

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de micropartículas de dexametasona como estrategia para
aumentar la eficacia de los esquemas de poli quimioterapia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Martín Sabroso

Directora

Ana Isabel Torres Suárez

Madrid, 2014



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

TESIS DOCTORAL

DESARROLLO DE MICROPARTÍCULAS DE
DEXAMETASONA COMO ESTRATEGIA PARA
AUMENTAR LA EFICACIA DE LOS ESQUEMAS DE
POLIQUIMIOTERAPIA

Cristina Martín Sabroso

Madrid, 2013

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



DESARROLLO DE MICROPARTÍCULAS DE
DEXAMETASONA COMO ESTRATEGIA PARA
AUMENTAR LA EFICACIA DE LOS ESQUEMAS DE
POLIQUIMIOTERAPIA

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por:

Cristina Martín Sabroso

Bajo la Dirección de la Doctora:

Ana Isabel Torres Suárez

Madrid, 2013

Ana Isabel Torres Suárez, Profesora titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA

Que la presente memoria titulada "Desarrollo de micropartículas de dexametasona como estrategia para aumentar la eficacia de los esquemas de poliquimioterapia" presentada por Cristina Martín Sabroso para aspirar al grado de doctor, ha sido elaborada bajo su dirección en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y en el Hospital Universitario La Princesa, con la colaboración de la Dra María Francisca Cano Abad; y que una vez revisada, autoriza su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firma el presente informe.

Dra. Ana Isabel Torres Suárez

Madrid, 2013

Las investigaciones realizadas en el presente trabajo se han llevado a cabo gracias al apoyo económico recibido de diferentes organismos públicos:

- Trabajo financiado por la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid mediante el contrato de Personal Investigador de apoyo (Comunidad de Madrid). Proyecto de Investigación: Diseño y evaluación de sistemas de liberación controlada (micro y nanotransportadores) de moléculas proapoptóticas (2009-2013).
- Fondo Social Europeo mediante el Plan Regional de Investigación Científica e Innovación Tecnológica.
- Programa de Grupos de Investigación Santander-UCM GR35/10, Grupo: Administración parenteral de medicamentos.

A los tres pilares de mi vida
GRACIAS

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido con su apoyo y su ayuda a la realización de esta Tesis Doctoral:

En primer lugar quiero agradecer al departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, concretamente a la Dra. Irene T. Molina Martínez y al Dr. Juan José Torrado Durán, Directores del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica durante los años en los que he desarrollado esta Tesis Doctoral, por haberme permitido la realización de la misma en el departamento, y a este último por ser además responsable del grupo de investigación “Administración parenteral de medicamentos” ya que sin su apoyo no habría podido obtener el contrato de Personal Investigador de Apoyo de la Comunidad de Madrid.

A la Doctora Ana Isabel Torres Suárez, directora de esta tesis doctoral, le quiero agradecer la oportunidad que me ha dado de trabajar en su grupo de investigación, gracias por tu dedicación y por haberme guiado durante todos estos años y especialmente quiero agradecerte todo tu apoyo y optimismo en los momentos más duros y difíciles.

A la Doctora María Cano Abad del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, al Instituto Teófilo Hernando del Hospital Universitario La Princesa y a todo su grupo, por la oportunidad que me han prestado de desarrollar mi formación en cultivos celulares y su inestimable ayuda al enseñarme todas las técnicas y conocimientos necesarios para el desarrollo de los experimentos necesarios para completar y enriquecer el trabajo realizado.

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

También quiero agradecer a todos mis compañeros del Departamento por todos

estos años compartidos. De todos vosotros guardo cariñosos recuerdos, especialmente de mis compañeros de laboratorio, sin vuestro apoyo y sin los buenos momentos que pasamos juntos habría sido imposible que este trabajo se realizara.

Por último, quiero expresar mi mayor agradecimiento a mi familia, especialmente a mis hermanos por vuestra protección y cariño, a mis padres a quienes dedico esta tesis por ser un sueño compartido y sin el apoyo e ilusión de los cuales jamás se habría hecho realidad, para mí este trabajo siempre fue un regalo para vosotros. A mis sobrinas, gracias a vuestro cariño he sabido valorar lo realmente importante y gracias por contagiarme vuestra alegría y felicidad. Y como no, a mi marido, gracias por apoyarme siempre aunque no me entendieras, gracias por enseñarme a ver las cosas desde otro punto de vista y sobre todo gracias por estar siempre ahí demostrándome que los sueños se cumplen aunque no siempre sea fácil.

Índice

Agradecimientos	XI
Abreviaturas	XV
1. Introducción	1
1.1. Dexametasona	3
1.2. Dexametasona y cáncer	5
1.2.1. Mecanismos implicados en la muerte celular	6
1.2.2. Aplicaciones	7
1.2.3. Resistencias	10
2. Objetivos y planteamiento	17
2.1. Objetivos y planteamiento	19
3. Resultados: Publicaciones derivadas del trabajo realizado	23
3.1. P1: Objective: tumor. Strategies of drug targeting at the tumor mass level	25
3.2. P2: Nuevas estrategias en terapia antitumoral basadas en la inducción de la apoptosis	35
3.3. P3: Validation protocol of analytical procedures for quantification of drugs in polymeric systems for parenteral administration: Dexamethasone phosphate disodium microparticles	51
3.4. P4: Polimeric and lipid dexamethasone microparticles for inhibition of cell proliferation in antitumor therapies	61
3.5. P5: Development of ovalbumin microparticles and evaluation of their effect on cellular proliferation	93
4. Discusión	119

4.1. Búsqueda y puesta a punto de un modelo celular que permita evaluar el efecto inhibitor de la proliferación celular de dex	125
4.2. Desarrollo de micropartículas poliméricas de dex	128
4.3. Desarrollo de micropartículas lipídicas de dex	141
4.4. Desarrollo de micropartículas poliméricas de ovoalbúmina	150
5. Conclusiones	165
Resume	171

