification studies.

Tumour Histology and Immunohistochemistry Studies

Tumours were washed in ethanol and xylene after the fixation step, and embedded in Paraplast® (Surgipath®, Leica). They were then cut for both histological observation (9) using toluidine blue and hematoxylin-eosin staining methods (13), and for immunohistochemical studies, using the Ki-67 labelling test (9,14). The presence of Ki-67 was determined using a purified mouse anti-human Ki-67 primary antibody (1:25, BD Biosciences Pharmingen, USA), which was after revealed using a secondary antibody attached to a fluorescence dye (Rabbit anti-mouse rhodamine-conjugated as second antibody, 1:1000, Aviva Systems Biology). Some tissue sections were treated only with the second antibody and were used as negative controls to ensure specific staining of the Ki-67 positive cells.

Quantification of Tamoxifen and 4-Hydroxytamoxifen in Plasma and Tissues

The biodistribution of TMX and its metabolite, 4-hydroxytamoxifen (4OH-TMX), in several organs and tissues from treated mice was determined following the protocol developed in previous studies (9). Briefly, liver, lungs, uterus and ovaries, spleen, kidneys and tumour samples were homogenized (Heidolph RZR 2050 electronic) at 1200 rpm in ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. The homogenates and plasma samples were mixed with an equal volume of acetonitrile and then centrifuged at 13250 rpm for 6 min. The supernatants were analyzed by high performance liquid chromatography using a fluorescence detector (15). Standard solutions (5–500 ng/ml) of TMX and 4OH-TMX in acetonitrile/water (50/50, v/v) were used to obtain the calibration curves, and a good linear correlation ($r^2=0.99$) was obtained.

Statistical Analysis

Results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using one way analysis of variance (ANOVA) following by Bonferroni post-hoc analysis with computer software SPSS 19.0. A P -value < 0.05 and $P < 0.01$ was considered significant and very significant, respectively.

RESULTS

Tumour Evolution Analysis

The anticancer activity of TMX-loaded nanoparticles was evaluated comparatively to the activity of TMX in solution and the placebo NP using a MCF-7 xenograft nude mice model. All treatments were well tolerated since none of the treatment groups showed significant weight loss (data not shown).

Tumour volume was measured every 3 days over 36 days to observe the tumour evolution of each group (Fig. 1). Two values of tumour growth rate were then determined for each treatment group (Table II): the first was calculated considering the period of time before treatment started (V_1); the second was determined from the beginning of the treatment until the end of the experiment (V_2). The V_2/V_1 ratio was then calculated for each group (Table II).

As it can be observed in Fig. 1a, control and unloaded-NP treated groups displayed tumours with ever increasing volumes until the end of the experiment. They showed similar V_1 values but different V_2 values. Consequently, different V_2/V_1 ratios were obtained for each group (Table II). In the case of the control group V_1 and V_2 were equal, meaning that serum saline injections did not affect tumour growth rate during the whole experiment. However, the treatment with unloaded B-50-50 NP and, especially, with B-50-50-FOL NP caused a stimulation of tumour growth, since both ratios V_2/V_1 were > 1 (Table II).

Regarding the TMX-treated groups, similar tumour volumes were detected for TMX-B-50-50-FOL NP and free TMX groups before treatment started, with similar V_1 values (Table II), while TMX-B-50-50 NP treated mice showed the highest V_1 value. Despite these different values of tumour growth rate before treatment administration, the three groups showed lower V_2 values than their respective V_1 , and even a negative V_2 value was obtained in the case of TMX-B-50-50-FOL NP group (Table II). This fact indicated that TMX-B-50-50-FOL NP treatment caused the remission of tumours from the first day of the treatment (Fig. 1), since significantly lower ($p < 0.05$) tumour volume values were found at day 27 and 33 than at day 24, when the treatment started. Meanwhile, either free TMX or TMX-B-50-50 NP treatment slowed down the tumour evolution from the start of

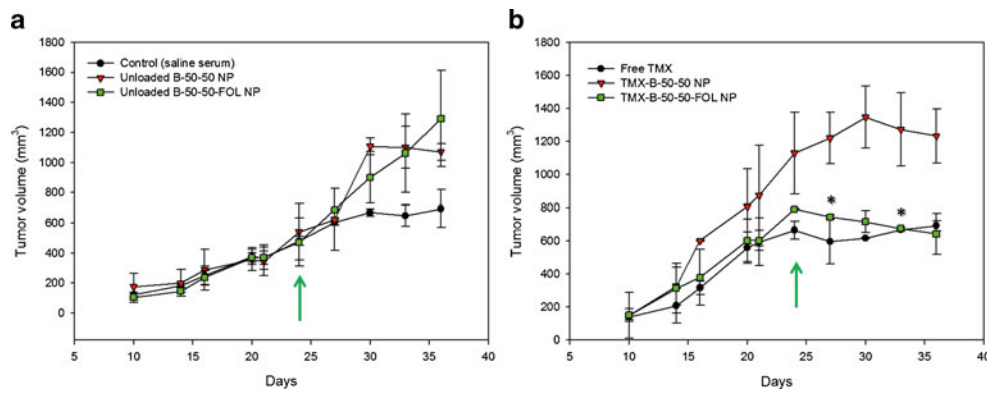


Fig. 1 Tumour evolution of control and placebo nanoparticles treated groups (a) compared with TMX-loaded NP and free TMX treated groups (b). Green arrows indicate the day of the treatment start (day 24) following the development of palpable tumours in mice. The values are expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 5$). Data marked with * showed significant ($p < 0.05$) statistical differences with regard of the tumour volume value at day 24.

these treatments. In the case of free TMX, tumour volume continued increasing slowly until the end of the experiment. But in the case of TMX-B-50-50 NP treatment, the tumour volume seemed to start diminishing from day 30, and the rate of tumour growth was calculated to be negative (V_3) (Table II). Nevertheless, significant differences ($p > 0.05$) were not found in this case between tumour values at day 33 and 36 with respect to that one at day 30.

The results indicated that the administration of TMX incorporated in TMX-B-50-50-FOL NP was the most effective treatment compared to TMX administered in a free state or TMX trapped in non-targeted NP.

Tumour Histology and Immunohistochemistry Studies

Histological analysis of tumour tissues from TMX-treated and untreated mice was performed as shown in Fig. 2a. The control tumour cuts showed polyhedral cells, where nuclei containing dispersed chromatin and prominent nucleoli were present. These tissues showed high mitotic activity, since the cells were frequently seen in different phases of division (Fig. 2a). Similar conclusions were extracted from the hematoxylin-eosin stain (Fig. 3a). The appearance of tumour cuts treated with unloaded nanoparticles, either B-50-50 NP or B-50-50-FOL NP,

resulted in very similar images to those obtained from the control group. Consequently, the same conclusions about these tissues were arrived at (pictures not shown). In the case of TMX-treated tumours, clear differences could be observed compared to untreated tumours. More highly disorganized and retracted tissues with poorly defined cells and low mitotic activity are to be seen in Figs. 2(b, c and d) and 3(b, c and d). This fact became much more noticeable in the case of tumours treated with TMX-B-50-50-FOL NP, which presented the most disorganized structure (Fig. 2c) showing areas with high cellular adhesion and cellular contraction. Furthermore, mitoses were mostly absent, not only in Fig. 2c but also in Fig. 3c. Although free TMX and TMX-B-50-50 NP exerted a considerable antitumor activity on tumour tissues, the treatment with TMX-B-50-50-FOL NP seemed to be much more effective. In fact, some residual nanoparticles were detected inside TMX-B-50-50-FOL NP treated tumour samples stained by toluidine-blue, as Fig. 4 illustrates.

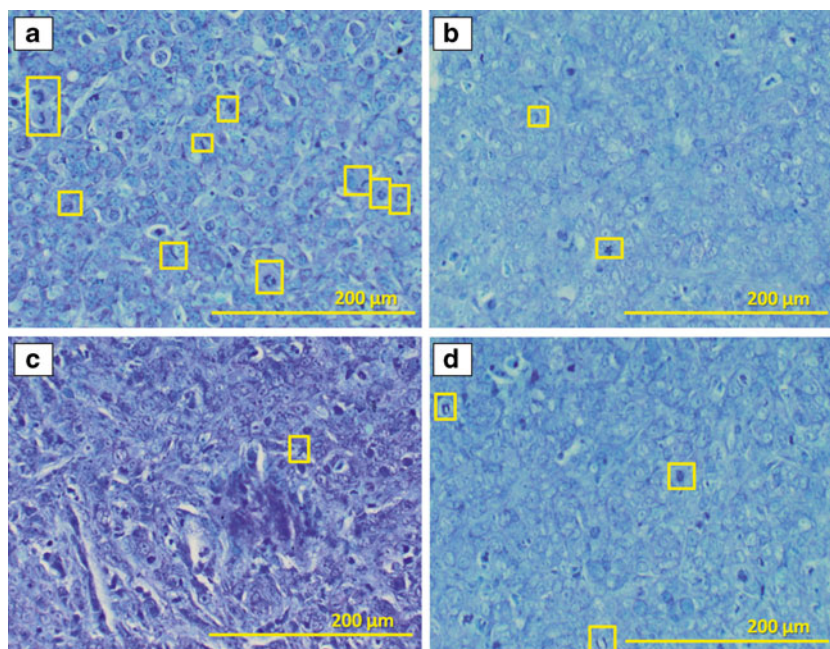
Additionally, a Ki-67 cell proliferation assay was carried out to differentiate proliferating cells from dead cell populations in the tissues. As Fig. 5 shows, the highest fluorescent signal was obtained in the case of tumours from control group (5B), especially in the central area of the tumour section, where more blood vessels were located. Similar results

Table II Tumour Growth Rates During the Treatment Period and Tumour Growth Ratios of Different Groups

Tumour growth rate and tumour growth ratio			
Group of treatment	Before treatment start: 10–24 days (V_1) (mm^3/day)	After treatment start: 24–36 days (V_2) (mm^3/day)	V_2/V_1 Ratio
Control (saline serum)	25 (0.961) ^a	25 (0.961) ^a	1
Unloaded B-50-50 NP	26 (0.929) ^a	46 (0.991) ^a	1.7
Unloaded B-50-50-FOL NP	27 (0.972) ^a	67 (0.998) ^a	2.4
TMX-loaded B-50-50 NP	70 (0.983) ^a	d24-d30: 36 (0.991) ^a (V_2) d30-d36: -19 (0.970) ^a (V_3)	V_2/V_1 : 0.5 V_3/V_2 : -0.5
TMX-loaded B-50-50-FOL NP	46 (0.990) ^a	-12.36 (0.995) ^a	-0.3
Free TMX	42 (0.960) ^a	11.39 (0.970) ^a	0.3

^a Value in parenthesis is r^2

Fig. 2 Histological appearance of the epithelial-like cortex of MCF-7 cell untreated tumour (**a**), TMX-B-50-50 NP treated tumour (**b**), TMX-B-50-50-FOL NP treated tumour (**c**) and free TMX treated tumour (**d**), using the toluidine blue staining method (magnification 40X). Boxes indicate the presence of cells in different stages of mitotic division. Yellow bars represent 200 μm .



were obtained in the case of tumours treated with placebo NP (pictures not shown). In contrast, low fluorescent signals were observed in the tumours from TMX-treated groups (E, H, K), meaning that the presence of the antigen in these tissues was significantly reduced and that TMX was exerting its anticancer action. However, the lowest fluorescent signal was detected when TMX was administered trapped in TMX-B-50-50-FOL NP (Fig. 5h), even in the areas surrounding the blood vessels. It would appear that, as a consequence, the number of proliferating cell populations

was noticeably reduced due to the enhanced antitumor activity of TMX when it was included in folate-targeted NP. This agreed with the results obtained in the histological study.

Quantification of Tamoxifen and 4-Hydroxytamoxifen in Plasma and Tissues

The concentration of TMX and 4OH-TMX was determined in plasma and organ samples to study possible differences in

Fig. 3 Histological appearance of the epithelial-like cortex of MCF-7 cell untreated tumour (**a**), TMX-B-50-50 NP treated tumour (**b**), TMX-B-50-50-FOL NP treated tumour (**c**) and free TMX treated tumour (**d**), using the hematoxylin-eosin staining method (magnification 40X). Boxes indicate the presence of cells in different stages of mitotic division. Yellow bars represent 200 μm .

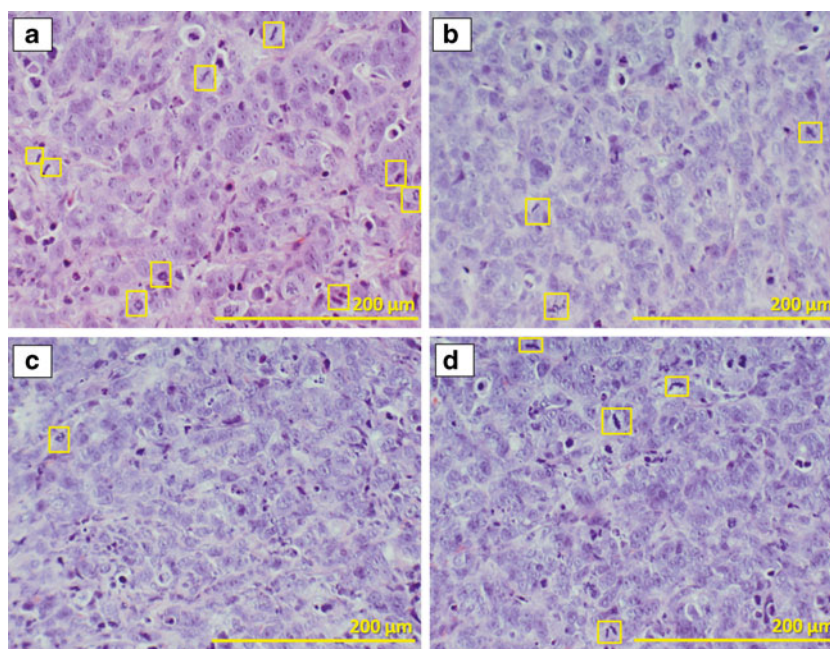
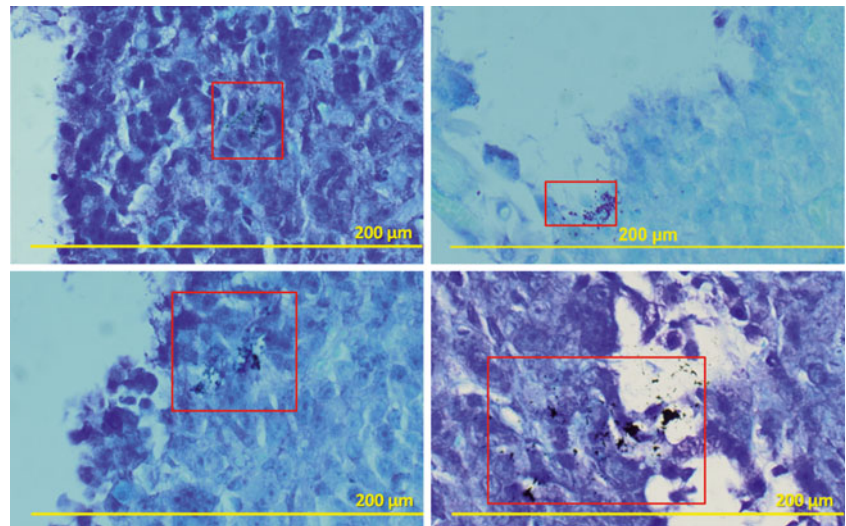


Fig. 4 Toluidine blue stained samples from TMX-B-50-50-FOL NP treated tumours where the presence of some residual TMX-B-50-50-FOL NP was evidenced. Yellow bars represent 200 μm .



the TMX biodistribution when it was administered in solution, or when it was given loaded in the NP.

Table III shows the concentration of TMX and 4OH-TMX in plasma and mice tissues after 12 days of treatment with free TMX and TMX-loaded nanoparticles. 4OH-TMX was detected in all liver and lung samples irrespective of the treatment, and significant differences were not found between them. It was also detected in the uterus and ovaries from free TMX treated mice, but was not detectable in the case of the

uterus and ovaries coming from mice treated with TMX-loaded NP.

In the case of TMX biodistribution, detectable drug concentrations were obtained in all analysed tissues, with the exception of plasma samples. There was a high accumulation of TMX in the lungs, irrespective of the treatment. However, this value was significantly higher ($p < 0.05$) in the lung extract coming from free TMX treated mice than that from TMX-loaded NP treated groups (Table III). This situation was

Fig. 5 Representative images of the immunohistochemical detection of Ki-67 antigen in MCF-7 xenograft tumour samples using a fluorescent method: control and placebo NP (a and b), TMX-B-50-50 NP (d and e), TMX-B-50-50-FOL NP (g and h) and free TMX (j and k) treated tumours; negative controls (c, f, i and l). In blue is represented the nuclear staining with DAPI. In red, the nuclear fluorescent signal due to the presence of Ki-67 proliferating antigen. Arrows indicate the presence of some Ki-67 positive nuclei in tumour tissue treated with TMX-loaded NP. Yellow bars represent 200 μm .

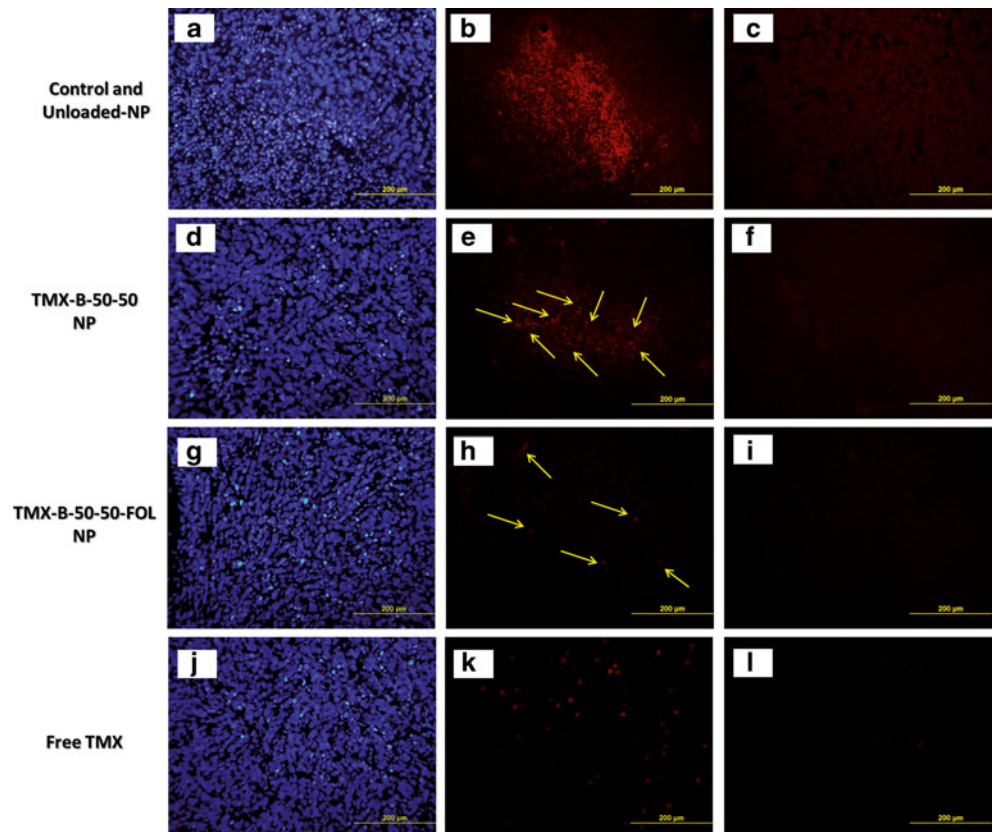


Table III Tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen Concentrations in Serum and Tissues of Nude Mice After 12 days of Treatment with 4 μg TMX Administered Free and Trapped into Nanoparticles Every 3 Days

Group of treatment and tissues	TMX (ng TMX/g tissue)	4OH-TMX (ng TMX/g tissue)
<i>Free TMX</i>		
Plasma	–	–
Liver	21 \pm 4**	70 \pm 16
Lung	102 \pm 10*	52 \pm 2
Uterus and ovaries	23 \pm 3**	16 \pm 9**
Spleen	44 \pm 4**	–
Kidneys	28 \pm 5**	–
Tumour	11 \pm 1	–
<i>TMX-B-50-50-FOL NP</i>		
Plasma	–	–
Liver	11 \pm 1	49 \pm 2
Lung	78.8 \pm 0.3	47 \pm 4
Uterus and ovaries	3.93 \pm 0.6	–
Spleen	15.5 \pm 0.6	–
Kidneys	7 \pm 3	–
Tumour	8.6 \pm 0.9	–
<i>TMX-B-50-50 NP</i>		
Plasma	–	–
Liver	10 \pm 3	34 \pm 11
Lung	82.6 \pm 0.7	38 \pm 4
Uterus and ovaries	3.4 \pm 0.3	–
Spleen	12 \pm 4	–
Kidneys	10 \pm 4	–
Tumour	4.0 \pm 0.6**	–

Data marked with * and ** showed significant ($p < 0.05$) and very significant ($p < 0.05$) statistical differences, respectively

repeated in the case of the liver, uterus and ovaries, spleen and kidneys, where TMX levels were very significantly higher ($p < 0.01$) than in organs from TMX-loaded NP treated group (Table III). TMX was similarly accumulated in the case of tumour tissues coming from free TMX and TMX-B-50-50-FOL NP treated mice, whereas very significantly lower values ($p < 0.01$) were obtained in the case of tumour tissues coming from the mice group treated with TMX-B-50-50 NP. Thus, the TMX accumulation in not-targeted tissues was significantly higher when the drug was administered freely than when it was trapped in NP. Additionally, TMX-B-50-50-FOL NP treatment achieved very similar TMX level in tumour samples to that achieved when TMX was administered as a solution.

DISCUSSION

Folic acid belongs to the family of vitamin B and is necessary to perform various metabolic reactions, including the biosynthesis

of nucleotide bases. This vitamin is highly consumed by proliferating cells, such as those from several types of cancer cells, where folate receptor (FR) is over-expressed. FR has been used as a potential target for directed cancer treatments. It can also be considered as a target of intravenous anticancer drugs since it became accessible to targeted drugs in circulation after the malignant transformation of the cells, which causes changes in cell polarity (5). Folic acid is also especially interesting, in that it displays high binding affinity ($K_d \sim 10^{-10}$ M), low immunogenicity, ease of modification, small size, stability, compatibility with a variety of organic and aqueous solvents, low cost, and ready availability (16). It was for these reasons why folic acid molecule was selected to target tumour cells with TMX loaded into BSA-SH/ALG-CYS nanoparticles. TMX-B-50-50-FOL nanoparticles were characterized *in vitro* in a previous work (10), where they showed good results as controlled TMX delivery systems against different carcinoma cells. As the conclusion to this study showed, the combined effect of the attachment of folic acid to a NP structure and the presence of alginate in the NP composition was fundamental in enhancing the interaction between B-50-50-FOL NP and tumour cells. Consequently, an *in vivo* evaluation was considered necessary to test the use of this combination as a possible alternative to current TMX administration, and to compare its *in vivo* anticancer activity with free administered TMX and non-targeted nanoparticles.

The human oral dose of TMX (20 mg/day) (17) together with the absolute bioavailability value (AB%) of TMX calculated in rodents after oral administration (15 \pm 4%) (18) were taken into account for determining the dose of TMX for this study. Considering the maximum value of AB% (19%) and an average mouse weight of 23 g, it was decided to administer a dose of 4 μg TMX every 3 days (1.3 μg TMX/day), which corresponded to 1 mg TMX-loaded NP every 3 days (0.3 mg NP/day).

The MCF-7 xenograft tumour in nude mice has been used as a common model for testing the *in vivo* anticancer activity of TMX (19,20), and some TMX derivatives (21). These studies revealed that the antiestrogen treatment with TMX normally resulted in cessation of tumour growth and subsequent tumour regression due to the cytostatic action of TMX. During the current study, tumour evolution was slowed down in the case of mice treated with TMX in solution and TMX-B-50-50-NP, whereas tumour regression was achieved with TMX-B-50-50-FOL-NP from the beginning of the treatment. Haran and co-workers (22) detected significant inhibition of tumour growth and significant tumour regression mostly after 2 weeks of treatment with TMX. In this way, treatment with TMX-B-50-50-FOL-NP allowed the tumour regression stage to be achieved earlier than with other TMX treatments. Although subcutaneous administration of TMX-B-50-50-NP was capable of enhancing the antitumor efficacy of TMX (9), the same formulation administered intravenously was not as

effective as the folate-targeted formulation. Consequently, active targeting of TMX together with the protection of the drug from degradation and passive targeting were successfully achieved when the drug was administered as TMX-B-50-50-FOL-NP. Similar results were obtained when other anticancer drugs were administered entrapped in folate-attached polymeric nanoparticles, resulting in enhancement of the efficacy of the treatment (23,24). Furthermore, unloaded NP seemed to stimulate tumour growth, especially in the case of B-50-50-FOL NP where the tumour growth rate doubled after treatment started. Previous cytocompatibility studies (7,10) performed with placebo B-50-50 NP and B-50-50-FOL NP against MCF-7 cultures revealed good cell viability results, and viability percentages were over 100% in some cases, even reaching values up to 110%. This might indicate that the polymeric composition itself could stimulate cell growth and would be responsible for the contribution to tumour growth development during the treatment with placebo NP. Consequently, TMX-B-50-50-FOL NP were able to counteract the proliferating effect of their own composition, and cause tumour regression, thus reinforcing the idea of their potential anticancer activity.

Histological analysis, using both routine and immunohistochemical staining methods, is a common procedure for obtaining useful pathological information, such as the structure and cell division stage of xenograft tumour tissues, (25,26). Tumour sections from mice treated with TMX-B-50-50-FOL-NP showed the most disorganized and quiescent tissues, with a low density of mitotic cells, which have been described as signs of tumour remission (27,28). Additionally, these tissues revealed the lowest presence of Ki-67 antigen, which has been considered to be a good prognostic sign, especially in breast cancer (29,30) These results, together with the capability of the systems to reach tumour sites after their systemic administration, suggested that TMX-B-50-50-FOL-NP was the most effective treatment. Wohlfart and co-workers (31) demonstrated the promising therapeutic potential of doxorubicin-loaded nanoparticles for systemic chemotherapy of human glioblastoma, and their results from histochemical and immunohistochemical studies were very similar to those obtained in the present study. The same conclusions were obtained from a study by Arias and co-workers (32) where gemcitabine was incorporated into chitosan nanoparticles, and where a more efficient drug action was observed.

Finally, the concentration of TMX and its metabolite, 4-OH-TMX, was measured in tumour, plasma, and other tissue samples in order to analyse the possible differences between the administration of free TMX or TMX-loaded nanoparticles. The absence of any of these molecules in plasma samples is in accordance with other previous studies where higher oral or subcutaneous doses of TMX were administered, and where undetectable serum levels of TMX were also obtained (15,20). 4-OH-TMX was detected in the liver and the lungs

of all mice. Although intravenous administration of TMX circumvents the first-pass metabolism in the liver, which is characteristic of the oral route, it was logical to expect high levels of 4-OH-TMX in this tissue since CYP3A family enzymes are mainly located in the liver and are responsible for TMX metabolism (33). The lungs were a large reservoir of the drug and its metabolite. This fact was also observed in other TMX biodistribution studies (15,34), and it was justified by the high affinity of this tissue to the amine compounds (35). In uterine and ovarian samples TMX levels were 6 fold higher ($p < 0.01$) after free TMX treatment than after treatment by TMX entrapped in both types of nanoparticle. One of the most important undesirable effects resulting from TMX treatment is the possibility of developing an endometrial carcinoma, since TMX acts as an oestrogen-agonist in the uterus (36). So in this way, high uterine levels of TMX or 4-OH-TMX, which is even more active than TMX, could contribute to the development of endometrial cancer. The administration of TMX trapped in NP resulted in lower TMX and undetectable 4-OH-TMX uterine levels and, consequently, the probability of the development of the undesirable effect was reduced. Similar results were obtained in previous studies following the subcutaneous administration of TMX-loaded non-targeted nanoparticles (9). This means that the subcutaneous or intravenous administration of TMX, as either targeted or non-targeted BSA-SH/ALG-CYS NP, caused less accumulation in non-targeted organs, and especially in the uterus and ovaries, than when the drug was free administered. When TMX levels were analysed in the tumour samples, similar concentrations were obtained in the case of free TMX treated and TMX-B-50-50-FOL NP treated mice. These concentrations were very significantly higher ($p < 0.01$) than in the case of TMX-B-50-50 NP treated tumours. Despite the absence of statistical differences for TMX accumulation in tumour tissues between TMX-B-50-50-FOL NP and TMX in solution, histological and immunohistochemical studies revealed that TMX-B-50-50-FOL NP treatment was much more effective than that of free TMX, unlike the case of free TMX this treatment was even able to cause tumour regression. Consequently, the same TMX concentration reached in tumour tissues showed an enhanced anticancer effect when it was administered using the targeted-nanoparticulated systems, and was less likely to produce undesirable side effects.

In conclusion, targeting TMX to tumour tissue through folate attachment to nanoparticles was successfully achieved and appeared to be responsible for the tumour remission potential of the TMX-B-50-50-FOL formulation, and this confirms the potential of folic acid as a tumour-specific target as widely described in the literature. This work shows the important role of folic acid and its receptor in breast anticancer therapy, and raises the possibility of administering TMX trapped in folate-targeted polymeric nanosystems

through new administration routes, e.g. intravenously, with enhanced anticancer activity and less probability of undesirable side effect development.

ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURES

The authors are grateful to Dr. von Kobbe (Chimera Pharma of Bionostra Group) for the gift of MCF7 cells. The financial support of the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (FIS PS09/01513 and MAT2010-21509-C03-03), and the FPI grant from UCM to A. Martínez are also gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Mahon E, Salvati A, Baldelli Bombelli F, Lynch I, Dawson KA. Designing the nanoparticle-biomolecule interface for "targeting and therapeutic delivery". *J Control Release*. 2012;161(2):164–74.
- Wang M, Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res*. 2010;62(2):90–9.
- Cazzaniga M, Bonanni B. Breast cancer chemoprevention: old and new approaches. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:985620.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(5):631–51.
- Lu Y, Low PS. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(5):675–93.
- Gao W, Xiang B, Meng TT, Liu F, Qi XR. Chemotherapeutic drug delivery to cancer cells using a combination of folate targeting and tumor microenvironment-sensitive polypeptides. *Biomaterials*. 2013;34(16):4137–49.
- Martínez A, Benito-Miguel M, Iglesias I, Teijón JM, Blanco MD. Tamoxifen-loaded thiolated alginate-albumin nanoparticles as antitumoral drug delivery systems. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100A(6):1467–76.
- Martínez A, Iglesias I, Lozano R, Teijón JM, Blanco MD. Synthesis and characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. Evaluation as drug delivery systems. *Carbohydr Polym*. 2011;83(3):1311–21.
- Martínez A, Muniz E, Iglesias I, Teijón JM, Blanco MD. Enhanced preclinical efficacy of tamoxifen developed as alginate-cysteine/disulfide bond reduced albumin nanoparticles. *Int J Pharm*. 2012;436(1–2):574–81.
- Martínez A, Olmo R, Iglesias I, Teijón JM, Blanco MD. Folate-targeted nanoparticles based on albumin/alginate mixtures as controlled release systems of tamoxifen. *Synthesis and in vitro characterization Pharmaceutical Research*. 2013; Accepted (*In Press*).
- Lee RJ, Low PS. Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem*. 1994;269(5):3198–204.
- Behrens D, Gill JH, Fichtner I. Loss of tumorigenicity of stably ERbeta-transfected MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;274(1–2):19–29.
- Humason GL, editor. *Animal Tissue Techniques*. 4th ed. New York 1979.
- Patel VR, Amiji MM. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. *Pharm Res*. 1996;13(4):588–93.
- Kisanga ER, Gjerde J, Schjott J, Mellgren G, Lien EA. Tamoxifen administration and metabolism in nude mice and nude rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;84(2–3):361–7.
- Reddy JA, Low PS. Folate-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to cancers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1998;15(6):587–627.
- Lee KH, Ward BA, Desta Z, Flockhart DA, Jones DR. Quantification of tamoxifen and three metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to a clinical trial. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003;791(1–2):245–53.
- Shin SC, Choi JS, Li X. Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *Int J Pharm*. 2006;313(1–2):144–9.
- Long BJ, Jelovac D, Handratta V, Thiantanawat A, MacPherson N, Ragaz J, et al. Therapeutic strategies using the aromatase inhibitor letrozole and tamoxifen in a breast cancer model. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(6):456–65.
- Osborne CK, Hobbs K, Clark GM. Effect of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Res*. 1985;45(2):584–90.
- Laine AL, Adriaenssens E, Vessieres A, Jaouen G, Corbet C, Desruelles E, et al. The in vivo performance of ferrocenyl tamoxifen lipid nanocapsules in xenografted triple negative breast cancer. *Biomaterials*. 2013;34(28):6949–56.
- Haran EF, Marezek AF, Goldberg I, Horowitz A, Degani H. Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth. *Cancer Res*. 1994;54(21):5511–4.
- Zhao P, Wang H, Yu M, Liao Z, Wang X, Zhang F, et al. Paclitaxel loaded folic acid targeted nanoparticles of mixed lipid-shell and polymer-core: in vitro and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012;81(2):248–56.
- Hao HQ, Ma QM, Huang C, He F, Yao P. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of doxorubicin loaded BSA nanoparticles with folic acid modified dextran surface. *Int J Pharmaceut*. 2013;444(1–2):77–84.
- Fernandez SV, Robertson FM, Pei J, Aburto-Chumpitaz L, Mu Z, Chu K, et al. Inflammatory breast cancer (IBC): clues for targeted therapies. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Jun 21.
- Stuelten CH, Busch JI, Tang B, Flanders KC, Oshima A, Sutton E, et al. Transient tumor-fibroblast interactions increase tumor cell malignancy by a TGF-Beta mediated mechanism in a mouse xenograft model of breast cancer. *PLoS One*. 2010;5(3):e9832.
- Bani D, Flagiello D, Poupon MF, Nistri S, Poirson-Bichat F, Bigazzi M, et al. Relaxin promotes differentiation of human breast cancer cells MCF-7 transplanted into nude mice. *Virchows Arch*. 1999;435(5):509–19.
- Lee HJ, Seo NJ, Jeong SJ, Park Y, Jung DB, Koh W, et al. Oral administration of penta-O-galloyl-beta-D-glucose suppresses triple-negative breast cancer xenograft growth and metastasis in strong association with JAK1-STAT3 inhibition. *Carcinogenesis*. 2011;32(6):804–11.
- Shahzad MM, Mangala LS, Han HD, Lu C, Bottsford-Miller J, Nishimura M, et al. Targeted delivery of small interfering RNA using reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles. *Neoplasia*. 2011;13(4):309–19.
- Pathmanathan N, Balleine RL. Ki67 and proliferation in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2013;66(6):512–6.
- Wohlfart S, Bernreuther C, Khalansky AS, Theisen A, Weissenberger J, Gelperina S, et al. Increased numbers of injections of doxorubicin bound to nanoparticles lead to enhanced efficacy against rat glioblastoma 101/8. *J Nanoneurosci*. 2009;1(2):144–51.
- Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules*. 2011;12(1):97–104.