Abreviaturas

BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
DCM	Diclorometano
Dex	Dexametasona fosfato disodio
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EPR	Efecto de permeabilidad aumentada y mayor retención
FACS	Citometría de flujo
GC	Glucocorticoide
GCR	Receptor de glucocorticoides
GSK-3	Glucógeno sintasa quinasa 3
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
5-HT3	5-hidroxitriptamina
ICH	Conferencia internacional de armonización
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
MM	Mieloma múltiple
mTOR	Diana de la rapamicina en mamíferos
MTT	(3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2, 5-difenil) bromuro
NaCl	Cloruro sódico
NF	Factor nuclear
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NH	Neoplasias hematológicas
NK	Natural killer
PBS	Solución tampón fosfato
PVA	Alcohol polivinílico
USP	Farmacopea de los Estados Unidos

1 | Introducción

1.1. Dexametasona

La dexametasona es un glucocorticoide sintético de elevada potencia antiinflamatoria e inmunosupresora y baja actividad mineralocorticoide. Es 25-30 veces más potente que la hidrocortisona y 4-5 veces más potente que la prednisona [1]. Los glucocorticoides (GC) causan profundos y variados efectos metabólicos y también modifican la respuesta inmune a diversos estímulos. Concretamente, la dexametasona inhibe la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, sustancias que median en los procesos vasculares y celulares de la inflamación y de la respuesta inmunológica. Ambas acciones se deben a la inhibición de la síntesis de fosfolipasa A2, enzima encargado de liberar los ácidos grasos poliinsaturados precursores de las prostaglandinas y leucotrienos.

Los GC son hormonas esteroides que afectan a casi todos los tipos de células, y sus efectos están mediados por el receptor de GC (GCR). La dexametasona, como el resto de GC, se une a los receptores glucocorticoideos citoplasmáticos, activándolos. Como consecuencia se movilizan diferentes endopeptidasas neutras, inhibidores del activador del plasminógeno, lipocortina, etc. Además disminuyen la estabilidad de determinadas moléculas RNA-mensajeras, alterando la transcripción génica. En efecto, la unión del ligando activa el GCR, que entonces funciona como un factor de transcripción para activar o reprimir la transcripción de genes de respuesta a GC [2,3]. El gen del GCR está formado por nueve exones. GCR tiene dos isoformas principales: El GCR α clásico tiene una amplia distribución y actúa como un factor de transcripción. Participa en varios procesos fisiológicos como la homeostasis de la glucosa, metabolismo de las proteínas, lípidos y carbohidratos, actuando en interacción con otros factores. El GCR β es la isoforma constitutiva, se localiza en el núcleo y es incapaz de unirse a los esteroides [4]. Actúa como un regulador negativo del efecto de los GC [5] mediante el bloqueo de la unión de coactivadores [6].

La dexametasona es un corticoide de larga duración de acción, puesto que sus efectos se mantienen hasta 72 horas, su aclaramiento total varía entre 2,8 y 3,5 mg/minuto/kg, la semivida de eliminación es de 3-4 horas (de 3 a 6 horas para adultos; de 2,8-7,5 horas para niños de 8-16 años; y de 2,3-9,5 horas para niños menores de 2 años). Tras su administración por vía intramuscular, los niveles séricos máximos se alcanzan antes de una hora. Se distribuye ampliamente por el organismo con un grado de unión a proteínas plasmáticas del 70 %, y difundiéndose a través de

la barrera placentaria y lactosanguínea; de manera que el volumen de distribución es de 2 l/kg. Se elimina fundamentalmente mediante metabolización hepática, por reacciones de hidroxilación; y se excreta por orina, un 8 % en forma inalterada, y en menor cantidad por la bilis [7].

La dexametasona es prácticamente insoluble en agua y su solubilidad en alcohol es bastante baja [8], estas propiedades hacen necesario el uso de derivados en forma de sal para su incorporación en formas farmacéuticas y para mejorar su biodisponibilidad. Concretamente, la dexametasona fosfato permite un mejor solubilidad acuosa. Esta sal es mucho más soluble en agua a 25°C que otros corticoesteroides comúnmente empleados; por ejemplo, es 3000 veces más soluble que la hidrocortisona. Debido a esta solubilidad se emplea habitualmente en formulaciones inyectables, oftálmicas y óticas. Después de la administración, una vez que es absorbida, la dexametasona fosfato se hidroliza rápidamente por fosfatasas, dando lugar a su forma activa, dexametasona libre [9].

La dexametasona debido a su estructura adrenocorticoide, concretamente por el grupo 11- β -hidroxil, puede degradarse por oxidación, reacción catalizada por el oxígeno y la luz. Sin embargo, la dexametasona al estado sólido es relativamente estable en recipientes abiertos pero debe protegerse de la luz [10].

Debido a su potente actividad y a su amplio mecanismo de acción, la dexametasona presenta un gran número de indicaciones. Entre las más frecuentes se encuentran:

- Enfermedades endocrinas como la tiroiditis no supurativa, la hipercalcemia asociada con cáncer y la hiperplasia adrenal congénita.
- Estados alérgicos severos: asma bronquial, dermatitis de contacto o atópica, rinitis alérgica estacional o perenne, reacciones de hipersensibilidad a fármacos.
- Procesos inflamatorios y alérgicos graves, tanto agudos como crónicos, que afecten a los ojos.
- Tratamiento sistémico en periodos críticos de colitis ulcerosa y enteritis regional.
- Enfermedades dermatológicas (pénfigo, síndrome de Stevens-Johnson, dermatitis, psoriasis severa y micosis fungoide), respiratorias (sarcoidosis sintomática, beriliosis, síndrome de Loeffler, neumonitis aspirativa) y hematológicas (anemia hemolítica adquirida, púrpura trombocitopénica idiopática en adultos por vía endovenosa, trombocitopenia secundaria en adultos, eritroblastopenia y anemia hipoplásica congénita).