33. Cotreau MM, von Moltke LL, Harmatz JS, Greenblatt DJ. Molecular and pharmacokinetic evaluation of rat hepatic and gastrointestinal cytochrome p450 induction by tamoxifen. *Pharmacology*. 2001;63(4):210–9.
34. Wilking N, Appelgren LE, Carlstrom K, Pousette A, Theve NO. The distribution and metabolism of ¹⁴C-labelled tamoxifen in spayed female mice. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1982;50(3):161–8.
35. Bend JR, Serabjit-Singh CJ, Philpot RM. The pulmonary uptake, accumulation, and metabolism of xenobiotics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1985;25:97–125.
36. Gao WL, Zhang LP, Feng LM. Comparative study of transvaginal ultrasonographic and diagnostic hysteroscopic findings in postmenopausal breast cancer patients treated with tamoxifen. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(15):2335–9.

DISCUSIÓN

La aplicación de la nanotecnología en el ámbito de las ciencias biomédicas y sanitarias, tanto en la prevención y el diagnóstico, como en el tratamiento de enfermedades, está protagonizando grandes avances científicos y se ha convertido en el tema central de numerosas investigaciones en los últimos años (Boulaiz et al., 2011). Los resultados obtenidos de estos estudios de investigación han proporcionado nuevas herramientas de estudio y terapia para hacer frente a diversas enfermedades cuya incidencia ha ido aumentando en las últimas décadas, principalmente en los países desarrollados debido al aumento de la esperanza de vida de la población.

El cáncer forma parte de este tipo de enfermedades. Se ha confirmado como una de las principales causas de mortalidad en los países con mayor desarrollo económico, y se estima que se convierta en la enfermedad con mayor morbilidad y mortalidad en los próximos años a nivel mundial (Bray et al., 2012). De hecho, las previsiones para el año 2030 indican la detección de 27 millones de nuevos casos de cáncer, 17 millones de muertes producidas por esta enfermedad y 75 millones de pacientes que vivirán habiendo sido diagnosticados con la misma (Boyle, 2006). Generalmente, las últimas novedades descubiertas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de dicha enfermedad, aprobadas posteriormente para su uso, se intentan incluir en las guías y pautas terapéuticas establecidas en cada país por los organismos oficiales para hacer frente a la enfermedad, lo que supone un fuerte impacto económico tanto para los pacientes como para las instituciones y, en definitiva, para la sociedad (Sharma et al., 2009).

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado en mujeres y constituye una de las principales causas de mortalidad de las mujeres europeas. Gracias a los programas de detección precoz se ha conseguido reducir la tasa de mortalidad y aumentar la supervivencia de las pacientes afectadas por esta enfermedad. Aunque el mecanismo exacto por el cual se desarrolla la enfermedad aun no está claramente establecido, existe un 70% de los casos en los que la regulación hormonal llevada a cabo por los estrógenos juega un papel fundamental (Althuis et al., 2004). Por ello, a lo largo de los años una gran parte

de las alternativas terapéuticas frente al cáncer de mama se han centrado en modular la respuesta hormonal estrogénica a través de diferentes mecanismos.

El tamoxifeno pertenece a la familia de fármacos moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMs) que fue aprobado en 1978 y 1998 por la FDA para el tratamiento y prevención del cáncer de mama hormono-dependiente, respectivamente (Cazzaniga and Bonanni, 2012). Sus resultados tanto en el tratamiento como en la prevención de la enfermedad a lo largo de estos años han sido muy satisfactorios, pero el desarrollo de efectos adversos indeseables asociados a su administración a largo plazo hace que sea necesario llevar a cabo una terapia individualizada. La gravedad de alguno de estos efectos secundarios, como el desarrollo de cáncer endometrial debido a la acción agonista del fármaco en el útero, así como las limitaciones en su administración por su baja solubilidad acuosa, le convierten en un fármaco candidato a ser vehiculizado a través de nanosistemas para intentar superar las desventajas que presenta el tratamiento actual y conseguir una terapia más efectiva.

En los últimos años, el tamoxifeno ha sido objeto de varios estudios relacionados con su posible vehiculización mediante sistemas nanoparticulados, empleando tanto materiales sintéticos (Chawla and Amiji, 2002; Dreaden et al., 2009; Shenoy and Amiji, 2005) como polímeros naturales (Coppi and Iannuccelli, 2009; Sarmah et al., 2011). Éstos últimos presentan ciertas ventajas frente a los polímeros sintéticos, tales como mejor biocompatibilidad y biodegradabilidad, menor coste económico y gran versatilidad, características que en su conjunto son difíciles de obtener con los polímeros sintéticos.

Por estos motivos se seleccionaron dos polímeros naturales, la albúmina bovina sérica (BSA) y el alginato sódico, para ser empleados en la síntesis y preparación de nanopartículas que fueron evaluadas, tanto *in vitro* como *in vivo*, para la posible vehiculización y liberación controlada de tamoxifeno. Además, la presencia de numerosos grupos reactivos en sus estructuras permitió la funcionalización de las mismas con alguna biomolécula, como el ácido fólico, que

puede ser reconocida selectivamente por las células del tejido tumoral diana y que permitiría llevar a cabo un tratamiento dirigido con este fármaco al mismo tiempo que se aprovecharían las ventajas ya ofrecidas por las nanopartículas mediante mecanismos pasivos.

La síntesis de estas nanopartículas se llevó a cabo a través de un método de coacervación y posterior estabilización mediante la formación de puentes disulfuro entre ambos polímeros previamente modificados, bien mediante la reducción de los 17 puentes disulfuro propios en el caso de la BSA (Kang Y.N, 2003) o por tiolación en el caso del alginato. El uso de polímeros tiolados, también conocidos como tíómeros, en el diseño de sistemas de administración de fármacos ofrece la posibilidad de formar enlaces entre ellos o con otras estructuras biológicas, como las glicoproteínas, siendo este tipo de enlace además muy común en los organismos, y acercándose así al concepto de biocompatibilidad que deben cumplir los nanosistemas. De hecho, se han considerado una herramienta muy útil y prometedora, principalmente en el campo de aplicación de moléculas peptídicas (Marschutz et al., 2000).

El proceso de modificación química se llevó a cabo con éxito en ambos polímeros. A través de un estudio colorimétrico, se cuantificó la concentración de los grupos sulfhidrilo libres en cada molécula. En el caso de la BSA se obtuvo una albúmina modificada (BSA-SH) con una concentración de grupos sulfhidrilo libres casi 15 veces mayor que la determinada en la BSA original. En el caso del alginato, la presencia de estos grupos en su composición ya indicó el éxito de la unión covalente de moléculas de L-cisteína para su tiolación (ALG-CYS), puesto que el alginato no presenta este tipo de grupos funcionales en su estructura original (Coviello et al., 2007).

Los estudios mediante espectroscopía infrarroja y termogravimetría en los que se compararon los espectros y perfiles de degradación térmica de los polímeros originales y de los materiales modificados confirmaron estos resultados. En el caso de la espectroscopía de infrarrojo, no pudo identificarse la

banda asociada al grupo funcional sulfhidrilo debido, por un lado, a la débil intensidad de la misma (Socrates, 2004) y, por otro lado, a la complejidad estructural de las moléculas analizadas. Estas son las razones que justifican que los espectros de la BSA y BSA-SH fueran prácticamente iguales, ya que la única modificación introducida fue la reducción de los puentes disulfuro de la molécula original. Sin embargo, si se detectaron diferencias en las bandas identificadas en el alginato original y el ALG-CYS. Estas diferencias afectaban principalmente a las señales asociadas a los grupos carboxilo. En el caso del alginato no modificado se identificaron bandas asociadas a estos grupos en forma de carboxilato (Huang RYM, 1999), mientras que en caso del alginato modificado se identificaron las bandas pertenecientes a estos grupos en su forma ácida, junto con las bandas amida I y amida II como resultado del enlace amida formado por la introducción de las moléculas de L-cisteína en la estructura original. Además, el estudio termogravimétrico reveló diferentes perfiles de degradación en el caso de las moléculas modificadas respecto a las originales. Por tanto, la modificación química de los polímeros originales quedó demostrada y confirmada a través de diferentes estudios.

Una vez confirmada la modificación de los materiales, se procedió a la síntesis de nanopartículas por coacervación. Su estabilización mediante la formación de enlaces disulfuro entre ambos polímeros se llevó a cabo mediante un proceso sencillo de oxidación de los grupos sulfhidrilo libres inducido por un cambio de pH en el medio (Bernkop-Schnurch, 2005). La gran ventaja que ofrece éste método es que se realiza completamente en medio acuoso y no requiere la utilización de ningún disolvente orgánico, con lo que se aproxima de nuevo al concepto de biocompatibilidad antes mencionado.

Con intención de estudiar diferentes variables, como la influencia de la proporción de los polímeros en la composición y su masa, así como la optimización de la síntesis para evitar posibles problemas de agregación entre las nanopartículas, se llevaron a cabo varios experimentos. Los resultados del análisis mediante microscopía electrónica indicaron que la sola presencia del

ALG-CYS no fue suficiente para la formación de las nanopartículas, mientras que sí era posible su obtención empleando únicamente BSA-SH o diferentes mezclas ALG-CYS/BSA-SH. Consecuentemente, la presencia de BSA-SH en la composición de la nanopartícula parecía ser fundamental para su formación mediante éste método. Por otro lado, se observó que la tendencia esférica de las nanopartículas parecía ir desapareciendo a favor de una forma más poliédrica a medida que la proporción de ALG-CYS iba aumentando en la composición de las nanopartículas. De acuerdo a estudios previos (Bilensoy et al., 2009), las nanopartículas que incluyen polisacáridos en su composición suelen perder cierta forma al ser bombardeadas con electrones durante el análisis mediante microscopía electrónica de barrido, al contrario que ocurre con las nanopartículas formadas por polímeros sintéticos como la poli- ϵ -caprolactona o el ácido poliláctico-co-glicólico. Por ello, la forma menos esférica observada en el caso nanopartículas C-70-30 NP podría ser atribuida en parte a este efecto.

Estos estudios también revelaron que el método de optimización que permitió obtener mejores resultados para la individualización de estas nanopartículas fue el bloqueo posterior de los grupos sulfhidrilo remanentes con L-cisteína, mientras que la desolvatación con etanol y temperatura, que había sido empleada con éxito en otros trabajos sobre nanopartículas de albúmina (Langer et al., 2003), no resultó tan eficaz en este caso.

Tanto las nanopartículas compuestas por BSA-SH (BSA-SH NP) como las nanopartículas compuestas por las mezclas de ALG-CYS y BSA-SH en proporción 50/50 y 70/30 (% p/p) (B-50-50 NP y C-70-30 NP, respectivamente) presentaron tamaños nanométricos. Sin embargo, los valores de diámetro medio que se observaron cuando la medida de tamaño se realizó a partir de la resuspensión del polvo de nanopartículas liofilizadas fueron significativamente mayores que cuando esta medida se realizó antes de la liofilización de las nanopartículas, es decir, empleando la suspensión de partículas obtenida directamente en el proceso de síntesis (514, 449 y 361 nm frente a 42, 189 y 388 nm para los sistemas BSA-SH, B-50-50 y C-70-30 NP, respectivamente). Este aumento

de tamaño pudo deberse a la influencia del proceso de liofilización. Éste es un proceso muy agresivo en el cual se incrementa la posibilidad de agregación de las nanopartículas, y su redispersión de forma individualizada suele depender en gran medida de los parámetros considerados durante el proceso de liofilización (Lee et al., 2009).

Debido a que en el procedimiento no se incluyó ningún crioprotector ni se realizó ningún gradiente de temperatura, ese aumento de tamaño pudo deberse probablemente a la presencia de agregados de nanopartículas en el medio acuoso en el cual se llevó a cabo la medida de tamaño por difusión de la luz cuasielástica partiendo del polvo liofilizado. Sin embargo, tal y como indicaron las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica, el tamaño real de las nanopartículas sería menor, principalmente en el caso de las nanopartículas BSA-SH NP y B-50-50 NP que presentaron las mayores diferencias. En cualquier caso, se ha determinado que el tamaño de poro de los vasos sanguíneos originados durante la angiogénesis tumoral puede estar comprendido en un intervalo entre 100 y 1200 nm (Hobbs et al., 1998), con lo que el tamaño obtenido en todos los casos para estas nanopartículas sería adecuado para su posible extravasación a tejido tumoral por mecanismos pasivos.

Junto con la medida de tamaño, se llevó a cabo la determinación de potencial zeta de las tres composiciones. Todas las composiciones presentaron un valor de potencial zeta negativo, lo que está de acuerdo con otros trabajos sobre nanopartículas basadas en albúmina y en alginato por separado que obtienen igualmente valores negativos de potencial zeta (Arnedo et al., 2002; Aynie et al., 1999).

Para la determinación de la composición de las nanopartículas se llevó a cabo el análisis del sobrenadante procedente de la síntesis, en el cual se cuantificó la concentración remanente de cada polímero mediante métodos colorimétricos, estableciendo que la diferencia respecto a la concentración inicial de cada uno se encontraría formando parte de los sistemas. En el caso del alginato, el método

incluyó una hidrólisis ácida en condiciones extremas de pH y temperatura, ya que el ácido algínico presenta una gran resistencia a la hidrólisis (Chandía NP, 2001). Mediante este análisis se obtuvieron los diferentes ratios BSA-SH/ALG-CYS en cada una de las composiciones. Se observó que en aquellas muestras que partían de proporciones equitativas de ambos polímeros (A-50-50 y B-50-50 NP), aunque diferían en la masa de los mismos y el volumen empleado en la síntesis, se obtuvieron ratios muy similares, próximos a 1/1, con lo que se descartó la influencia de los cambios en la masa de los reactivos sobre la composición de las nanopartículas. Sin embargo, en la composición C-70-30 NP que partía de la misma masa y volumen de reactivos que la composición B-50-50 NP pero difería en la proporción de los mismos, el ratio obtenido fue diferente (0,49/1). Por tanto, se concluyó que la proporción de los polímeros en la síntesis de las nanopartículas era un factor determinante en su composición.

Además, los estudios de espectroscopía de infrarrojo confirmaron la presencia de ambos polímeros en las nanopartículas, ya que se obtuvo un espectro de infrarrojo para las nanopartículas muy próximo al de la BSA-SH pero incluyendo algunas de las bandas características del ALG-CYS, desapareciendo una de las bandas asignadas a los grupos carboxílicos del ácido algínico que pasaron a forma de carboxilato, debido al cambio de pH inducido en la síntesis de las nanopartículas. Los resultados procedentes del estudio termogravimétrico también permitieron extraer conclusiones muy similares, ya que se observaron perfiles de degradación térmica que diferían de los determinados para los materiales modificados por separado, confirmando la obtención de un nuevo material formado por la interacción de ambos polímeros.

De acuerdo a los buenos resultados de hinchamiento que las nanopartículas demostraron en medio alcohólico, y considerando además la buena solubilidad del tamoxifeno en disolventes orgánicos, la incorporación del fármaco en las nanopartículas se realizó mediante hinchamiento de las mismas en una disolución de tamoxifeno en etanol. Se estudiaron dos formas diferentes de incluir el fármaco que diferían principalmente en el estado de hinchamiento de

las nanopartículas en el momento de la incorporación, así como en la concentración de tamoxifeno empleada en la disolución etanólica.

La primera aproximación se llevó a cabo partiendo del pellet de nanopartículas obtenido antes de ser liofilizadas, es decir, las nanopartículas se encontraban húmedas e hinchadas antes de incorporar el fármaco. La concentración de tamoxifeno en la disolución que se empleó para la carga fue de 150 µg/ml. En el segundo caso, se partió de las nanopartículas liofilizadas y en forma de polvo junto con una concentración de tamoxifeno en etanol mayor (500 µg/ml). El objetivo que se pretendió lograr fue optimizar la cantidad de fármaco incluido en los sistemas aprovechando un posible mayor hinchamiento al partir del polvo seco liofilizado combinándolo con una concentración más alta de fármaco, lo que podría mejorar la carga de tamoxifeno alcanzada en las nanopartículas. Además, el hecho de que la inclusión del fármaco se llevara a cabo antes o después de la liofilización de las nanopartículas permitiría estudiar la forma de interacción entre el fármaco y los sistemas, ya que la agresividad del proceso de la liofilización (Lee et al., 2009) podría afectar a la forma en la que el tamoxifeno podía interaccionar con las nanopartículas.

Mientras que las nanopartículas TMX-B-50-50 NP alcanzaron valores de carga muy similares mediante ambos métodos, los sistemas TMX-BSA-SH NP y TMX-C-70-30 NP optimizaron su carga al proceder a la inclusión del fármaco tras la liofilización. La extracción directa del fármaco mediante metanol permitió estudiar la intensidad de las interacciones establecidas entre el fármaco y los sistemas. En ningún caso, la extracción mediante este disolvente fue completa, quedando una importante cantidad de tamoxifeno (entre un 46 y un 67%, según el tipo de composición) retenida en los sistemas tras la extracción. Debido a que el fármaco es altamente soluble en este disolvente, el fármaco remanente en los sistemas tras este proceso de extracción debería estar interaccionando fuertemente con las nanopartículas. De hecho, se ha descrito en la literatura (Morello et al., 2003) la presencia de regiones hidrofóbicas en la albúmina que podrían interaccionar intensamente con fármacos de esta misma naturaleza,

como es el caso del tamoxifeno, por lo que esto podría explicar el hecho de que parte del fármaco quedase retenido en los sistemas tras la extracción con metanol.

El porcentaje de fármaco que sí pudo extraerse de cada composición podría estar más superficialmente localizado, con lo que las interacciones con la albúmina podrían ser menores y, por tanto, estar más débilmente unido a las nanopartículas. Además, en los sistemas TMX-BSA-SH NP y TMX-C-70-30 NP se observó un porcentaje de fármaco extraído mayor cuando la carga de tamoxifeno se realizó mediante el segundo método que cuando se emplearon las nanopartículas previamente hinchadas (50% frente a 33% y 44% para TMX-BSA-SH NP y TMX-C-70-30 NP, respectivamente). Este hecho podría indicar que la mejora en la cantidad de fármaco incorporado podría tener una localización más superficial, aumentando así el porcentaje de tamoxifeno extraído con metanol. En el caso de las nanopartículas TMX-B-50-50 NP los porcentajes de fármaco extraído que se obtuvieron fueron similares para ambos métodos de carga.

La presencia superficial del tamoxifeno en los sistemas quedó de nuevo confirmada mediante la determinación de valores de potencial zeta menos negativos en el caso de las nanopartículas cargadas con fármaco. Existen estudios (Brigger et al., 2001) que han demostrado que la presencia del tamoxifeno en la estructura de la nanopartícula conduce a la obtención de valores menos negativos de potencial zeta, pudiendo volverse positivos en algunos casos (Abbasalipurkibir et al., 2011). Debido a que el tamoxifeno es una base débil con un pK_a de 8,85, presentaría una carga positiva en la suspensión de las nanopartículas en las que se encontraría incluido, disminuyendo el potencial zeta negativo de las mismas, y confirmando la presencia superficial del mismo, característica de los fármacos hidrofóbicos (Chawla and Amiji, 2002).

Los estudios de liberación del fármaco llevados a cabo en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) volvieron a confirmar la existencia de fármaco en la superficie de las nanopartículas. La liberación del fármaco desde todas las composiciones se realizó en dos etapas. Una primera fase inicial, corta y muy

rápida, seguida por una segunda fase más larga y lenta. En la primera fase, donde se detectaron las velocidades de liberación más elevadas, se liberó el fármaco localizado más superficialmente y más débilmente unido a los sistemas. Se detectó la liberación de entre un 4 y un 37% de fármaco, en función de la composición, durante esta primera etapa. Las nanopartículas con mayor presencia de albúmina en su composición liberaron menos cantidad de fármaco en esta primera fase (entre un 4 y un 15%), mientras que las composiciones formadas por las mezclas de ambos polímeros mostraron los porcentajes más altos (entre un 12 y un 37% del fármaco incluido).

En general, los porcentajes de fármaco liberado desde los sistemas cargados tras la liofilización de las nanopartículas fueron más altos que los obtenidos desde las nanopartículas que siguieron el primer método de carga. Esto confirmó, de nuevo, la mayor presencia superficial del fármaco cuando la carga de las nanopartículas se realizó tras la liofilización, así como la importancia de la interacción entre el fármaco y la albúmina, que permitió un mayor control de la liberación en esta primera fase en las partículas compuestas en su totalidad por BSA-SH. Precisamente estas interacciones fueron las responsables de la regulación de la liberación del fármaco más fuertemente unido en la segunda fase de la liberación, donde se detectaron velocidades de liberación mucho más bajas, especialmente en las nanopartículas TMX-BSA-SH NP. Tras esta segunda fase de liberación, en algunos casos se estableció una fase de equilibrio entre el medio de liberación y los sistemas en la que a determinados tiempos se detectaron concentraciones de tamoxifeno más bajas que las determinadas como máximos de liberación. Teniendo en cuenta que el fármaco es estable en el medio de liberación durante varios días (Blanco et al., 2010), y que los ensayos de liberación no duraron más de 24 h, se descartó como causa de este hecho la degradación del tamoxifeno. En su lugar, se consideró la posibilidad de que el fármaco pudiera ser de nuevo captado por los sistemas mostrando un comportamiento similar a un hidrogel, lo que posteriormente se vio confirmado por la aplicación del modelo matemático que describe este comportamiento.

En ninguno de los casos se consiguió la liberación completa del fármaco incluido en los sistemas, quedando retenido entre un 39 y un 77% del tamoxifeno cargado inicialmente en las nanopartículas, dependiendo de la composición y del método de carga llevado a cabo. La liberación parcial del fármaco, incluso en un medio muy favorable para la liberación del mismo en presencia de un surfactante, puede considerarse una ventaja en el caso de la administración sistémica de las nanopartículas, ya que la mayor parte del fármaco se conservará retenido en los sistemas hasta llegar a las células tumorales, donde se liberará mediante la degradación enzimática de las nanopartículas una vez internalizadas.

Así mismo, se llevó a cabo la aplicación de varios modelos matemáticos que pudieran definir la cinética de liberación del fármaco desde los sistemas. La buena correlación con el modelo de Higuchi, Korsmeyer-Peppas (Ritger and Peppas, 1987) y una aproximación de este último modelo a un mecanismo de liberación Fickiano (Chung et al., 2009) permitieron concluir que todas las composiciones mostraron un mecanismo de liberación mediante difusión Fickiana. Así mismo, se aplicó el modelo matemático de partición propuesto por Reis y colaboradores (Reis et al., 2007) para estudiar un posible comportamiento de hidrogel en estos sistemas, puesto que los porcentajes de hinchamiento en PBS previamente obtenidos fueron muy elevados. En este modelo, se estudian dos posibles opciones en la cinética de liberación: el fenómeno de partición de primer grado, que seguiría una cinética de primer orden, y el fenómeno de partición de segundo grado, que describiría una cinética de segundo orden (Blanco et al., 2008). Tras la aplicación de este modelo se observó que las composiciones BSA-SH NP y B-50-50 NP mostraron buena correlación, y por tanto, comportamiento de hidrogel, y en menor medida las nanopartículas C-70-30 NP. Precisamente, las nanopartículas con mayor presencia de albúmina en su composición fueron las que mostraron mejores índices de hinchamiento en PBS.

De acuerdo a los resultados obtenidos de estos estudios de caracterización *in vitro* de las nanopartículas, se concluyó que estos sistemas podrían ser buenos

candidatos para liberar de forma controlada el tamoxifeno, y vehiculizarlo pasivamente hacia el tejido tumoral. Por ello, el siguiente paso consistió en evaluar la eficacia de las nanopartículas como sistemas de liberación controlada de tamoxifeno frente a diferentes líneas celulares tumorales *in vitro*. Para ello, se emplearon tanto las nanopartículas sin fármaco como los sistemas con tamoxifeno incluido empleando el segundo método de carga, esto es, partiendo del polvo liofilizado, ya que éste procedimiento permitió la optimización de la carga en dos de las composiciones.

Los ensayos en cultivos celulares se llevaron a cabo en diferentes líneas celulares tumorales, puesto que la sensibilidad de las mismas a los sistemas nanoparticulados puede variar de unas líneas celulares a otras. Para estos estudios se seleccionaron dos tipos de líneas celulares. Por un lado, células MCF-7 de cáncer de mama humano positivas en la expresión de receptores de estrógeno (ER+), que han sido establecidas desde hace tiempo como una de las líneas celulares más empleadas en modelos de estudio de la actividad *in vitro* de agentes antiestrogénicos (Coezy et al., 1982). Por otro lado, se han empleado células HeLa de cáncer de ovario negativas en la expresión de receptores de estrógeno (ER-) (Sonvico et al., 2005), las cuales también presentan sensibilidad reversible a agentes antiestrogénicos a través mecanismos independientes a los receptores de estrógeno, y que se han empleado como modelo comparativo frente a las MCF-7 en estudios previos (Grenman et al., 1988).

Los ensayos de citocompatibilidad realizados con las nanopartículas sin fármaco mostraron en general la baja toxicidad de los sistemas, obteniendo en ocasiones valores superiores al 100% de viabilidad y confirmando la biocompatibilidad de estos polímeros naturales seleccionados para la preparación de las nanopartículas.

La inclusión de un fluoróforo en las nanopartículas para analizar, tanto cualitativa como cuantitativamente, la interacción de los sistemas con las células, ha sido un método muy empleado para evaluar el grado de internalización de los

sistemas en las células (Ding et al., 2005; Panyam et al., 2003). De acuerdo a los resultados, la internalización celular fue concentración-dependiente tanto en las células MCF-7 como en las células HeLa, aunque la captación celular de éstas últimas fue casi 4 veces mayor que en el caso de las células MCF-7. El hecho de que las células HeLa presenten una velocidad de división mayor (www.atcc.org) podría ser responsable, al menos en parte, de la tasa de internalización superior para esta línea celular. Estos estudios pusieron de manifiesto en ambas líneas celulares que la presencia del polisacárido en la composición de las nanopartículas permitía una mejor interacción con las células, puesto que se determinaron concentraciones de estas nanopartículas más altas que las observadas para las nanopartículas BSA-SH NP en ambos tipos celulares.

Los estudios de citotoxicidad evaluaron comparativamente la capacidad del tamoxifeno en la reducción de la viabilidad celular cuando se administró vehiculizado en las nanopartículas frente su administración libre en disolución. Los resultados demostraron que las nanopartículas con fármaco disminuían la viabilidad celular de forma más gradual que el tamoxifeno administrado en disolución en ambas líneas celulares, especialmente a la concentración de 10 μM de tamoxifeno. Esta acción citotóxica gradual podría ser consecuencia de la liberación lenta del fármaco desde los sistemas, con lo que no todo el tamoxifeno incluido estaría disponible inmediatamente para ejercer su acción, y su liberación controlada se traduciría en un efecto tóxico más gradual. A la concentración de 6 μM las diferencias obtenidas entre el fármaco vehiculizado y en disolución no fueron significativas. Además, se observó que el efecto del tamoxifeno a esta concentración sobre las células HeLa fue menor que la acción ejercida sobre las células MCF-7. Este hecho podía tener que ver con el diferente mecanismo de acción del tamoxifeno en cada línea celular (Blanco et al., 2010).

Mientras que el mecanismo antiproliferativo del fármaco sobre las MCF-7 ocurre principalmente por la inhibición de la unión de los estrógenos a su receptor (Miller and Katzenellenbogen, 1983; Shang and Brown, 2002) y la captación inespecífica del tamoxifeno mediante endocitosis inespecífica (Chawla

and Amiji, 2002), en el caso de las células HeLa se lleva a cabo mediante la activación de una serie de MAPKs (ERK2 y JUN1) que forman parte de una cadena de señalización de estrés oxidativo (Duh et al., 1997). Por tanto, al existir diferentes mecanismos de acción, la misma concentración del fármaco podría no producir el mismo efecto en ambas líneas celulares.

Finalmente, para confirmar la acción del tamoxifeno sobre el ciclo celular, se llevaron a cabo estudios de citometría en las células de ambas líneas tratadas con 6 y 10 μM de tamoxifeno durante 48 h. Los estrógenos llevan a cabo un efecto regulador del crecimiento celular mediante la unión con su receptor nuclear y su translocación, lo que desencadena una serie de procesos proliferativos. El tamoxifeno, como otros antiestrógenos, ejerce un efecto citostático y compite con los estrógenos por su unión al receptor, impidiendo la cascada de señalización que desencadena el crecimiento celular. Este hecho se traduce en un aumento de células en fase $G_0 - G_1$ (Ameller et al., 2004; Cover et al., 1999; Sutherland et al., 1983a).

En el caso de las células HeLa no se observó ningún efecto del fármaco sobre el ciclo celular de esta línea celular a ninguna de las dos concentraciones. Como se ha descrito anteriormente, el mecanismo de acción del tamoxifeno en estas células transcurre a través de la activación de MAPKs que participan en la fosforilación y activación de varios factores de transcripción así como en procesos de apoptosis, por lo que su acción es independiente del receptor de estrógenos y no habría alteración de ningún parámetro del ciclo celular (Sumbayev and Yasinska, 2006; Torii et al., 2006). Sin embargo, en el caso de las células MCF-7, se observó un aumento del porcentaje de células en fase $G_0 - G_1$ y una disminución del porcentaje de células en fase S tanto cuando las células eran tratadas con el fármaco vehiculizado en las nanopartículas como con el fármaco administrado en disolución a ambas concentraciones. Estos resultados son comparables a los obtenidos por otros grupos de investigación en los que estudiaron los cambios en el ciclo celular inducidos por el tamoxifeno administrado a dosis entre 1-12,5 μM (Sutherland et al., 1983b), así como su dependencia con el tiempo transcurrido

tras su administración (Osborne et al., 1983; Sutherland et al., 1983a; Taylor et al., 1983).

En estos estudios se determinó que la acción del tamoxifeno sobre el ciclo celular era apreciable tras 24 h de su administración, y que permanecía constante tras este tiempo. Además, también se observó un efecto concentración-dependiente. Mientras que los resultados obtenidos en nuestro estudio sí demostraron la acción del fármaco a las 48 h de tratamiento, no se pudieron establecer diferencias entre ambas concentraciones empleadas como sí lo hicieron estos trabajos previos. Sin embargo, los estudios realizados en cultivos celulares *in vitro* para determinar la sensibilidad de líneas celulares de cáncer de mama frente a la acción del tamoxifeno están muy influidos por las condiciones en las que se lleva a cabo cada experimento, lo que dificulta en muchos casos la reproducibilidad de los resultados de forma completa (Butler et al., 1981). Teniendo todo esto en cuenta, se pudo concluir que la acción ejercida por el tamoxifeno sobre el ciclo celular, tanto si era administrado empleando los sistemas nanoparticulados como si se administraba libre en disolución, era similar, por lo que la inclusión del fármaco en las nanopartículas no conllevó la pérdida del mecanismo de acción del mismo.

De esta forma, quedó demostrada la eficacia *in vitro* de estas nanopartículas poliméricas en la liberación controlada de tamoxifeno, presentándose como posible alternativa para la vehiculización de este fármaco y para el estudio de diferentes vías de administración del mismo que permitieran superar las limitaciones del actual tratamiento. Sin embargo, la vehiculización del fármaco a través de estos sistemas tendría que llevarse a cabo aprovechando exclusivamente los mecanismos pasivos que ofrecen las nanopartículas en el tratamiento de tumores sólidos, por lo que su administración sistémica podría tener ciertas limitaciones.

Por ello, se planteó la posibilidad de funcionalizar estos sistemas poliméricos con alguna biomolécula que fuera selectivamente reconocida por las células

cancerígenas de cáncer de mama, como el ácido fólico, aprovechando la presencia de grupos reactivos en las nanopartículas susceptibles de ser funcionalizados. El receptor de ácido fólico lleva a cabo un papel importante en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama (Sudimack and Lee, 2000), por lo que la vectorización activa de las nanopartículas a través de su funcionalización con esta molécula podría proporcionar buenos resultados en el tratamiento del cáncer de mama con tamoxifeno.

La unión del ácido fólico a estos sistemas poliméricos se realizó a través de los grupos amino presentes en la BSA de las nanopartículas mediante una reacción mediada por una carbodiimida, obteniendo los sistemas funcionalizados BSA-SH-FOL NP, B-50-50-FOL NP y C-70-30-FOL NP. La funcionalización se llevó a cabo con éxito, alcanzando valores de fólico unido a las nanopartículas similares a los obtenidos por Zhang y colaboradores, que llevaron a cabo la misma metodología con nanopartículas basadas en BSA (Zhang et al., 2004). Se observó que la cantidad de fólico unido era menor cuando la proporción de BSA-SH disminuía en la composición de las nanopartículas, alcanzándose una concentración de fólico unido significativamente más pequeña en el caso de las nanopartículas C-70-30-FOL NP. Ya que la unión del ácido fólico se llevaba a cabo a través de los grupos amino de la BSA-SH, era lógico esperar una menor unión de ácido fólico en esta composición que presentaba la menor proporción de BSA-SH en su composición.

La caracterización del tamaño de las nanopartículas mediante SEM desveló que todas las composiciones presentaban un diámetro medio muy pequeño (≤ 100 nm). Estos valores de tamaño se confirmaron posteriormente mediante el estudio de la difusión de la luz cuasielástica para las composiciones basadas en las mezclas BSA-SH/ALG-CYS. Sin embargo, en el caso de la formulación compuesta únicamente de BSA-SH, los valores de diámetro medio que proporcionó este segundo estudio fueron mayores que los tamaños apreciados en las fotografías obtenidas mediante SEM. Como ya ocurrió en la caracterización de las nanopartículas sin funcionalizar, esta diferencia de tamaño podría explicarse

por el fenómeno de agregación de las nanopartículas. Las nanopartículas BSA-SH-FOL NP, tanto con fármaco como sin fármaco incluido, obtuvieron valores de potencial zeta significativamente más pequeños que ± 30 mV. Este valor ha sido establecido como el mínimo para obtener una nanosuspensión físicamente estable y evitar la agregación de las nanopartículas (Muller et al., 2001). Debido a esto, las nanopartículas BSA-SH-FOL NP pudieron agregar en el medio acuoso en el que se llevó a cabo la medida para el estudio de la luz cuasielástica, proporcionando diámetros medios mayores que los realmente mostraron en la microscopía electrónica.

En el caso de las nanopartículas B-50-50-FOL NP y C-70-30-FOL NP, los valores de potencial zeta fueron más cercanos a ± 30 mV, con lo que las suspensiones de ambas composiciones fueron estables y los valores de tamaño medio obtenidos por ambas técnicas fueron muy similares. De nuevo, las nanopartículas sin fármaco obtuvieron valores negativos de potencial zeta mientras que las nanopartículas con fármaco mostraron valores positivos, como ya lo hicieron las nanopartículas sin funcionalizar de acuerdo a la composición polimérica de las mismas (Arnedo et al., 2002; Aynie et al., 1999) y a la presencia superficial del fármaco en los sistemas (Abbasalipurkibir et al., 2011), respectivamente.