- Síndrome nefrótico de tipo idiopático (sin uremia) o el causado por el lupus eritematoso.
- Edema cerebral asociado con tumor cerebral, primario o metastático, craneotomía o lesión craneal.
- Tratamiento coadyuvante a corto plazo durante los episodios agudos o exacerbaciones de enfermedades reumáticas: artritis, osteoartritis postraumática, espondilitis anquilosante, epicondilitis, tenosinovitis, bursitis, etc.
- En algunos casos de lupus eritematoso sistémico y carditis reumática aguda, durante una exacerbación o como terapia de mantenimiento,
- En el tratamiento del cáncer, debido a que suprime el sistema inmune, lo que hace que sea útil para prevenir reacciones alérgicas a los fármacos quimioterápicos. También se usa para aliviar el dolor asociado con el cáncer y para aliviar la inflamación causada por los tumores en el cerebro, la médula espinal o los huesos, según reporta la Sociedad Americana de Cáncer. La Dexametasona puede aumentar los efectos antieméticos de los antagonistas del receptor de la 5-HT₃ como el ondansetron.

Las reacciones adversas más frecuentes asociadas al uso de dexametasona son trastornos del sistema inmunológico, especialmente la disminución de la resistencia a las infecciones [11], trastornos endocrinos como hiperglucemia o insuficiencia adrenocortical, aumento de apetito, cataratas, reacciones alérgicas. . . A dosis altas puede producir el síndrome de Cushing, úlcera gástrica, hirsutismo, hiperpigmentación cutánea o esclerodermia. También son comunes los trastornos musculoesqueléticos como osteoporosis y fragilidad ósea pudiendo llegar a producirse atrofia muscular.

1.2. Dexametasona y cáncer

Como se indica anteriormente, la dexametasona se introduce en los esquemas de tratamiento de diversos tipos de cáncer fundamentalmente para reducir los efectos secundarios de los quimioterápicos. Sin embargo, recientemente se ha observado que la dexametasona también regula la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación celular por ser inductor de la expresión genética mostrando una actividad proapoptótica [12], lo que podría ser interesante ya que contribuiría a un mayor efecto del tratamiento.

A grandes dosis, la dexametasona tiene efecto apoptótico al activar nucleasas y

especies reactivas. Cuando este inductor genera un estímulo de muerte y una serie de señales proapoptóticas, se dispara de manera irreversible el proceso de muerte celular [13]. Sin embargo, esta acción de la dexametasona es tejido específica, por lo que puede provocar respuestas opuestas en diferentes tipos celulares, identificándose células sensibles y células resistentes a los efectos de dexametasona [14,15].

1.2.1. Mecanismos implicados en la muerte celular

Los GC regulan tanto la vía extrínseca como la intrínseca de la apoptosis, mediante acciones no genómicas o expresión “de novo gene” [16]. El mecanismo molecular por el que los GC median la apoptosis no está totalmente dilucidado.

Una de las teorías más postuladas es que los GC median la apoptosis a través de la vía intrínseca [17] ya que inducen alteraciones mitocondriales y como es sabido, la mitocondria es clave en el inicio de la vía apoptótica intrínseca [18,19]. Las alteraciones de la membrana, la reducción del potencial de membrana mitocondrial, y la liberación de proteínas pro-apoptóticas, como citocromo c y el factor inductor de apoptosis, son eventos descritos en la vía apoptótica, que se han detectado con el tratamiento de GC, pudiéndose afirmar que el tratamiento con dexametasona altera la composición de la membrana mitocondrial, y por lo tanto altera sus propiedades, dando lugar a mitocondrias más frágiles y sensibles y a la aparición de la apoptosis. En contraste, las células GC-resistentes, no muestran cambios a nivel mitocondrial [20].

Además mediante inhibición de GSK-3, una serina/treonina protein quinasa que facilita la señalización de la vía intrínseca en la apoptosis a través de varios mecanismos, se determinó que la apoptosis inducida por GC estaba mediada por dicha quinasa y por tanto corroboraba la activación de la vía intrínseca por la dexametasona [21].

Además se han descrito alteraciones metabólicas implicadas en la apoptosis inducida por GC como son la reducción en la captación de glucosa celular, producción de lactato y contenido en ATP. Por el contrario, la sobrerregulación de importantes vías metabólicas como glicolisis, fosforilación oxidativa, metabolismo de glutamato y biosíntesis de colesterol a nivel de transcripción han sido relacionadas con la resistencia a GC [20].

1.2.2. Aplicaciones

Las neoplasias hematológicas (NH) forman un grupo de enfermedades que provienen de la expansión clonal de células hematopoyéticas, determinando el estado de diferenciación de la transformación celular, el fenotipo de la enfermedad. En esta categoría se incluyen las leucemias, los linfomas y el mieloma múltiple. Su incidencia está en aumento en los países desarrollados, siendo de los pocos tipos de tumores donde la mortalidad se ha incrementado en los últimos años. Aunque se diagnostican en todos los grupos de edad, son enfermedades que inciden más en edades avanzadas por lo que el envejecimiento de la población hace que cada vez se vean más casos en la clínica. Se calcula que el 8 % de los diagnósticos de cáncer se corresponden a una NH. Actualmente se están utilizando diferentes estrategias para aumentar la respuesta a los agentes antineoplásicos, y son numerosas las investigaciones en busca de nuevos tratamientos que aumenten la tasa de supervivencia y reduzcan el riesgo de recaídas.

Los linfomas o neoplasias linfoides se caracterizan por la proliferación de células del sistema linfático. Se clasifican en 3 categorías principales basándose en la morfología y el linaje celular: neoplasias de células B, neoplasias de células T y células NK (natural killer o asesinas naturales), y linfoma de Hodgkin. Los distintos linfomas afectan a más de un millón de personas en todo el mundo y su incidencia está aumentando en los últimos años.