Los valores de fármaco incluido en los sistemas funcionalizados fueron muy similares a los obtenidos con los sistemas sin funcionalizar, con los que la unión del ácido fólico a las nanopartículas no pareció afectar a la incorporación del tamoxifeno. La extracción con metanol del tamoxifeno incluido reveló de nuevo la presencia superficial del fármaco, confirmando los resultados obtenidos con la medida del potencial zeta. La extracción fue completa en el caso de las nanopartículas TMX-B-50-50-FOL NP y TMX-C-70-30-FOL NP, mientras que un 62% del fármaco quedó retenido en el caso de las nanopartículas TMX-BSA-SH-FOL NP tras la extracción. De nuevo, se pusieron de manifiesto las fuertes interacciones establecidas entre el tamoxifeno y las regiones hidrofóbicas de la albúmina (Morello et al., 2003).

Además, la presencia superficial del fármaco también se demostró en los estudios de liberación, donde todos los sistemas presentaron una primera fase de liberación rápida característica de los fármacos hidrofóbicos (Chawla and Amiji, 2002), seguida por una segunda fase de liberación más lenta en la que el fármaco más fuertemente retenido por la albúmina se liberó de forma más controlada. De hecho, las nanopartículas compuestas exclusivamente por albúmina liberaron porcentajes menores de tamoxifeno durante la primera etapa de liberación rápida, y además el máximo de liberación lo alcanzaron más tarde. Tanto la importancia de las fuertes interacciones del fármaco con la albúmina en la liberación como la presencia superficial del fármaco fueron ya observadas en el caso de las composiciones sin funcionalizar.

En este caso, la liberación del fármaco en presencia del surfactante (SDS) sí que se realizó de forma completa desde todas las composiciones a lo largo de las 24 h del estudio de liberación. Sin embargo, la presencia del SDS es determinante en este hecho, como se observó en estudios previos (Martínez et al., 2013). Por ello, se llevó a cabo un estudio de liberación paralelo en ausencia de surfactante en el medio de liberación, y se tomaron muestras a las 24 h del comienzo del estudio para establecer la importancia de la presencia del SDS en la liberación del fármaco. En ausencia del surfactante, tan sólo un 3-5% del fármaco incluido en los sistemas había sido liberado al medio tras 24 h de ensayo. Debido a que el SDS no se encuentra presente en condiciones fisiológicas, se podría considerar que la carga de las nanopartículas permanecería prácticamente intacta durante su transporte al tejido diana a través del torrente sanguíneo tras su administración sistémica, y, tan sólo tras su internalización celular y degradación enzimática, sería liberada en el interior de las células donde llevaría a cabo su acción localizada.

Para comprobar la eficacia antitumoral *in vitro* de estos sistemas funcionalizados con ácido fólico se llevaron a cabo estudios celulares frente a diferentes líneas, de acuerdo a su expresión de receptores de ácido fólico (FR) y de estógenos (ER). En estos ensayos se eligieron las líneas MCF-7 y HeLa, ya

usadas previamente con los sistemas sin funcionalizar, y además se trabajó con la línea T47D. Las células HeLa y T47D se han descrito en la literatura como ER(-)/FR(+) y ER(+)/FR(+), respectivamente (Geszke et al., 2011; Walter et al., 1985). Sin embargo, se ha encontrado cierta controversia en el caso de la expresión de los receptores de ácido fólico en las células MCF-7 (Walter et al., 1985). Existen algunos autores que describen esta línea como FR(-), y la emplean de hecho como control negativo en sus experimentos (Sonvico et al., 2005). Por otro lado, existen autores que la describen como débilmente positiva (Geszke et al., 2011) o incluso positiva en la expresión de estos receptores (Suzuki et al., 2007).

Por ello, teniendo en cuenta la falta de acuerdo entre los autores, se procedió a realizar la titulación de los receptores de folato en las tres líneas mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Los resultados demostraron que todas las líneas fueron positivas en la expresión de este receptor, siendo las células HeLa las que más expresaban el receptor de las tres líneas celulares. Tras la obtención de estos resultados, se concluyó que todas las líneas podían ser usadas para comprobar la eficacia antitumoral de los sistemas funcionalizados con ácido fólico.

En general, las nanopartículas B-50-50-FOL NP y C-70-30-FOL NP demostraron buena citocompatibilidad en las tres líneas celulares, al igual que ya lo hicieron sus análogos sin funcionalizar. Sin embargo, la formulación BSA-SH-FOL NP obtuvo valores más bajos de viabilidad celular en las tres líneas que los obtenidos con la composición sin vectorizar (80%-100%). Este hecho indicaba que la composición BSA-SH-FOL NP exhibía un cierto efecto citotóxico per se. Debido a que posteriormente se confirmó que la internalización celular de los sistemas BSA-SH-FOL NP se llevaría a cabo principalmente mediante el receptor de folato en las tres líneas, y que la sobre-expresión de este receptor es característica de las células tumorales, la toxicidad de estas partículas afectaría en su mayoría a las células malignas. Además, cuando el tamoxifeno estuviera incluido en esta composición, la toxicidad intrínseca del sistema podría llevar a cabo una acción sinérgica con la actividad del fármaco, potenciando así su acción anticancerígena.

En el caso de las nanopartículas B-50-50-FOL NP no pudo demostrarse que la internalización de los sistemas se llevara a cabo exclusivamente mediante el receptor de ácido fólico, con la excepción de las células T47D donde sí pudo evidenciarse. Este hecho puso de manifiesto la posibilidad de que existiera otro mecanismo de internalización inespecífico que podría actuar conjuntamente con la internalización mediada por el receptor de folato. De hecho, los ensayos de internalización celular llevados a cabo con las nanopartículas sin funcionalizar demostraron la presencia de este mecanismo inespecífico en las células MCF-7 y HeLa, favorecido por la presencia del polisacárido en su composición. Algunos autores han descrito que la carga negativa de las nanopartículas puede favorecer la interacción de las mismas con ciertas partes de la membrana celular, mejorando así su internalización (Wilhelm et al., 2003; Wilhelm et al., 2002). Las nanopartículas B-50-50-FOL NP presentaron un valor de potencial zeta más negativo que las nanopartículas BSA-SH-NP, con lo que la posibilidad de que este sistema interactuara directamente con las células gracias a su carga superficial aniónica dificultaría el estudio del papel del receptor de folato en su internalización a través de la metodología llevada a cabo en este ensayo. Independientemente de la confirmación de su implicación en la internalización, la funcionalización de los sistemas B-50-50-FOL NP y BSA-SH-FOL NP conllevó a una mejora significativa de la captación de las nanopartículas por los tres tipos de células. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con el sistema C-70-30-FOL NP donde la cantidad de fólico unido a la estructura de la nanopartícula no fue suficiente para mejorar su captación celular, sin mostrar diferencias significativas respecto a su composición análoga sin funcionalizar. De hecho, esta composición obtuvo la carga superficial más negativa de todas, con lo que la interacción con las células pudo llevarse a cabo mayoritariamente a través del mecanismo inespecífico asociado a la carga aniónica de los sistemas nanoparticulados.

Los estudios de citotoxicidad llevados a cabo con los sistemas funcionalizados cargados con tamoxifeno demostraron la reducción gradual de la viabilidad celular en todas las líneas celulares, como consecuencia de la

liberación controlada desde las nanopartículas. Las composiciones TMX-B-50-50-FOL NP y TMX-BSA-SH NP fueron especialmente efectivas a partir del tercer día de incubación. La acción tardía del fármaco administrado a través de estas composiciones pudo deberse a que la cantidad de tamoxifeno disponible en el interior de las células a las 24 h de incubación sería menor que cuando el tamoxifeno era administrado de forma libre en disolución, teniendo en cuenta la cantidad de nanopartículas captadas a las 24 h según los ensayos de internalización. Sin embargo, la internalización de los sistemas vectorizados se lleva a cabo por endocitosis mediada por el receptor de ácido fólico ($K_a \sim 5 \times 10^{10}$ M para el ácido fólico)(Jansen, 1999), donde los receptores son reciclados y devueltos a la membrana celular una vez han liberado los ligandos en vesículas citoplasmáticas. La recuperación de este receptor se produce entre 0,5-5 h (Ke et al., 2003), con lo que la cantidad de nanopartículas internalizadas a lo largo de los 9 días de incubación iría aumentando. Además, se ha comprobado que la mayoría de los conjugados con ácido fólico permanecen estables en el citoplasma de las células durante varias horas después de ser internalizados (Leamon and Low, 1991). Consecuentemente, la acción citotóxica del tamoxifeno cuando fue administrado mediante las nanopartículas vectorizadas se fue detectando de forma más tardía y gradual que en el caso del tamoxifeno administrado libre y en disolución.

Estos estudios frente a líneas celulares tumorales confirmaron la eficacia anticancerígena *in vitro* de los sistemas funcionalizados con fólico, siendo las nanopartículas con mayor cantidad de fólico unido las más activas en la reducción de la viabilidad celular de las líneas celulares tumorales. Con ello, surge la posibilidad de estudiar una nueva forma de administración del tamoxifeno empleando la vía intravenosa, con la oportunidad de desarrollar un efecto farmacológico más localizado y eficaz.

Tanto las nanopartículas vectorizadas con ácido fólico como las nanopartículas sin funcionalizar ofrecieron resultados esperanzadores para el estudio de nuevas vías de administración del fármaco que permitieran mejorar la

efectividad del tratamiento actual, consiguiendo un tratamiento más localizado y disminuyendo así la posibilidad del desarrollo de efectos adversos indeseables. Por ello, el siguiente paso fue la realización de estudios *in vivo* con el objetivo de confirmar la eficacia anticancerígena de los sistemas que fue observada previamente *in vitro*, y evaluar su potencial para la administración de tamoxifeno mediante otras vías.

Para ello, se desarrolló un modelo de tumor xenográfico de células MCF-7 en ratones atímicos mediante la inoculación subcutánea de las células y la estimulación de su crecimiento para el desarrollo tumoral con 17- β -estradiol. Estudios previos (Kyprianou et al., 1991; Osborne et al., 1985) que desarrollaron este tipo de modelo confirmaron la necesidad de la administración hormonal para el crecimiento del tumor, así como la observación del efecto del tamoxifeno, actuando como citostático en primer lugar y finalmente como citotóxico. Este efecto se puso de manifiesto mediante el cese inicial del crecimiento del tumor y la posterior regresión del mismo.

Para aplicar este modelo *in vivo*, se seleccionaron los sistemas que ofrecieron los mejores resultados en los ensayos previos de caracterización *in vitro*. En el caso de las nanopartículas sin funcionalizar, se seleccionaron los sistemas basados en mezclas ALG-CYS/BSA-SH (B-50-50 NP y C-70-30 NP), puesto que la presencia del polisacárido pareció ser determinante en su interacción con las células. La administración de estos sistemas se llevó a cabo de forma subcutánea en la zona circundante del tumor. En el caso de los sistemas vectorizados con ácido fólico, se seleccionó la administración intravenosa del sistema que mejores resultados ofreció en los ensayos celulares, y cuyas características físico-químicas permitían la obtención de una suspensión estable para ser administrada mediante esta vía (B-50-50-FOL NP). En ambos experimentos, se ensayaron tanto las nanopartículas placebo como las nanopartículas con fármaco incluido. Además, en el caso del experimento con los sistemas vectorizados, también se estableció una comparativa con las nanopartículas sin funcionalizar con la misma

composición para evaluar la importancia de la unión del ácido fólico en la mejora de la eficacia terapéutica del tratamiento.

La elección de la dosis de tamoxifeno para su administración intravenosa se realizó teniendo en cuenta la dosis pautada en humanos (20 mg/día)(Lee et al., 2003), junto con el valor de biodisponibilidad absoluta calculada en roedores tras la administración oral del fármaco ($15 \pm 4\%$) (Shin et al., 2006). Considerando el máximo valor de biodisponibilidad absoluta (19%) y un peso medio en el ratón de 23 g, se decidió administrar una dosis de 4 μg TMX cada 3 días (1,3 μg TMX/día), lo que se correspondía con 1 mg de TMX-B-50-50-FOL NP cada 3 días (0,3 mg NP/día). La dosis de tamoxifeno administrada subcutáneamente fue aproximadamente un 11% mayor.

En ambos experimentos se detectó una menor evolución tumoral en los ratones tratados con el fármaco en disolución y en los tratados con el fármaco vehiculizado en los sistemas poliméricos, tanto con la formulación vectorizada como sin vectorizar. En el caso de la administración subcutánea de los sistemas sin funcionalizar, los volúmenes y velocidades de crecimiento del tumor significativamente más bajas se observaron en los grupos de ratones tratados con el fármaco incluido en las nanopartículas TMX-B-50-50 NP y, especialmente, en el sistema TMX-C-70-30 NP, mientras que la acción del fármaco administrado libremente fue únicamente comparable a la acción de estos sistemas en los últimos días de tratamiento. En los tres grupos tratados se observó la acción citostática del tamoxifeno, aunque el efecto del mismo fue significativamente más notable cuando se administró incluido en los sistemas poliméricos.

En el experimento donde se llevó a cabo la administración por vía intravenosa, se observó la ralentización del crecimiento del tumor tras el tratamiento con las nanopartículas TMX-B-50-50 NP y el tamoxifeno libre, poniendo de manifiesto la actividad citostática del fármaco. Sin embargo, se determinó un valor de velocidad de crecimiento tumoral con signo negativo tras el primer día de administración con el sistema funcionalizado con ácido fólico

(TMX-B-50-50-FOL NP), indicando que existía remisión tumoral desde el principio de este tratamiento debido a la acción citotóxica del mismo. Este tratamiento resultó, por tanto, ser más efectivo que su análogo sin funcionalizar. En el estudio de Haran y colaboradores (Haran et al., 1994), donde el tamoxifeno se administró libremente de forma subcutánea en forma de pellets implantables, se logró detectar la acción citostática del fármaco y la posterior regresión del tumor después de dos semanas de tratamiento. Sin embargo, la inclusión del fármaco en los sistemas diseñados conllevó a una mayor efectividad, ya que el efecto citostático se llevó a cabo con mayor antelación, e incluso se consiguió remitir el tumor desde el primer momento de la administración en el caso del sistema vectorizado.

Esta mayor eficacia pudo ser obtenida gracias a que las nanopartículas podrían proteger al tamoxifeno de ser degradado enzimáticamente tras su administración, incrementando su vida media, al mismo tiempo que aprovecharían las ventajas que ofrecen este tipo de sistemas nanoparticulados para alcanzar de forma más localizada el tumor sólido, ya sea pasiva o activamente. Estos resultados siguen la tendencia de otros estudios publicados en la literatura, en los que la administración de un fármaco anticancerígeno incluido en sistemas poliméricos, tanto sin vectorizar (Arias et al., 2009; Graeser et al., 2010; Kim et al., 2012) como vectorizados (Hao et al., 2013; Zhao et al., 2012), supuso la mejora de la eficacia del tratamiento antitumoral.

En el caso de la administración intravenosa de los sistemas placebo, es decir, sin fármaco incluido, se detectó un aumento de la velocidad de crecimiento del tumor. Esto parecía indicar que las nanopartículas sin fármaco por sí solas estimulaban el crecimiento del tumor, especialmente las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico (B-50-50-FOL NP) que llegaron a duplicar la tasa de crecimiento tumoral. De acuerdo a los resultados obtenidos previamente en los estudios de citocompatibilidad *in vitro* realizados con estas nanopartículas en la línea celular MCF-7, tanto con las nanopartículas sin vectorizar como las vectorizadas se alcanzaron valores de viabilidad celular en algunos casos

superiores al 100%, pudiendo llegar hasta el 110%. Por esta razón, su administración *in vivo* también pudo resultar en una estimulación de las células tumorales, teniendo como consecuencia velocidades de crecimiento tumoral más altas. Teniendo en cuenta este hecho, las nanopartículas funcionalizadas TMX-B-50-50-FOL NP demostraron ser potencialmente eficaces ya que fueron capaces de contrarrestar la acción proliferativa inherente a su composición y, además, produjeron la regresión tumoral desde el comienzo de su administración.

La efectividad de los sistemas poliméricos se confirmó a través del estudio de cortes histológicos mediante tinción y observación microscópica de los mismos, así como la realización de técnicas inmunohistoquímicas. Estos procedimientos han sido muy comúnmente empleados para obtener información útil sobre la patología de tejidos tumorales xenograftos, como la estructura tisular y el estado proliferativo y/o quiescente de las células.

El análisis de los cortes histológicos teñidos mediante azul de toluidina y hematoxilina-eosina reveló las diferencias existentes entre los tumores tratados con tamoxifeno y los tumores sin tratar. Sin embargo, se observó mayor presencia de tejido desestructurado, con mayor desorganización celular y menor presencia de células en fases mitóticas en el caso de los tumores tratados con las nanopartículas administradas subcutáneamente, especialmente con TMX-C-70-30 NP, así como en el caso del sistema funcionalizado con ácido fólico TMX-B-50-50-FOL NP administrado de forma intravenosa. Tanto la desestructuración del tejido, con más presencia de tejido conectivo y adhesión celular, como la baja densidad de células en distintas fases de proliferación, han sido descritos en trabajos previos como indicios de remisión tumoral (Arias et al., 2009; Bani et al., 1999; Lee et al., 2011). Además, a través de estas tinciones pudo confirmarse la capacidad de las nanopartículas funcionalizadas TMX-B-50-50-FOL NP para alcanzar el tejido tumoral tras ser administradas de forma sistémica, ya que se detectaron nanopartículas residuales en algunos los cortes histológicos de los tumores tratados con estos sistemas.