El efecto proapoptótico de la dexametasona es particularmente importante en el tratamiento de los tumores linfoides, particularmente en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) [22,23]. De hecho, provoca una rápida reducción de la carga tumoral, sin causar mielosupresión [24], y numerosos estudios han demostrado que la respuesta inicial de un paciente a la terapia con GC es un fuerte indicador de un buen pronóstico [22]. A pesar de una alta tasa de curación (75 %), los graves efectos secundarios relacionados con el tratamiento, la resistencia, y las recaídas se observan con frecuencia, especialmente en la LLA de linaje T (LLA-T) más que en la B-LLA, donde la resistencia a GC aparece en el 10-30 % de los pacientes y siempre conduce al fracaso de la quimioterapia [25]. LLA-T es un tumor altamente maligno representando el 10 %-15 % en pediatría y el 25 % en los adultos de las LLA, con una tasa de recaída de aproximadamente el 30 % [26]. LLA-T tiene un pronóstico menos favorable que la de células B.

En este caso, la dexametasona forma parte del esquema de poliquimioterapia típico para la etapa de inducción y de consolidación del tratamiento, que incluye [27]:

- Vincristina.
- Dexametasona o prednisona.
- Doxorrubicina (Adriamycin), daunorrubicina o un medicamento similar de antraciclina.
- Con base en los factores pronósticos del paciente, algunos regímenes también pueden incluir ciclofosfamida (Cytosan), L-asparaginasa, etopósido (VP-16) y/o altas dosis de metotrexato o citarabina (ara-C) como parte de la fase de inducción.
- Para aquellos pacientes con ALL cuyas células leucémicas tienen un cromosoma Filadelfia, con frecuencia también se incluye un medicamento dirigido tal como imatinib (Gleevec)

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia hematológica frecuente, representando el 10 % de los casos, y el 1 % de todas las neoplasias. Su incidencia también se incrementa con la edad, situándose la edad media al diagnóstico por encima de los 60 años. La supervivencia media tras el diagnóstico es de 30 meses, aunque varía notablemente en función de la edad del paciente y la etapa de la enfermedad.

La dexametasona es un fármaco incluido en los esquemas de poliquimioterapia del MM. En la siguiente tabla se recogen los diferentes esquemas de poliquimioterapia utilizados en la actualidad [27]:

Tratamientos	Ventajas	Desventajas
VAD Vincristina Adriamicina Dexametasona	Responde en un 70 %. No daña las células madre. Son la base para el trasplante de células madre. Los síntomas de la enfermedad activa se pueden controlar con mayor rapidez y la calidad de la primera remisión suele ser mejor.	La administración intravenosa requiere una vía central (catéter). La vincristina puede causar daños neurológicos.
C-VAD Ciclofosfamida Vincristina Adriamicina Dexametasona		
C-VAMP Ciclofosfamida Vincristina Adriamicina Metilprednisona		
Sólo dexametasona	Administración oral. Se piensa que proporciona un alto porcentaje de los beneficios que se obtienen con la combinación VAD.	Puede ser mal tolerada en tratamientos intensivos.
MP Mefalan Prednisolona	Administración oral. Bien tolerado. Responde en un 50 %. Protocolo muy conocido.	Produce daño en las células madre reduciendo las posibilidades de recogida si se planea un trasplante posterior.
C- Semanal Ciclofosfamida	Administración oral. No daña las células madre.	
ABCM Adriamicina BCNU Ciclofosfamida Melfalan	Administración combinada: oral e intravenosa.	Puede producir daño en las células madre.
CTD Ciclofosfamida Talidomida Dexametasona	Administración oral. No daña las células madre.	Potenciales efectos secundarios de la Talidomida: trombosis y complicaciones neurológicas.
TD Talidomida Dexametasona	Responde en un 70 %.	

Tratamientos	Ventajas	Desventajas
PAD Velcade® Adriamicina		Administración intravenosa. Se necesitan diversas visitas al hospital.
Dexametasona	No daña las células madre.	Potenciales efectos secundarios del Velcade:
VD Velcade® Adriamicina		complicaciones neurológicas.
MPT Melfalan Prednisolona Talidomida	Administración oral	Produce daño en las células madre reduciendo las posibilidades de recogida si se planea un trasplante posterior. Efectos secundarios de la Talidomida.

Además de en los casos anteriormente descritos, los GC inhiben la proliferación celular de determinadas líneas celulares transformadas, sobre células de osteosarcoma, células de hepatoma, glioma y células de tumor mamario [28].

1.2.3. Resistencias

Dilucidar por qué algunos pacientes responden a la terapia con GC, y otros no, sigue siendo el foco de muchos estudios [29,30]. Se sospecha que probablemente depende del tipo de enfermedad, régimen de tratamiento, y los antecedentes genéticos del paciente.

Un ejemplo de esta especificidad sería el ensayo llevado a cabo in vitro en diferentes líneas celulares de melanoma tratadas con dexametasona durante 3 días. Este tratamiento fue eficaz sólo en una de las cuatro líneas estudiadas, dando lugar a un 25 % de inhibición del crecimiento en el caso de células WM983A, mientras que no se encontraron efectos significativos en las otras 3 líneas celulares. El efecto inhibitorio fue debido a la inducción de la apoptosis. Al ampliar el tratamiento a 40 μM de dexametasona durante 5 días inhibió el crecimiento de las células HT168-M1 y HT199 al 50 % [16], por lo que se podría intuir que este efecto puede ser detectado a grandes dosis pero en muchas líneas celulares este efecto no es detectado ni con un mayor tiempo de tratamiento ni con un aumento de la dosis.

El mecanismo que explica el desarrollo de resistencia a GC es escasamente entendido. La regulación positiva de importantes vías metabólicas incluyendo las vías de la glicólisis, la fosforilación oxidativa, el metabolismo del glutamato y la biosíntesis de colesterol en el nivel transcripcional se han relacionado con resistencia a la GC [31]. Además, un número creciente de trabajos indica que la activación de la vía de señalización mTOR (diana de la rapamicina en mamíferos) puede contribuir a la resistencia a GC en neoplasias hematológicas.

La resistencia a la terapia con GC puede producirse si [16]:

- Las isoformas de GCR inactivas están presentes de forma mayoritaria.
- Si están sobreexpresados los miembros de la familia de ABC-transportadores.
- La vía apoptótica está inhibida, por ejemplo, por sobreexpresión Bcl-2.