El estudio histológico de los tumores se completó mediante la realización de técnicas inmunohistoquímicas que permitieron confirmar las tendencias observadas mediante las tinciones básicas. La detección de la presencia del antígeno Ki-67 en las células de tejidos tumorales mediante inmunohistoquímica tiene un gran valor pronóstico (Shahzad et al., 2011), especialmente en el cáncer de mama (Liu et al., 2001; Pathmanathan and Balleine, 2013). Un bajo índice de proliferación celular, marcado por la poca presencia de este antígeno, está relacionado con la eficacia antitumoral del tratamiento. Tanto las nanopartículas sin vehiculizar (TMX-B-50-50 y TMX-C-70-30 NP) administradas subcutáneamente, como la formulación TMX-B-50-50-FOL NP administrada por vía intravenosa, se mostraron mucho más efectivas en la reducción de la proliferación celular que el fármaco administrado libremente. Las muestras de tejido tumoral tratadas con estas formulaciones obtuvieron las señales de fluorescencia más bajas, incluso en las zonas circundantes a los vasos sanguíneos donde las muestras de los controles y de los ratones tratados con las nanopartículas placebo obtuvieron señales fluorescentes muy intensas. Previamente, otros autores describieron la mejor eficacia del tratamiento con diferentes antitumorales administrados incluidos en sistemas poliméricos (Arias et al., 2011; Wohlfart et al., 2009), y los resultados de sus estudios inmunohistoquímicos fueron muy similares a los obtenidos en este estudio. Por ello, se pudo concluir que la administración subcutánea e intravenosa del tamoxifeno incluido en los sistemas sin funcionalizar y en las nanopartículas vectorizadas con ácido fólico, respectivamente, permitió la mejora de la eficacia anticancerígena de este antineoplásico.

Finalmente, se llevó a cabo la cuantificación de los niveles de tamoxifeno y de uno de sus metabolitos más activos, el 4-hidroxitamoxifeno, para poder establecer posibles diferencias entre la administración del fármaco de forma libre o incluido en las nanopartículas.

Los niveles de tamoxifeno y de su metabolito en las muestras de plasma fueron en su mayoría indetectables, lo que está de acuerdo con otros estudios

llevados a cabo con dosis orales y subcutáneas mayores que las administradas en este estudio (Kisanga et al., 2003; Osborne et al., 1985). Únicamente se detectó una pequeña concentración de tamoxifeno en el caso de la administración subcutánea del fármaco libre, mientras que cuando la misma dosis fue administrada incluida en los sistemas poliméricos por esta vía no fue posible detectar la presencia del fármaco en sangre. Debido a que la presencia del tamoxifeno en plasma podría estar directamente relacionada con la distribución del fármaco en órganos no diana, y con ello el desarrollo de efectos adversos indeseables (Cohen, 2004), el hecho de que no se pudiera detectar la presencia del fármaco en plasma pudo ser considerado de forma muy positiva.

En relación con el desarrollo de estos efectos adversos indeseables, se evaluó la presencia de fármaco en el útero y los ovarios de los ratones tratados, puesto que la aparición de un carcinoma endometrial es uno de los efectos secundarios más graves que puede desencadenar el tratamiento con tamoxifeno. La administración del fármaco incluido en las nanopartículas, tanto tras la administración subcutánea como intravenosa de las mismas, redujo significativamente los niveles de tamoxifeno en estos órganos entre 4 y 8 veces menos que cuando el fármaco fue administrado de forma libre.

Así mismo, los niveles ováricos y uterinos del 4-hidroxitamoxifeno, que es incluso más activo que el propio fármaco, fueron generalmente más bajos tras la administración del fármaco incluido en los sistemas que administrando el tamoxifeno en su forma libre. La ausencia o baja presencia de metabolitos farmacológicos se corresponde con el perfil característico de las formulaciones de liberación controlada de fármacos, tal y como han descrito trabajos previos (Kisanga et al., 2003). No obstante, los niveles de 4-hidroxitamoxifeno más altos fueron encontrados en el hígado y en los pulmones de los ratones tratados con fármaco de forma intravenosa, independientemente de la modalidad del tratamiento. Este hecho se atribuyó a la acción de las enzimas de la familia CYP3A, responsables del metabolismo del fármaco, y que están localizadas principalmente en el hígado (Cotreau et al., 2001). En cuanto a los pulmones, se

ha observado en estudios anteriores (Kisanga et al., 2003; Wilking et al., 1982) que estos órganos actúan como reservorio del fármaco y de sus metabolitos debido a su afinidad por los compuestos amínicos (Bend et al., 1985). Estos factores justificarían los niveles altos tanto de tamoxifeno como de su metabolito en hígado y en pulmones. Aún así, las concentraciones obtenidas fueron más bajas tras la administración de las nanopartículas con tamoxifeno que la del fármaco libre en disolución.

Por tanto, la administración del fármaco incluido en los sistemas, ya sean funcionalizados o sin funcionalizar, condujo a la obtención de niveles más bajos de tamoxifeno y niveles indetectables de 4-hidroxitamoxifeno en los órganos no diana, principalmente en el útero, que es el órgano principalmente afectado por los efectos secundarios derivados de la baja especificidad del tratamiento con tamoxifeno. Estos niveles más bajos conducirían a una menor probabilidad de desarrollar estos efectos adversos indeseables, y con ello, a la mejora de la eficacia del tratamiento.

En cuanto a los niveles del fármaco en el tumor, se vieron diferencias entre el tratamiento subcutáneo y el intravenoso. En el caso del tratamiento subcutáneo, la administración del fármaco mediante el sistema TMX-C-70-30 NP condujo a una mayor acumulación de fármaco en el tejido tumoral, estadísticamente significativa respecto al sistema TMX-B-50-50 NP y el fármaco libre; precisamente fue este sistema el que se mostró más efectivo según los estudios histológicos previamente analizados. En el caso de la administración intravenosa, los tratamientos con tamoxifeno libre y con las nanopartículas TMX-B-50-50-FOL NP fueron los que permitieron obtener niveles más altos de fármaco en el tejido diana. No obstante, el tratamiento con el sistema TMX-B-50-50-FOL NP demostró ser mucho más efectivo que el tratamiento con el fármaco libre, como indicaron todos los resultados obtenidos, especialmente su capacidad de inducir remisión tumoral desde el principio de su administración y de causar menor acumulación de fármaco en órganos no diana.

En conclusión, la vehiculización del tamoxifeno mediante estos sistemas poliméricos basados en combinaciones de albúmina y alginato modificados, bien mediante mecanismos de vehiculización pasiva (especialmente con el sistema TMX-C-70-30 NP) o mecanismos de vehiculización activa (mediante el sistema TMX-B-50-50-FOL NP) condujo a la obtención de una mejora en la eficacia del tratamiento antitumoral con este fármaco.

De esta forma se confirmó el gran potencial que ofrecen los nanosistemas en la lucha contra el cáncer de mama, así como la importancia del receptor de ácido fólico como diana farmacológica para el tratamiento de este tipo de tumor. Estos resultados abren la posibilidad de estudiar nuevas formas de administración del tamoxifeno en humanos que permitan una mejora en la eficacia farmacológica así como una mejor calidad de vida de los pacientes tratados.

_____ **CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS**

-
- Se han preparado nanopartículas partiendo de diferentes mezclas de alginato y albúmina, previamente modificados, estabilizadas por formación de enlaces disulfuro entre ambos polímeros mediante coacervación. Las partículas indivisualizadas tienen un tamaño medio comprendido entre 42 y 388 nm. La presencia de BSA-SH en la composición es necesaria para la formación de las nanopartículas, y la proporción de los polímeros en la mezcla es determinante en la composición final de las nanopartículas.
 - El tamoxifeno se incorpora satisfactoriamente a las nanopartículas (4-6 μg TMX/mg NP) mediante el hinchamiento de los sistemas en una solución etanólica del fármaco, obteniéndose en general mejores resultados de inclusión cuando este procedimiento se realiza partiendo de las nanopartículas liofilizadas. Parte del fármaco incorporado se localiza en la zona más superficial de las nanopartículas, característica principal de la mayoría de fármacos hidrofóbicos.
 - *In vitro*, la liberación máxima del fármaco desde los sistemas en presencia del surfactante se produce entre 2 y 75 h, en función de la forma de incorporación del fármaco y de la composición de las nanopartículas. Esta liberación sucede en dos etapas diferenciadas: una primera más rápida, donde se libera el fármaco más superficial, y una segunda más lenta, donde la BSA-SH juega un papel fundamental por las fuertes interacciones que se establecen entre el fármaco y la proteína. Dichas interacciones son responsables de la liberación incompleta del fármaco desde los sistemas.
 - La funcionalización de estos sistemas con ácido fólico se lleva a cabo de forma exitosa, aumentando la cantidad de ácido fólico unido a los sistemas a medida que la presencia de la BSA-SH en la composición de las nanopartículas es mayor. El tamaño medio de estas nanopartículas

vectorizadas está comprendido entre 76 y 417 nm, observándose un fenómeno de agregación en el caso de las nanopartículas compuestas exclusivamente por albúmina. La cantidad de tamoxifeno incluido en los sistemas fue similar a la obtenida en las nanopartículas sin vectorizar, y se observa también su localización parcialmente superficial. La liberación *in vitro* del tamoxifeno desde estos sistemas se produce en dos etapas (primera más rápida y segunda más lenta) y de forma completa en las primeras 24 h; sin embargo, el papel del surfactante es determinante en esta liberación completa desde las nanopartículas.

- Los estudios en líneas celulares MCF-7, HeLa y T47D demuestran que las nanopartículas sin fármaco, tanto vectorizadas como sin vectorizar, son esencialmente citocompatibles. Todos los sistemas son capaces de interactuar y ser internalizados por las diferentes líneas celulares, observándose que la presencia del polisacárido en la composición de las nanopartículas mejora dicha interacción. La funcionalización de las nanopartículas con ácido fólico conduce a una mayor internalización de los sistemas. El papel del receptor del ácido fólico es fundamental en la penetración del sistema BSA-SH-FOL NP, pero no exclusivo en el caso del B-50-50-FOL NP. La disminución gradual de la viabilidad en las tres líneas celulares confirma la eficacia *in vitro* de las nanopartículas como sistemas de liberación controlada de tamoxifeno.

- La administración subcutánea e intravenosa de los sistemas sin vectorizar (B-50-50 y C-70-30 NP) y vectorizados con ácido fólico (B-50-50-FOL NP), en un modelo de tumor de MCF-7 xenográfico en ratones atímicos produce la ralentización y, en el caso del sistema funcionalizado, la regresión del desarrollo del tumor de forma mucho más significativa que el fármaco administrado libremente. Así mismo, los estudios histológicos muestran una mayor desorganización y menor división celular en el tejido tumoral de los ratones tratados con el fármaco incluido en estos sistemas

poliméricos. Además, la acumulación del fármaco en tejidos no diana se ve considerablemente reducida cuando es administrado en forma de nanopartículas. De esta forma, se pone de manifiesto la mayor eficacia antitumoral *in vivo* de los nanosistemas con tamoxifeno frente al fármaco sin vehiculizar.

- Nanoparticles based on different mixtures of previously modified alginate and albumin have been prepared and stabilized by the formation of disulphide bonds between both polymers by coacervation methodology. Individualized nanoparticles with an average size ranged between 42-388 nm have been obtained. The presence of BSA-SH in nanoparticle composition is necessary to form the systems, as well as the proportion of reactants is determinant in the final composition of these nanoparticles.
- TMX is successfully included into the nanoparticles (4-6 μg TMX/mg NP) by swelling the systems in an ethanolic dissolution of the drug, obtaining better drug load values, generally, when the nanoparticles are previously freeze-dried. Part of the drug is placed on the nanoparticle surface, which is characteristic of hydrophobic drugs.
- *In vitro* maximum drug release from the systems in the presence of the surfactant takes place between 2 and 75 h, and depends on the drug loading methodology and nanoparticle composition. This release occurs in two differentiated steps: the first step, which is fast and where superficial drug is released, followed by a second and slower step, where BSA-SH plays an important role due to the strong interactions established between the drug and the protein. These interactions are the main responsible for the incomplete release of the drug from the systems.

-
- The functionalization of these systems with folic acid is successfully carried out, being the amount of folic acid attached to the nanoparticles higher when the proportion of BSA-SH in the composition increases. The average size of these systems is ranged between 76 and 417 nm, and an aggregation phenomenon is detected in the case of nanoparticles composed of BSA-SH exclusively. TMX loading amount obtained for these systems is very similar to that determined in the case of non-functionalized systems, and the partial localization of the drug on the surface of the nanoparticles is also observed. Additionally, *in vitro* TMX release from these nanoparticles occurs in two differentiated steps: a first fast step followed by a second slower step; this release is complete at 24 h. However, the presence of the surfactant in the release medium is determinant for the complete release of the drug from the nanoparticles.
 - Cellular studies in MCF-7, HeLa and T47D cell lines show that unloaded nanoparticles, either functionalized or non-functionalized, are essentially cytocompatible. All the systems are capable to interact and to be internalized by the three cell lines, although the presence of the polysaccharide in the nanoparticle composition enhances this interaction. Folic acid functionalization of the systems allows a higher internalization of the systems to be achieved. The role of folate receptor is determinant for the penetration of BSA-SH-FOL NP, but not exclusive in the case of B-50-50-FOL NP. The gradual decrease on cell viability when the drug is administered by the polymeric systems confirms the *in vitro* efficacy of the formulations as controlled delivery systems.
 - Subcutaneous and intravenous administration of the non-vectorized (B-50-50 NP y C-70-30 NP) and folic acid-vectorized systems (B-50-50-FOL NP), in an *in vivo* MCF-7 xenograft model developed in athymic nude mice causes the deceleration and, in the case of the folate attached system, the regression of tumours in a more significant way than the drug administered free in dissolution. Moreover, histological studies show a

higher disorganization and less cellular division in those tumour tissues treated with the TMX-loaded nanoparticles. Additionally, the accumulation of the drug in non targeted tissues is considerably reduced when the drug is administered trapped into nanoparticles. Thus, this study reveals the highest *in vivo* anticancer efficacy of the tamoxifen-loaded nanosystems against the administration of the non vehiculized drug.

BIBLIOGRAFÍA

Abbasalipurkibir, R., Salehzadeh, A., Abdullah, R., 2011. Delivering Tamoxifen within Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutical Technology* 35, 74-79.

Abou Neel, E.A., Bozec, L., Knowles, J.C., Syed, O., Mudera, V., Day, R., Hyun, J.K., 2013. Collagen--emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 429-456.

Ahmad, Z., Pandey, R., Sharma, S., Khuller, G.K., 2006. Pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses. *Int J Antimicrob Agents* 27, 409-416.

Althuis, M.D., Fergenbaum, J.H., Garcia-Closas, M., Brinton, L.A., Madigan, M.P., Sherman, M.E., 2004. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 1558-1568.

Allen, T.M., Cullis, P.R., 2004. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 303, 1818-1822.

Ameller, T., Legrand, P., Marsaud, V., Renoir, J.M., 2004. Drug delivery systems for oestrogenic hormones and antagonists: the need for selective targeting in estradiol-dependent cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92, 1-18.

Amidi, M., Romeijn, S.G., Borchard, G., Junginger, H.E., Hennink, W.E., Jiskoot, W., 2006. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *J Control Release* 111, 107-116.

Anton, N., Benoit, J.P., Saulnier, P., 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review. *J Control Release* 128, 185-199.

Appenzeller, T., 1991. The man who dared to think small. *Science* 254, 1300.

Arias, J.L., Reddy, L.H., Couvreur, P., 2009. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *J Drug Target* 17, 586-598.

Arias, J.L., Reddy, L.H., Couvreur, P., 2011. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules* 12, 97-104.

Arnedo, A., Espuelas, S., Irache, J.M., 2002. Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *Int J Pharm* 244, 59-72.

Aynie, I., Vauthier, C., Chacun, H., Fattal, E., Couvreur, P., 1999. Spongelike alginate nanoparticles as a new potential system for the delivery of antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9, 301-312.

Azizi, E., Namazi, A., Haririan, I., Fouladdel, S., Khoshayand, M.R., Shotorbani, P.Y., Nomani, A., Gazori, T., 2010. Release profile and stability evaluation of optimized chitosan/alginate nanoparticles as EGFR antisense vector. *Int J Nanomedicine* 5, 455-461.

Bae, K.H., Chung, H.J., Park, T.G., 2011. Nanomaterials for cancer therapy and imaging. *Mol Cells* 31, 295-302.

Bani, D., Flagiello, D., Poupon, M.F., Nistri, S., Poirson-Bichat, F., Bigazzi, M., Bani Sacchi, T., 1999. Relaxin promotes differentiation of human breast cancer cells MCF-7 transplanted into nude mice. *Virchows Arch* 435, 509-519.

Barbosa, M., Granja, P., Barrias, C., Amaral, I., 2005. Polysaccharides as scaffolds for bone regeneration. *ITBM-RBM* 26, 212-217.

Baselga, J., 2001. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4, S16-22.

Belani, C.P., Goss, G., Blumenschein, G., Jr., 2012. Recent clinical developments and rationale for combining targeted agents in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cancer Treat Rev* 38, 173-184.

Bend, J.R., Serabjit-Singh, C.J., Philpot, R.M., 1985. The pulmonary uptake, accumulation, and metabolism of xenobiotics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25, 97-125.

Bergers, G., Benjamin, L.E., 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3, 401-410.

Bernkop-Schnurch, A., 2005. Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 1569-1582.

Bilensoy, E., Sarisozen, C., Esendagli, G., Dogan, A.L., Aktas, Y., Sen, M., Mungan, N.A., 2009. Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors. *Int J Pharm* 371, 170-176.

Blanco, M.D., Guerrero, S., Benito, M., Fernández, A., Teijón, C., Olmo, R., Katime, I., Teijón, J.M., 2011. In Vitro and In Vivo evaluation of a folate-targeted copolymeric submicrohydrogel based on N-Isopropylacrylamide as 5-fluorouracil delivery system. *Polymers* 3, 1107-1125.