La isoforma α del GCR ($\text{GCR}\alpha$) está organizada en módulos, que contienen un dominio N-terminal de transactivación, un dominio de unión al DNA, y un dominio C-terminal de unión al ligando. En el modelo clásico de señalización de GC, la unión al ligando estimula la translocación de $\text{GCR}\alpha$ desde el citoplasma al compartimento nuclear. En el núcleo, $\text{GCR}\alpha$ regula la expresión de genes implicados en diversos procesos, tales como la inmunidad, la inflamación, el metabolismo, la proliferación celular y la supervivencia. $\text{GCR}\alpha$ activa directamente o reprime la transcripción a través de elementos específicos de respuesta hormonal y del reclutamiento de coactivadores o correpresores, respectivamente [32]. $\text{GCR}\alpha$ también puede modular la transcripción de genes independientes por su unión al DNA y la interacción con otro factor de transcripción, el factor nuclear κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) [33]. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ también regula la expresión de genes implicados en la inmunidad, la inflamación y el cáncer. De hecho, el efecto inmunosupresor y la actividad antiinflamatoria de los GC se atribuyen a la acción del $\text{GCR}\alpha$ como antagonista funcional de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ [32]. En ciertos tipos de células, el GCR y el $\text{NF-}\kappa\text{B}$ también presentan acciones opuestas sobre la muerte celular programada (apoptosis). Por ejemplo, el $\text{NF-}\kappa\text{B}$ contribuye a la actividad antiapoptótica de células de leucemia, linfoma y mieloma [34,35]. Así, el $\text{GCR}\alpha$ actúa como el antagonista funcional de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ impulsando un mecanismo de inducción de apoptosis por GC en ciertos tipos de células.

Existen mutaciones o polimorfismos en el gen del GCR [36]. La base molecular de la resistencia a GC se ha atribuido a mutaciones en el gen GCR que codifica para un factor de transcripción dependiente del ligando. Las mutaciones alteran la sensibilidad de los tejidos a los GC, afectando a la transducción de señal, y conllevando

una resistencia a los GC o una hipersensibilidad a los mismos. El estudio de defectos funcionales de los mutantes naturales del gen del GCR mejora la comprensión de los mecanismos moleculares de la acción del receptor y destaca la importancia de los mecanismos de señalización celular y molecular integrados para mantener la homeostasis y preservar una fisiología normal.

Parece evidente, respecto de los mecanismos de resistencia a GC, que los datos actualmente disponibles sugieren que no existe una vía principal o «interruptor» crítico, sino que dichos mecanismos son diversos, actúan sobre distintos puntos de las vías de acción terapéutica, y probablemente se combinan de forma variable. El conocimiento recabado hasta la fecha a través de diversos trabajos nos presenta este panorama de complejidad, pero nos indica asimismo que existen mecanismos identificables y por descubrir de resistencia a los GC, y por lo tanto potenciales metas de intervención farmacológica trasladable a beneficios clínicos.

Bibliografía

[1] Thote A.J, Chappell J.T, Gupta R.B. Reduction in the initial-burst release by surface crosslinking of PLGA microparticles containing hydrophilic or hydrophobic drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy* (2005) 1:43-57.

[2] Webster J.C, Cidlowski J.A, Mechanisms of glucocorticoid-receptor-mediated repression of gene expression. *Trends Endocrinol. Metab.* (1999) 10:396-402.

[3] Wright A.P, Zilliacus J, McEwan I.J, Dahlman-Wright K, Almlöf T, Carlstedt-Duke J, Gustafsson J.A, Structure and function of the glucocorticoid receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (1993) 47:11-19.

[4] Necela BM, Cidlowski JA, Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc Am Thorac Soc* (2004) 1:239-246.

[5] Beato M, Klug J, Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* (2000) 6:225-236.

[6] Charmandari E, Chrousos GP, Ichijo T et al, The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGRalpha by interfering with formation of active coactivator complexes. *Mol Endocrinol* (2005) 19:52-64.

[7] Ficha técnica Dexametasona. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. (2013) <http://www.aemps.gob.es/>.

[8] Gómez-Gaete C, Tsapis N, Besnard M, Bochot A, Fattal E, Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* (2007) 331:153-159.

[9] Zhang M, Moore GA, Jensen BP, Begg EJ, Bird PA, Determination of dexamethasone and dexamethasone sodium phosphate in human plasma and cochlear perilymph by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* (2011) 879(1):17-24.

[10] Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE (1989) *The Merck Index*, Dexamethasone, p. 463-464.

[11] Min-ting W, Yun J, Yun-xia Y, Chun-yan Z, Hong-yun Y, Xue-fan X. et al, In vitro biodistribution, anti-inflammatory, and hepatoprotective effects of liver

targeting dexamethasone acetate loaded nanostructured lipid carrier system. *Int. J. Nanomedicine* (2010) 5: 487-497.

[12] Hong D, Chen H.X, Yu H.Q, Wang C, Deng H.T. et al, Quantitative proteomic analysis of dexamethasone-induced effects on osteoblast differentiation, proliferation, and apoptosis in MC3T3-E1 cells using SILAC. *Osteoporos.* (2011) 22:2175-2186.

[13] Hernández MT, Sabanero ML, Barbosa G, Gallegos M. Estaurosporina y dexametasona, inductores apoptóticos en células coriónicas y transformadas. 2° Congreso Nacional de Química Médica.

[14] Gross K.L, Cidlowski J.A, Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol. Metab.* (2008) 19:331-339.

[15] Keith B.D, Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on non-hematologic malignancy. *BMC Cancer* (2008) 8:84.

[16] Dobos J, Kenessey I, Tímár J, Ladányi A, Glucocorticoid Receptor Expression and Antiproliferative Effect of Dexamethasone on Human Melanoma Cells. *Pathol. Oncol. Res.* (2011) 17:729-734.

[17] Herr I, Gassler N, Friess H, Buchler M.W, Regulation of differential pro- and antiapoptotic signaling by glucocorticoids. *Apoptosis* (2007) 12:271-91.