Blanco, M.D., Guerrero, S., Benito, M., Teijon, C., Olmo, R., Muniz, E., Katime, I., Teijon, J.M., 2010. Tamoxifen-loaded folate-conjugate poly[(p-nitrophenyl acrylate)-co-(N-isopropylacrylamide)] sub-microgel as antitumoral drug delivery system. *J Biomed Mater Res A* 95, 1028-1040.

Blanco, M.D., Guerrero, S., Teijón, C., Olmo, R., Pastrana, L., Katime, I., Teijón, J.M., 2008. Preparation and characterization of nanoparticulate poly(N-

isopropylacrylamide) hidrogel for the controlled release of anti-tumour drugs. *Polymer International* 57, 1215-1225.

Blanco , M.D., Teijón, C., Olmo, R., Teijón, J.M., 2012. Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy, in: Sezer, A.D. (Ed.), *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems Intech*, pp. 241-278.

Bodnar, M., Hartmann, J.F., Borbely, J., 2005. Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules* 6, 2521-2527.

Borm, P.J., Kreyling, W., 2004. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles--potential implications for drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol* 4, 521-531.

Bouchard, P.R., Hutabarat, R.M., Thompson, K.M., 2010. Discovery and development of therapeutic aptamers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 237-257.

Boulaiz, H., Alvarez, P.J., Ramirez, A., Marchal, J.A., Prados, J., Rodriguez-Serrano, F., Peran, M., Melguizo, C., Aranega, A., 2011. Nanomedicine: application areas and development prospects. *Int J Mol Sci* 12, 3303-3321.

Boyle, P., 2006. The globalisation of cancer. *Lancet* 368, 629-630.

Bozkir, A., Saka, O.M., 2005. Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies. *Farmaco* 60, 840-846.

Brannon-Peppas, L., Blanchette, J.O., 2004. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 1649-1659.

Braunecker, W.A., Matyjaszewski, K., 2007. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Progress in Polymer Science* 32, 93-146.

Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., Forman, D., 2012. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol* 13, 790-801.

Brigger, I., Chaminade, P., Marsaud, V., Appel, M., Besnard, M., Gurny, R., Renoir, M., Couvreur, P., 2001. Tamoxifen encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. A new antiestrogen formulation. *Int J Pharm* 214, 37-42.

Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P., 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 631-651.

Burdick, J.A., Prestwich, G.D., 2011. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Adv Mater* 23, H41-56.

Butler, W.B., Kelsey, W.H., Goran, N., 1981. Effects of serum and insulin on the sensitivity of the human breast cancer cell line MCF-7 to estrogen and antiestrogens. *Cancer Res* 41, 82-88.

Cafaggi, S., Russo, E., Stefani, R., Parodi, B., Caviglioli, G., Sillo, G., Bisio, A., Aiello, C., Viale, M., 2011. Preparation, characterisation and preliminary antitumour activity evaluation of a novel nanoparticulate system based on a cisplatin-hyaluronate complex and N-trimethyl chitosan. *Invest New Drugs* 29, 443-455.

Cardone, R.A., Casavola, V., Reshkin, S.J., 2005. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 5, 786-795.

Carey, L.A., Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M.A., Tse, C.K., Edmiston, S., Deming, S.L., Geradts, J., Cheang, M.C., Nielsen, T.O., Moorman, P.G., Earp, H.S., Millikan, R.C., 2006. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 295, 2492-2502.

Carter, D.C., Ho, J.X., 1994. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* 45, 153-203.

Caruso, F., Hyeon, T., Rotello, V.M., 2012. Nanomedicine. *Chem Soc Rev* 41, 2537-2538.

Cazzaniga, M., Bonanni, B., 2012. Breast cancer chemoprevention: old and new approaches. *J Biomed Biotechnol* 2012, 985620.

Clarke, M.J., 2008. WITHDRAWN: Tamoxifen for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000486.

Cozy, E., Borgna, J.L., Rochefort, H., 1982. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res* 42, 317-323.

Cohen, I., 2004. Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. *Gynecol Oncol* 94, 256-266.

Coppi, G., Iannucelli, V., 2009. Alginate/chitosan microparticles for tamoxifen delivery to the lymphatic system. *Int J Pharm* 367, 127-132.

Cotreau, M.M., von Moltke, L.L., Harmatz, J.S., Greenblatt, D.J., 2001. Molecular and pharmacokinetic evaluation of rat hepatic and gastrointestinal cytochrome p450 induction by tamoxifen. *Pharmacology* 63, 210-219.

Cover, C.M., Hsieh, S.J., Cram, E.J., Hong, C., Riby, J.E., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L., 1999. Indole-3-carbinol and tamoxifen cooperate to arrest the cell cycle of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 59, 1244-1251.

Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., Alhaique, F., 2007. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J Control Release* 119, 5-24.

Custodio, A., Mendez, M., Provencio, M., 2012. Targeted therapies for advanced non-small-cell lung cancer: current status and future implications. *Cancer Treat Rev* 38, 36-53.

Chandía NP, M.B., Vásquez AE, 2001. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* 46, 81-87.

Chauvel-Lebret, D.J., Pellen-Mussi, P., Auroy, P., Bonnaure-Mallet, M., 1999. Evaluation of the in vitro biocompatibility of various elastomers. *Biomaterials* 20, 291-299.

Chawla, J.S., Amiji, M.M., 2002. Biodegradable poly(epsilon -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *Int J Pharm* 249, 127-138.

Chen, C.Y., Kim, T.H., Wu, W.C., Huang, C.M., Wei, H., Mount, C.W., Tian, Y., Jang, S.H., Pun, S.H., Jen, A.K., 2013. pH-dependent, thermosensitive polymeric nanocarriers for drug delivery to solid tumors. *Biomaterials* 34, 4501-4509.

Chen, L., Xiao, Z., Meng, Y., Zhao, Y., Han, J., Su, G., Chen, B., Dai, J., 2012. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials* 33, 1437-1444.

Cheng, L., Zhao, Q., 2013. Aptamer-capture based assays for human neutrophil elastase. *Talanta* 106, 315-320.

Chung, T.W., Lin, S.Y., Liu, D.Z., Tyan, Y.C., Yang, J.S., 2009. Sustained release of 5-FU from Poloxamer gels interpenetrated by crosslinking chitosan network. *Int J Pharm* 382, 39-44.

Dallas, N.A., Xia, L., Fan, F., Gray, M.J., Gaur, P., van Buren, G., 2nd, Samuel, S., Kim, M.P., Lim, S.J., Ellis, L.M., 2009. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res* 69, 1951-1957.

Danhier, F., Feron, O., Preat, V., 2010. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 148, 135-146.

Danquah, M.K., Zhang, X.A., Mahato, R.I., 2011. Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. *Adv Drug Deliv Rev* 63, 623-639.

Davidenko, N., Blanco, M.D., Peniche, C., Becherán, L., Guerrero, S., Teijón, J.M., 2009. Effects of different parameters on characteristics of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles obtained by the method of coacervation. *Journal of Applied Polymer Science* 111, 2362-2371.

Delehanty, J.B., Susumu, K., Manthe, R.L., Algar, W.R., Medintz, I.L., 2012. Active cellular sensing with quantum dots: transitioning from research tool to reality; a review. *Anal Chim Acta* 750, 63-81.

Desai, M.D., Saroya, B.S., Lockhart, A.C., 2013. Investigational therapies targeting the ErbB (EGFR, HER2, HER3, HER4) family in GI cancers. *Expert Opin Investig Drugs* 22, 341-356.

Ding, L., Lee, T., Wang, C.H., 2005. Fabrication of monodispersed Taxol-loaded particles using electrohydrodynamic atomization. *J Control Release* 102, 395-413.

Djojotbroto, M.W., Choi, Y.S., Lee, H.W., Rudolph, K.L., 2003. Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. *Mol Cells* 15, 164-175.

Dreaden, E.C., Mwakwari, S.C., Sodji, Q.H., Oyelere, A.K., El-Sayed, M.A., 2009. Tamoxifen-poly(ethylene glycol)-thiol gold nanoparticle conjugates: enhanced potency and selective delivery for breast cancer treatment. *Bioconjug Chem* 20, 2247-2253.

Duh, J.L., Yu, R., Jiao, J.J., Matwyshyn, G.A., Li, W., Tan, T.H., Kong, A.N., 1997. Activation of signal transduction kinases by tamoxifen. *Pharm Res* 14, 186-189.

Duncan, R., Gaspar, R., 2011. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm* 8, 2101-2141.

Elzoghby, A.O., El-Fotoh, W.S., Elgindy, N.A., 2011. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *J Control Release* 153, 206-216.

Elzoghby, A.O., Samy, W.M., Elgindy, N.A., 2012. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release* 157, 168-182.

Famulok, M., Hartig, J.S., Mayer, G., 2007. Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy. *Chem Rev* 107, 3715-3743.

Farokhzad, O.C., Cheng, J., Teply, B.A., Sherifi, I., Jon, S., Kantoff, P.W., Richie, J.P., Langer, R., 2006. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6315-6320.

Farokhzad, O.C., Langer, R., 2009. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano* 3, 16-20.

Fingar, D.C., Blenis, J., 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23, 3151-3171.

Fisher, B., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Kavanah, M., Cronin, W.M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., Wolmark, N., 1998. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 90, 1371-1388.

Freiberg, S., Zhu, X.X., 2004. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm* 282, 1-18.

Garg, A., Tisdale, A.W., Haidari, E., Kokkoli, E., 2009. Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide. *Int J Pharm* 366, 201-210.

Gaspar, M.M., Radomska, A., Gobbo, O.L., Bakowsky, U., Radomski, M.W., Ehrhardt, C., 2012. Targeted delivery of transferrin-conjugated liposomes to an orthotopic model of lung cancer in nude rats. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 25, 310-318.

Geerken, M.J., Lammertink, R.G., Wessling, M., 2007. Interfacial aspects of water drop formation at micro-engineered orifices. *J Colloid Interface Sci* 312, 460-469.

George, M., Abraham, T.E., 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. *J Control Release* 114, 1-14.

Geszke, M., Murias, M., Balan, L., Medjahdi, G., Korczynski, J., Moritz, M., Lulek, J., Schneider, R., 2011. Folic acid-conjugated core/shell ZnS:Mn/ZnS quantum dots as targeted probes for two photon fluorescence imaging of cancer cells. *Acta Biomater* 7, 1327-1338.

Graeser, R., Esser, N., Unger, H., Fichtner, I., Zhu, A., Unger, C., Kratz, F., 2010. INNO-206, the (6-maleimidocaproyl hydrazone derivative of doxorubicin), shows superior antitumor efficacy compared to doxorubicin in different tumor xenograft models and in an orthotopic pancreas carcinoma model. *Invest New Drugs* 28, 14-19.

Grenman, S., Shapira, A., Carey, T.E., 1988. In vitro response of cervical cancer cell lines CaSki, HeLa, and ME-180 to the antiestrogen tamoxifen. *Gynecol Oncol* 30, 228-238.

Guerrero, S., Teijón, C., Muñiz, E., Teijón, J.M., Blanco, M.D., 2010. Characterization and in vivo evaluation of ketotifen-loaded chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers* 79, 1006-1013.

Guo, J., Gao, X., Su, L., Xia, H., Gu, G., Pang, Z., Jiang, X., Yao, L., Chen, J., Chen, H., 2011. Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery. *Biomaterials* 32, 8010-8020.

Haley, B., Frenkel, E., 2008. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol* 26, 57-64.

Hao, H.Q., Ma, Q.M., Huang, C., He, F., Yao, P., 2013. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of doxorubicin loaded BSA nanoparticles with folic acid modified dextran surface. *Int J Pharmaceut* 444, 77-84.

Haran, E.F., Maretzek, A.F., Goldberg, I., Horowitz, A., Degani, H., 1994. Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth. *Cancer Res* 54, 5511-5514.

Hernandez-Vargas, H., Ballestar, E., Carmona-Saez, P., von Kobbe, C., Banon-Rodriguez, I., Esteller, M., Moreno-Bueno, G., Palacios, J., 2006. Transcriptional profiling of MCF7 breast cancer cells in response to 5-Fluorouracil: relationship with cell cycle changes and apoptosis, and identification of novel targets of p53. *Int J Cancer* 119, 1164-1175.

Hicke, B.J., Stephens, A.W., Gould, T., Chang, Y.F., Lynott, C.K., Heil, J., Borkowski, S., Hilger, C.S., Cook, G., Warren, S., Schmidt, P.G., 2006. Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med* 47, 668-678.

Hilgenbrink, A.R., Low, P.S., 2005. Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics. *J Pharm Sci* 94, 2135-2146.

Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P., Jain, R.K., 1998. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4607-4612.

Holleman, A., Chung, I., Olsen, R.R., Kwak, B., Mizokami, A., Saijo, N., Parissenti, A., Duan, Z., Voest, E.E., Zetter, B.R., 2011. miR-135a contributes to paclitaxel resistance in tumor cells both in vitro and in vivo. *Oncogene* 30, 4386-4398.

Hornig, S., Heinze, T., 2008. Efficient approach to design stable water-dispersible nanoparticles of hydrophobic cellulose esters. *Biomacromolecules* 9, 1487-1492.

Huang RYM, P.R., Moon GY, 1999. Characteristics of sodium alginate membranes for the pervaporation dehydration of ethanol-water and isopropanol-water mixtures. *Journal of Membranes Science* 160, 101-113.

Huang, S.L., 2008. Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 1167-1176.

Husseini, G.A., Pitt, W.G., 2008. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 1137-1152.

Ibrahim, H., Bindschaedler, C., Doelker, E., Buri, P., Gurny, R., 1992. Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. *Int J Pharmaceut* 87, 239-246.

Jain, K.K., 2003. Nanodiagnostics: application of nanotechnology in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 3, 153-161.

Jain, K.K., 2005. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clin Chim Acta* 358, 37-54.

Jain, R.K., 1987. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res* 47, 3039-3051.

Jansen, G., 1999. Receptor-, and carrier-mediated transport systems for folates, and antifolates, in: Jackman, A.L. (Ed.), *Antifolate drugs in cancer therapy*. Totowa NJ: Humana Press, pp. 293-321.

Jayapal, M., Melendez, A.J., 2006. DNA microarray technology for target identification and validation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33, 496-503.

Jeong, B., Gutowska, A., 2002. Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. *Trends Biotechnol* 20, 305-311.

Jiang, X., Sha, X., Xin, H., Chen, L., Gao, X., Wang, X., Law, K., Gu, J., Chen, Y., Jiang, Y., Ren, X., Ren, Q., Fang, X., 2011. Self-aggregated pegylated poly(trimethylene carbonate) nanoparticles decorated with c(RGDyK) peptide for targeted paclitaxel delivery to integrin-rich tumors. *Biomaterials* 32, 9457-9469.

Kabanov, A.V., 2006. Polymer genomics: an insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 1597-1621.

Kang Y.N, K.H., Shin WS, Woo G and Moon TW, 2003. Effect of disulfide bond reduction on bovine serum albumin-stabilized emulsion gel formed by microbial transglutaminase. *Journal of food science* 68, 2215-2220.

Kawasaki, E.S., Player, A., 2005. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine* 1, 101-109.

Ke, C.Y., Mathias, C.J., Green, M.A., 2003. The folate receptor as a molecular target for tumor-selective radionuclide delivery. *Nucl Med Biol* 30, 811-817.

Kim, C.E., Lim, S.K., Kim, J.S., 2012. In vivo antitumor effect of cromolyn in PEGylated liposomes for pancreatic cancer. *J Control Release* 157, 190-195.

Kim, S., Kim, J.H., Jeon, O., Kwon, I.C., Park, K., 2009. Engineered polymers for advanced drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 71, 420-430.

Kisanga, E.R., Gjerde, J., Schjott, J., Mellgren, G., Lien, E.A., 2003. Tamoxifen administration and metabolism in nude mice and nude rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84, 361-367.

Kogan, G., Soltes, L., Stern, R., Gemeiner, P., 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett* 29, 17-25.

Kratz, F., 2008. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release* 132, 171-183.

Kratz, F., Fichtner, I., Schumacher, P., Roth, T., Feibig, H.H., Unger, C., 1997. Antitumor activity of acid labile transferrin and albumin doxorubicin conjugates in vitro and in vivo human tumor xenograft models. *Eur J Cancer* 33, S175.

Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces* 75, 1-18.

Kyprianou, N., English, H.F., Davidson, N.E., Isaacs, J.T., 1991. Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer Res* 51, 162-166.

Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., von Briesen, H., Schubert, D., 2003. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm* 257, 169-180.

Laskin, J.J., Sandler, A.B., 2004. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours. *Cancer Treat Rev* 30, 1-17.

Lassalle, V., Ferreira, M.L., 2007. PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation. *Macromol Biosci* 7, 767-783.

Leach, J.B., Schmidt, C.E., 2005. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 26, 125-135.

Leamon, C.P., Low, P.S., 1991. Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5572-5576.

Lee, H.J., Seo, N.J., Jeong, S.J., Park, Y., Jung, D.B., Koh, W., Lee, E.O., Ahn, K.S., Lu, J., Kim, S.H., 2011. Oral administration of penta-O-galloyl-beta-D-glucose suppresses triple-negative breast cancer xenograft growth and

metastasis in strong association with JAK1-STAT3 inhibition. *Carcinogenesis* 32, 804-811.

Lee, J.W., Park, J.H., Robinson, J.R., 2000. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. *J Pharm Sci* 89, 850-866.

Lee, K.H., Ward, B.A., Desta, Z., Flockhart, D.A., Jones, D.R., 2003. Quantification of tamoxifen and three metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to a clinical trial. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 791, 245-253.

Lee, M.K., Kim, M.Y., Kim, S., Lee, J., 2009. Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: effect of freezing rate. *J Pharm Sci* 98, 4808-4817.

Leroux, J.C., Allemann, E., Doelker, E., Gurny, E., 1995. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 41, 14-18.

Letchford, K., Burt, H., 2007. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm* 65, 259-269.

Leucuta, S.E., 2012. Drug delivery systems with modified release for systemic and biophase bioavailability. *Curr Clin Pharmacol* 7, 282-317.

Liu, S., Edgerton, S.M., Moore, D.H., 2nd, Thor, A.D., 2001. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 7, 1716-1723.

Lopez-Calderero, I., Sanchez Chavez, E., Garcia-Carbonero, R., 2010. The insulin-like growth factor pathway as a target for cancer therapy. *Clin Transl Oncol* 12, 326-338.

Lou, X., Detrembleur, C., Jérôme, R., 2003. Novel Aliphatic Polyesters Based on Functional Cyclic (Di)Esters. *Macromolecular Rapid Communications* 24, 161-172.

Low, P.S., Antony, A.C., 2004. Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 1055-1058.

Low, P.S., Kularatne, S.A., 2009. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr Opin Chem Biol* 13, 256-262.

Lu, Y., Low, P.S., 2002. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 675-693.

Ma, J., Jemal, A., 2013. Breast Cancer Statistics, in: Ahmad, A. (Ed.), *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance*. Springer New York, pp. 1-18.

- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65, 271-284.
- Malvezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C., Negri, E., 2012. European cancer mortality predictions for the year 2012. *Ann Oncol* 23, 1044-1052.
- Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., von Stetten, F., Zengerle, R., 2010. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chem Soc Rev* 39, 1153-1182.
- Marschutz, M.K., Caliceti, P., Bernkop-Schnurch, A., 2000. Design and in vivo evaluation of an oral delivery system for insulin. *Pharm Res* 17, 1468-1474.
- Martínez, A., Arana, P., Fernández, A., Olmo, R., Teijón, C., Blanco, M.D., 2013. Synthesis and characterisation of alginate/chitosan nanoparticles as tamoxifen controlled delivery systems. *Journal of Microencapsulation* 30, 398-408.
- Martínez, A., Fernández, A., Pérez, E., Benito, M., Teijón, J.M., Blanco, M.D., 2012. Polysaccharide-Based Nanoparticles for Controlled Release Formulations, in: Hashim, A.A. (Ed.), *The delivery of nanoparticles*. InTech.
- Miller, M.A., Katzenellenbogen, B.S., 1983. Characterization and quantitation of antiestrogen binding sites in estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 43, 3094-3100.
- Misra, R., Acharya, S., Sahoo, S.K., 2010. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today* 15, 842-850.
- Mitra, M., Mohanty, C., Harilal, A., Maheswari, U.K., Sahoo, S.K., Krishnakumar, S., 2012. A novel in vitro three-dimensional retinoblastoma model for evaluating chemotherapeutic drugs. *Mol Vis* 18, 1361-1378.
- Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C., 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J* 19, 311-330.
- Morello, K.C., Wurz, G.T., DeGregorio, M.W., 2003. Pharmacokinetics of selective estrogen receptor modulators. *Clin Pharmacokinet* 42, 361-372.
- Muller, R.H., Jacobs, C., Kayser, O., 2001. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev* 47, 3-19.
- Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., 2005. Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. *Polysaccharides I Advances in Polymer Science* 186, 151-209.

Nair, L.S., Laurencin, C.T., 2007. Biodegradable polymers as biomaterial. *Progress in Polymer Science* 6, 762-798.

Nisato, R.E., Tille, J.C., Jonczyk, A., Goodman, S.L., Pepper, M.S., 2003. α 3 and α 5 integrin antagonists inhibit angiogenesis in vitro. *Angiogenesis* 6, 105-119.

Oh, E.J., Park, K., Kim, K.S., Kim, J., Yang, J.A., Kong, J.H., Lee, M.Y., Hoffman, A.S., Hahn, S.K., 2010. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *J Control Release* 141, 2-12.

Opanasopit, P., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., Ruktanonchai, U., 2008. Development and characterization of pectinate micro/nanoparticles for gene delivery. *AAPS PharmSciTech* 9, 67-74.

Osborne, C.K., Boldt, D.H., Clark, G.M., Trent, J.M., 1983. Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G1 phase. *Cancer Res* 43, 3583-3585.

Osborne, C.K., Hobbs, K., Clark, G.M., 1985. Effect of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 45, 584-590.

Pallis, A.G., Serfass, L., Dziadziusko, R., van Meerbeeck, J.P., Fennell, D., Lacombe, D., Welch, J., Gridelli, C., 2009. Targeted therapies in the treatment of advanced/metastatic NSCLC. *Eur J Cancer* 45, 2473-2487.

Pan, Y., Li, Y.J., Zhao, H.Y., Zheng, J.M., Xu, H., Wei, G., Hao, J.S., Cui, F.D., 2002. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int J Pharm* 249, 139-147.

Pandey, R., Ahmad, Z., 2011. Nanomedicine and experimental tuberculosis: facts, flaws, and future. *Nanomedicine* 7, 259-272.

Panyam, J., Sahoo, S.K., Prabha, S., Bargar, T., Labhasetwar, V., 2003. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Int J Pharm* 262, 1-11.

Pathmanathan, N., Balleine, R.L., 2013. Ki67 and proliferation in breast cancer. *J Clin Pathol* 66, 512-516.

Patil, G.V., 2003. Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. *Drug Development Research* 58, 219-247.

Pelekanou, V., Leclercq, G., 2011. Recent insights into the effect of natural and environmental estrogens on mammary development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 55, 869-878.

Peters, T., Jr., 1985. Serum albumin. *Adv Protein Chem* 37, 161-245.

Pirker, R., Pereira, J.R., Szczesna, A., von Pawel, J., Krzakowski, M., Ramlau, R., Vynnychenko, I., Park, K., Yu, C.T., Ganul, V., Roh, J.K., Bajetta, E., O'Byrne, K., de Marinis, F., Eberhardt, W., Goddemeier, T., Emig, M., Gatzemeier, U., 2009. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet* 373, 1525-1531.

Puxkandl, R., Zizak, I., Paris, O., Keckes, J., Tesch, W., Bernstorff, S., Purslow, P., Fratzl, P., 2002. Viscoelastic properties of collagen: synchrotron radiation investigations and structural model. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357, 191-197.

Rahimnejad, M., Jahanshahi, M., Najafpour, G.D., 2006. Production of biological nanoparticles from bovine serum albumin for drug delivery. *African Journal of Biotechnology* 5, 1918-1923.

Rangel-Yagui, C.O., Pessoa, A., Jr., Tavares, L.C., 2005. Micellar solubilization of drugs. *J Pharm Pharm Sci* 8, 147-165.

Ratner, B.D., Bryant, S.J., 2004. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng* 6, 41-75.

Rehm, B.H.A., 2009. *Alginates: Biology and Applications*. Springer.

Reis, C.P., Ribeiro, A.J., Houg, S., Veiga, F., Neufeld, R.J., 2007. Nanoparticulate delivery system for insulin: design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. *Eur J Pharm Sci* 30, 392-397.

Ritger, P.L., Peppas, N.A., 1987. A simple equation for description of solute release. I: Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of controlled release* 5, 23-36.

Ruedas-Rama, M.J., Walters, J.D., Orte, A., Hall, E.A., 2012. Fluorescent nanoparticles for intracellular sensing: a review. *Anal Chim Acta* 751, 1-23.

Sahoo, S.K., Labhasetwar, V., 2003. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today* 8, 1112-1120.

Sant, M., Allemani, C., Santaquilani, M., Knijn, A., Marchesi, F., Capocaccia, R., 2009. EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer* 45, 931-991.

Sarker, D., Workman, P., 2007. Pharmacodynamic biomarkers for molecular cancer therapeutics. *Adv Cancer Res* 96, 213-268.

Sarmah, J.K., Mahanta, R., Bhattacharjee, S.K., Biswas, A., 2011. Controlled release of tamoxifen citrate encapsulated in cross-linked guar gum nanoparticles. *Int J Biol Macromol* 49, 390-396.

Schatz, C., Domard, A., Viton, C., Pichot, C., Delair, T., 2004. Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules* 5, 1882-1892.

Schmaljohann, D., 2006. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 1655-1670.

Schubert, S., Delaney, J.T.J., Schubert, U.S., 2011. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter* 7, 1581-1588.

Shahzad, M.M., Mangala, L.S., Han, H.D., Lu, C., Bottsford-Miller, J., Nishimura, M., Mora, E.M., Lee, J.W., Stone, R.L., Pecot, C.V., Thanappapasr, D., Roh, J.W., Gaur, P., Nair, M.P., Park, Y.Y., Sabnis, N., Deavers, M.T., Lee, J.S., Ellis, L.M., Lopez-Berestein, G., McConathy, W.J., Prokai, L., Lacko, A.G., Sood, A.K., 2011. Targeted delivery of small interfering RNA using reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles. *Neoplasia* 13, 309-319.

Shang, Y., Brown, M., 2002. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295, 2465-2468.

Sharma, K., Das, S., Mukhopadhyay, A., Rath, G.K., Mohanti, B.K., 2009. Economic cost analysis in cancer management and its relevance today. *Indian J Cancer* 46, 184-189.

Shenoy, D.B., Amiji, M.M., 2005. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int J Pharm* 293, 261-270.

Shin, C.S., Kwak, B., Han, B., Park, K., 2013. Development of an in vitro 3D tumor model to study therapeutic efficiency of an anticancer drug. *Mol Pharm* 10, 2167-2175.

Shin, S.C., Choi, J.S., Li, X., 2006. Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *Int J Pharm* 313, 144-149.

Shmeeda, H., Mak, L., Tzemach, D., Astrahan, P., Tarshish, M., Gabizon, A., 2006. Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors. *Mol Cancer Ther* 5, 818-824.

Singh, R.P., Oh, B.K., Choi, J.W., 2010. Application of peptide nucleic acid towards development of nanobiosensor arrays. *Bioelectrochemistry* 79, 153-161.

Sinha, V.R., Kumria, R., 2001. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *Int J Pharm* 224, 19-38.

Socrates, G., 2004. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. 3th Ed, 3th ed, England.

Sonvico, F., Mornet, S., Vasseur, S., Dubernet, C., Jaillard, D., Degrouard, J., Hoebeke, J., Duguet, E., Colombo, P., Couvreur, P., 2005. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconj Chem* 16, 1181-1188.

Sporn, M.B., Dowsett, S.A., Mershon, J., Bryant, H.U., 2004. Role of raloxifene in breast cancer prevention in postmenopausal women: clinical evidence and potential mechanisms of action. *Clin Ther* 26, 830-840.

Storka, M., Tousaina, R.L., Wieringab, J.A., Bosgra, O.H., 2003. A MILP approach to the optimization of the operation procedure of a fed-batch emulsification process in a stirred vessel. *Computers & Chemical Engineering* 27, 1681-1691.

Sudimack, J., Lee, R.J., 2000. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv Drug Deliv Rev* 41, 147-162.

Sumbayev, V.V., Yasinska, I.M., 2006. Role of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in innate immune responses and viral infection. *Scand J Immunol* 63, 391-400.

Sutherland, R.L., Green, M.D., Hall, R.E., Reddel, R.R., Taylor, I.W., 1983a. Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19, 615-621.

Sutherland, R.L., Reddel, R.R., Green, M.D., 1983b. Effects of oestrogens on cell proliferation and cell cycle kinetics. A hypothesis on the cell cycle effects of antioestrogens. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19, 307-318.

Suzuki, T., Hisakawa, S., Itoh, Y., Suzuki, N., Takahashi, K., Kawahata, M., Yamaguchi, K., Nakagawa, H., Miyata, N., 2007. Design, synthesis, and biological activity of folate receptor-targeted prodrugs of thiolate histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 4208-4212.

Taghdisi, S.M., Lavaee, P., Ramezani, M., Abnous, K., 2011. Reversible targeting and controlled release delivery of daunorubicin to cancer cells by aptamer-wrapped carbon nanotubes. *Eur J Pharm Biopharm* 77, 200-206.

Taylor, I.W., Hodson, P.J., Green, M.D., Sutherland, R.L., 1983. Effects of tamoxifen on cell cycle progression of synchronous MCF-7 human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 43, 4007-4010.

Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X., Jing, X., 2012. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science* 37, 237-280.

Tibbals, H.F., 2010. *Medical Nanotechnology and Nanomedicine*. CRC Press, USA.

Torii, S., Yamamoto, T., Tsuchiya, Y., Nishida, E., 2006. ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci* 97, 697-702.

Tsujii, M., 2012. Search for novel target molecules for the effective treatment or prevention of colorectal cancer. *Digestion* 85, 99-102.

Varum, F.J., McConnell, E.L., Sousa, J.J., Veiga, F., Basit, A.W., 2008. Mucoadhesion and the gastrointestinal tract. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 25, 207-258.

Vauthier, C., Bouchemal, K., 2009. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res* 26, 1025-1058.

Vauthier, C., Couvreur, P., 2000. Development of nanoparticles made of polysaccharides as novel drug carrier systems, in: Wise, D.L. (Ed.), *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. Marcel Dekker, New York, pp. 413-429.

Verma, S., Domb, A.J., Kumar, N., 2011. Nanomaterials for regenerative medicine. *Nanomedicine (Lond)* 6, 157-181.

Vicent, M.J., Duncan, R., 2006. Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer. *Trends Biotechnol* 24, 39-47.

Vizirianakis, I.S., 2011. Nanomedicine and personalized medicine toward the application of pharmacotyping in clinical practice to improve drug-delivery outcomes. *Nanomedicine* 7, 11-17.

Vogel, V.G., 2011. Selective estrogen receptor modulators and aromatase inhibitors for breast cancer chemoprevention. *Curr Drug Targets* 12, 1874-1887.

Vrbic, S., Pejicic, I., Filipovic, S., Kocic, B., Vrbic, M., 2013. Current and future anti-HER2 therapy in breast cancer. *J BUON* 18, 4-16.

Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeltsch, J.M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., et al., 1985. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7889-7893.

Weber, C., Kreuter, J., Langer, K., 2000. Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. *Int J Pharm* 196, 197-200.

Weiss, C.K., Ziener, U., Landfester, K., 2007. A Route to Nonfunctionalized and Functionalized Poly(n-butylcyanoacrylate) Nanoparticles: Preparation in Miniemulsion. *Macromolecules* 40, 928-938.

Weissleder, R., Pittet, M.J., 2008. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 452, 580-589.

Wilhelm, C., Billotey, C., Roger, J., Pons, J.N., Bacri, J.C., Gazeau, F., 2003. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* 24, 1001-1011.

Wilhelm, C., Gazeau, F., Roger, J., Pons, J.N., Bacri, J.C., 2002. Interaction of Anionic Superparamagnetic Nanoparticles with Cells: Kinetic Analyses of Membrane Adsorption and Subsequent Internalization. *Langmuir* 18 8148-8155.

Wilking, N., Appelgren, L.E., Carlstrom, K., Pousette, A., Theve, N.O., 1982. The distribution and metabolism of ¹⁴C-labelled tamoxifen in spayed female mice. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 50, 161-168.

Wilner, S.E., Wengerter, B., Maier, K., de Lourdes Borba Magalhaes, M., Del Amo, D.S., Pai, S., Opazo, F., Rizzoli, S.O., Yan, A., Levy, M., 2012. An RNA alternative to human transferrin: a new tool for targeting human cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 1, e21.

Williams, D.F., 2009. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30, 5897-5909.

Wohlfart, S., Bernreuther, C., Khalansky, A.S., Theisen, A., Weissenberger, J., Gelperina, S., Glatzel, M., Kreuter, J., 2009. Increased Numbers of Injections of Doxorubicin Bound to Nanoparticles Lead to Enhanced Efficacy Against Rat Glioblastoma 101/8. *Journal of Nanoneuroscience* 1, 144-151.

Wong, K.K., Liu, X.L., 2012. Nanomedicine: a primer for surgeons. *Pediatr Surg Int* 28, 943-951.

Yang, J.S., Xie, Y.J., He, W., 2011. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers* 84 33-39.

Yang, S.J., Lin, F.H., Tsai, K.C., Wei, M.F., Tsai, H.M., Wong, J.M., Shieh, M.J., 2010. Folic acid-conjugated chitosan nanoparticles enhanced protoporphyrin IX accumulation in colorectal cancer cells. *Bioconjug Chem* 21, 679-689.

Yokoe, J., Sakuragi, S., Yamamoto, K., Teragaki, T., Ogawara, K., Higaki, K., Katayama, N., Kai, T., Sato, M., Kimura, T., 2008. Albumin-conjugated PEG liposome enhances tumor distribution of liposomal doxorubicin in rats. *Int J Pharm* 353, 28-34.

Zhang, L., Gu, F.X., Chan, J.M., Wang, A.Z., Langer, R.S., Farokhzad, O.C., 2008. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther* 83, 761-769.

Zhang, L., Hou, S., Mao, S., Wei, D., Song, X., Lu, Y., 2004. Uptake of folate-conjugated albumin nanoparticles to the SKOV3 cells. *Int J Pharm* 287, 155-162.

Zhang, P., Hu, L., Yin, Q., Zhang, Z., Feng, L., Li, Y., 2012. Transferrin-conjugated polyphosphoester hybrid micelle loading paclitaxel for brain-targeting delivery: synthesis, preparation and in vivo evaluation. *J Control Release* 159, 429-434.

Zhao, P., Wang, H., Yu, M., Liao, Z., Wang, X., Zhang, F., Ji, W., Wu, B., Han, J., Zhang, H., Chang, J., Niu, R., 2012. Paclitaxel loaded folic acid targeted nanoparticles of mixed lipid-shell and polymer-core: in vitro and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Biopharm* 81, 248-256.

Zhi, J., Wang, Y.J., Luo, G.S., 2005. Adsorption of diuretic furosemide onto chitosan nanoparticles prepared with a water-in-oil nanoemulsion system. *Reactive and Functional Polymers* 249-257.