[18] Joza N, Susin S.A, Daugas E, Stanford W.L, Cho S.K, Li C.Y. et al, Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death, *Nature* (2001) 410:549-554.

[19] Scorrano L., Korsmeyer S.J, Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) 304:437-444.

[20] Eberhart K, Rainer J, Bindreither D, Ritter I, Gnaiger E. et al, Glucocorticoid-induced alterations in mitochondrial membrane properties and respiration in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Biochim Biophys Acta* (2011) 1807:719-725.

[21] Nuutinen U, Ropponen A, Suoranta S, Eeva J, Eray M, Pellinen R. et al, Dexamethasone-induced apoptosis and up-regulation of Bim is dependent on glycogen synthase kinase-3. *Leukemia Research* (2009) 33:1714-1717.

[22] Dordelmann M, Reiter A, Borkhardt A, Ludwig W.D. et al, Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic

leukemia. *Blood* (1999) 94:1209-1217.

[23] Pui C.H, Evans W.E, Treatment of acute lymphoblastic leukemia, *N. Engl. J. Med.* (2006) 354:166-178.

[24] Langebrake C, Reinhardt D, Ritter J, Minimising the long-term adverse effects of childhood leukaemia therapy. *Drug Saf.* (2002) 25:1057-1077.

[25] Kaspers GJ, Pieters R, Klumper E, De Waal FC, Veerman AJ, Glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leuk Lymphoma* (1994) 13:187-201.

[26]. Van Grotel M, Meijerink JP, van Wering ER, Langerak AW, Beverloo HB, Buijs-Gladdines JG: et al, Prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences. *Leukemia* (2008) 22:124-131.

[27] American Cancer Society (2013) <http://www.cancer.org/>

[28] Chung YJ, Lee JI, Chong S, Seok JW, Park SJ, Jang HW, Kim SW, Chung JH, Anti-proliferative effect and action mechanism of dexamethasone in human medullary thyroid cancer cell line. *Endocr Res.* (2011) 36(4):149-57

[29] Schwartz J.R, Sarvaiya P.J, Vedeckis W.V, Glucocorticoid receptor knock down reveals a similar apoptotic threshold but differing gene regulation patterns in T-cell and pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2010) 320:76-86.

[30] Gu L, Zhou C, Liu H, Gao J, Li Q, Mu D, Rapamycin sensitizes T-ALL cells to dexamethasone-induced apoptosis. *J. Exp. Clin. Canc. Res.* (2010) 29:150

[31] Beesley A.H, Firth M.J, Ford J, Weller R.E, Freitas J.R, Perera K.U, Kees U.R, Glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia is associated with a proliferative metabolism, *Br. J. Cancer* (2009) 100:1926-1936.

[32] Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L. et al, Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* (1995) 9:401-412.

[33] Reichardt HM, Tuckermann JP. et al, Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J* (2001) 20:7168-7173

[34] Giri DK, Aggarwal BB, Constitutive activation of NF- κ B causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells. Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* (1998) 273:14008-14014.

[35] Shishodia S, Sethi G, Konopleva M, Andreeff M, Aggarwal B.B, A synthetic triterpenoid, CDDO-Me, inhibits Bkinase and enhances apoptosis induced by TNF and chemotherapeutic agents through down-regulation of expression of nuclear factor B-regulated gene products in human leukemic cells. *Clin Cancer Res* (2006) 12:1828-1838.

[36] Beesley AH, Weller RE, Senanayake S, Welch M, Kees UR, Receptor mutation is not a common mechanism of naturally occurring glucocorticoid resistance in leukaemia cell lines. *Leuk Res* (2009) 33:321-325.

2 | Objetivos y planteamiento

2.1. Objetivos y planteamiento

En los últimos años el fármaco dexametasona se ha introducido en diversos protocolos de poliquimioterapia, no sólo por su capacidad de disminuir muchos de los efectos secundarios de los agentes antineoplásicos, sino porque además, suscita gran interés debido a su actividad inhibidora de la proliferación celular, aportándole por tanto, el protagonismo de otro agente antineoplásico más, que ha demostrado tener un gran eficacia en el tratamiento de diversos tipos de tumores.

Sin embargo, la dexametasona, a pesar de ser un principio activo comúnmente utilizado en terapéutica, presenta importantes efectos secundarios (insuficiencia adrenocortical, síndrome de Cushing), especialmente relacionados con su empleo continuado y con las dosis altas. Ajustar los protocolos de quimioterapia a las concentraciones de dexametasona más adecuadas es el objetivo de las últimas investigaciones en este campo, ya que se ha comprobado que dosis bajas de dexametasona presentan una mayor eficacia en el tratamiento del mieloma múltiple que las dosis altas utilizadas hasta la fecha, siendo especialmente importante un buen control de los niveles plasmáticos de la dexametasona para optimizar al máximo los resultados. Este mayor control de los niveles plasmáticos podría lograrse con sistemas de liberación controlada que evitan las concentraciones plasmáticas en forma de diente de sierra tradicionales de las formulaciones orales y que suponen una mayor comodidad para el paciente frente a la administración parenteral mediante infusión (30-90 min).

Esta ventaja junto con problemas tecnológicos derivados de la escasa solubilidad de la dexametasona y su baja estabilidad ante la luz y el oxígeno, hacen que se nos plantee como objetivo global de esta tesis doctoral el desarrollar sistemas de liberación controlada de dexametasona como estrategia para aumentar la eficacia de los esquemas de poliquimioterapia. Concretamente se seleccionaron las micropartículas biodegradables como los sistemas más adecuados para alcanzar dicho fin. Este objetivo general se divide en dos objetivos específicos:

1. Desarrollar micropartículas biodegradables de dexametasona como sistemas capaces de proporcionar un efecto inhibitor de la proliferación celular prolongado en el tiempo tras una única administración por vía parenteral (subcutánea o intramuscular). Estas micropartículas, además de evitar la degradación de dexametasona protegiéndola de la luz y el oxígeno; mejorarían la pauta posológica de los pacientes sometidos a poliquimioterapia; e incluso podrían

mejorar la eficacia de los tratamientos al permitir un mejor control de los niveles plasmáticos del fármaco.

2. Evaluar el efecto que diferentes materiales transportadores utilizados en la elaboración de micropartículas biodegradables pueden tener sobre la inhibición de la proliferación celular inducida por dexametasona. Se parte de la hipótesis de que los transportadores de naturaleza lipídica, a diferencia de los transportadores de naturaleza polimérica, podrían potenciar el efecto de dexametasona al favorecer su internalización en la célula tumoral.

Para alcanzar estos objetivos, se comienza realizando una revisión bibliográfica sobre las diferentes estrategias en las que se está investigando en la actualidad con el fin de aumentar la eficacia de los tratamientos contra el cáncer. Dentro de estas estrategias se profundiza en aquellas encaminadas a mejorar la eficacia de agentes antitumorales ya conocidos; donde quedaría encuadrado este trabajo. Ya que, según la bibliografía consultada, el efecto inhibitor de la proliferación celular de dexametasona parece estar relacionado con un efecto inductor de los mecanismos de apoptosis celular, se realiza también un profundo estudio del mecanismo de la apoptosis y de los nuevos agentes antineoplásicos desarrollados para actuar sobre esta diana terapéutica.

Partiendo de este estudio teórico, se plantea el trabajo experimental estructurado en los siguientes apartados:

- Definición, puesta a punto y validación de un método analítico por HPLC que permita la cuantificación de dexametasona fosfato disodio tanto incorporada en las micropartículas como liberada de las mismas en los ensayos de cesión *in vitro*.
- Diseño y desarrollo de micropartículas poliméricas de dexametasona fosfato disodio, mediante la técnica de evaporación-extracción del solvente a partir de emulsiones O/A, incluyendo la optimización de la formulación y del procedimiento de microencapsulación en función de las características de las micropartículas obtenidas.
- Diseño y desarrollo de micropartículas lipídicas de dexametasona fosfato disodio, mediante la técnica de atomización (Spray drying), incluyendo la optimización de la formulación y del procedimiento de microencapsulación en función de las características de las micropartículas obtenidas.

- Caracterización in vitro de las micropartículas poliméricas y lipídicas obtenidas en cuanto a tamaño (debe ser inferior a 100 μm para permitir su administración parenteral); morfología; contenido en principio activo y eficacia de encapsulación; compatibilidad principio activo-excipientes; disposición de la dexametasona en las micropartículas; y cinética de cesión in vitro.
- Búsqueda y puesta a punto de un modelo celular que permita evaluar el efecto inhibitor de la proliferación celular y el efecto inductor de la apoptosis de dexametasona.
- Evaluación del efecto inhibitor de la proliferación celular y del efecto inductor de la apoptosis de las micropartículas poliméricas y de las micropartículas lipídicas cargadas con dexametasona.

Como consecuencia de los resultados obtenidos, se incluyó un nuevo punto en el desarrollo experimental del trabajo:

- Desarrollo de micropartículas de ovoalbúmina mediante la técnica de evaporación-extracción del solvente a partir de emulsiones A/O/A, y evaluación en cultivos celulares de su efecto sobre la proliferación celular.

El trabajo de investigación, tanto de revisión como experimental, realizado para alcanzar los objetivos definidos en esta tesis ha dado lugar a 5 trabajos científicos, tres de ellos ya publicados y dos enviados a sendas revistas para su publicación. Estos trabajos son:

- P1: Objective: tumor. Strategies of drug targeting at the tumor mass level
- P2: Nuevas estrategias en terapia antitumoral basadas en la inducción de la apoptosis
- P3: Validation protocol of analytical procedures for quantification of drugs in polymeric systems for parenteral administration: Dexamethasone phosphate disodium microparticles
- P4: Polimeric and lipid dexamethasone microparticles for inhibition of cell proliferation in antitumor therapies
- P5: Development of ovalbumin microparticles and evaluation of their effect on cellular proliferation

3 | Resultados: Publicaciones derivadas del trabajo realizado

Objective: tumor. Strategies of drug targeting at the tumor mass level

C. Martín Sabroso · A. I. Torres-Suárez

Received: 19 March 2013 / Accepted: 27 June 2013
© Federación de Sociedades Españolas de Oncología (FESEO) 2013

Abstract Concurrent with the development of new anti-tumor drugs, there is intensive research to develop strategies and systems to optimize the efficacy of well-known anticancer agents. The main research lines are: (a) reduction in toxicity, (b) improvement of administration and (c) overcoming drug resistance. Drug targeting systems allow us to act on these three points. The best way to increase efficacy and reduce toxicity of an anticancer agent is targeting the drug at the level of the tumor masses and maintaining its concentration there for enough time to optimize its therapeutic action. Numerous strategies have been developed to achieve this second order targeting, based on the use of polymeric-drug conjugates, polymeric micelles, liposomes and albumin conjugates and nanoparticles, whose main features of toxicity, efficacy and administration are discussed in this review.

Keywords Drug targeting · Anticancer therapy · Polymeric-drug conjugates · Polymeric micelles · Liposomes · Albumin

Introduction

Cancer is the second leading cause of death in developed countries, after cardiovascular diseases. Worldwide, the

expected mortality from cancer will increase to reach 11.5 million deaths in 2030, in part due to population growth and aging. New therapeutic targets and anticancer agents are being investigated to try to stop this trend. Concurrently, an intensive research activity is being carried out to develop strategies and systems to improve the efficacies of well-known anticancer agents. The main research lines are: (a) reducing their toxicity, (b) making their administration easier and (c) overcoming drug resistance [1]. Drug targeting systems allow us to act on these three points.

Reducing anticancer drugs toxicity

Chemotherapy implies, mostly, the use of cytotoxic drugs to kill tumor cells, but toxic effects happen by exposure of normal cells to the drug. Obviously, if the drug is selectively targeted to the tumor, greater effectiveness will be achieved with limited drug distribution by critical normal tissues, resulting in fewer adverse effects [2].

In solid tumors, the vascular network is different from that in normal tissue. The vascular network of solid tumors shows an increased permeability to macromolecules, known as the enhanced permeability and retention effect (EPR) [3]. Blood vessels that supply tumor tissue present pores or fenestrations with a diameter between 100 and 1,200 nm, making them permeable to macromolecules; whereas fenestrated blood capillaries located in healthy tissues (pancreas, liver, spleen, gastrointestinal tract...) show pores of 80–100 nm and are therefore only permeable to significantly smaller molecules [4].

An increased presence of macromolecules in the tumor tissue cannot be explained only by the increased permeability of the vascular network, but is also due to the reduced clearance of molecules with molecular weight above 40 kDa [5]. Smaller molecules are rapidly cleared

C. Martín Sabroso · A. I. Torres-Suárez (✉)
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 2040 Madrid, Spain
e-mail: galaaaa@farm.ucm.es

A. I. Torres-Suárez
Institute of Industrial Pharmacy, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

from the tumor interstice, whereas larger ones are retained, showing high intratumor concentrations even 100 h after their subcutaneous administration [5]. This macromolecular retention in tumor tissue is mainly due to a reduction in the lymphatic drainage.

In conclusion, the combination of a higher permeability and increased retention (EPR) is why macromolecules accumulate in solid tumors, and this fact makes macromolecules and nanoparticles effective carriers to selectively deliver anticancer agents at the level of the tumor mass.

Central nervous system tumors are especially difficult to treat because most anticancer agents show low distribution through biophase after their systemic administration in conventional pharmaceutical formulations, due to the low permeability of the blood–brain barrier (BBB). That is why higher doses must be administered, resulting in greater toxicity. Nanometric carriers are being developed to be able to cross this barrier, so the anticancer agent can be carried across the BBB and be released to the brain tumor, raising its concentration at this level [6].

Improvement of drug administration

Drug targeting systems can also result in an improvement in administration of anticancer agents. For example, many anticancer drugs are highly lipophilic, making their formulation as solutions for parenteral administration at therapeutic doses difficult [7, 8]; but they can be administered as nanoemulsions or micelles stabilized by surfactants [8], or incorporated into polymeric or lipid nanoparticles. These systems allow not only formulation of drugs in liquid dosage forms, making their systemic distribution easier, but also protect them avoiding their degradation over their distribution (especially important in the case of peptide based molecules), and even they can release the drug in a sustained way, maintaining effective concentrations at the target tumor during a long period of time.

Overcoming drug resistance

Drug targeting systems can diminish multidrug resistance making access of the drug into tumor cells easier. In the interstitial liquid, the targeting system penetrates into the cell, in general, by endocytosis and without employing carrier proteins, in such a way that a decrease in protein expression does not affect drug penetration.

Another way to overcome resistances can be by combining anticancer agents. Combination therapy is traditionally used in cancer treatment because it improves the therapeutic profile of the drugs used separately. Drug targeting systems are commonly used to deliver a single anticancer agent; but new systems have been developed to

carry two anticancer agents simultaneously. The objective of this approach is to optimize the therapeutic effect and overcome drug resistance mechanisms [9]. Indeed, the combination of anticancer agents which show different cytotoxic activities (act at different phases in the cell cycle, on different targets...) can improve the therapeutic index, due to the increase in the efficacy, the decrease in multi-drug resistance or the reduction in toxicity.

Drug targeting systems at the level of the tumor mass

The best way to improve efficacy and reduce the toxicity of an anticancer agent is targeting the drug at the level of the tumor mass and maintaining its concentration there long enough to obtain an optimal therapeutic effect [10]. Physiological and biochemical characteristics of tumor tissues allow the design of different drug targeting systems where by just controlling their size and their surface characteristics a second order targeting at the tumor level can be achieved. Furthermore, the binding of specific ligands to these targeting systems makes possible their localisation at the tumor cell level by specific interaction with membrane receptors, achieving a third order of targeting (Table 1). In spite of the promising therapeutic advantages of these ligand-targeting nanosystems due to their high selectivity to the tumor cells and their ability to penetrate into the cell by different mechanisms and deliver their drug to specific cell organelles, the low in vitro-in vivo correlation of the results obtained with these systems mean that, at present, most of the marketed and in phase III targeting systems act at the level of the tumor mass.

Table 1 Strategies for antitumor drug targeting

Targeting strategies	
Passive targeting	Vector characteristics
Enhanced permeability and retention (EPR)	Macromolecules and nanoparticles, 100–1,200 nm
Mononuclear phagocyte system accumulation	Small liposomes
Enhanced energy and nutrient needs of tumor mass	Albumin as drug carrier
Acidic environment of the tumor mass	Acid-sensitive hydrazone linker
Active targeting	Vector characteristics
Antigen receptors expressed in tumor cells	Monoclonal antibodies link to drug carriers
Transferrin receptors expressed in tumor cells	Transferrin molecules link to drug carriers
Asialoglycoprotein receptors in hepatocytes	Sugars link to drug carriers

Polymeric conjugates

Polymeric conjugates are constituted by a biocompatible polymer that can either be biodegradable (poly-L-glutamic) or not biodegradable (*N*-(2-hydroxypropyl)metacrylamide), which is linked to the drug by a covalent bond, improving the pharmacokinetic profile of the anticancer agent by decreasing its distribution volume and its elimination phase [11].

Intravenous administered polymeric-drug conjugates are passively accumulated in the tumor interstitial space due to the EPR effect, resulting in 10- to 100-fold increases in concentration compared to an equivalent dose administered in a conventional formulation; healthy tissue exposure is reduced, which is associated with a favorable toxicity profile. Active drug is release from the conjugate slowly, generally by enzymatic hydrolysis, and the contact time between the tumor cell and the anticancer agent is increased. Moreover, highly lipophilic drugs conjugation with polymers can lead to water-soluble conjugates and therefore water-base formulations free of solubilising agents, which usually show high toxicity.

Polymer-drug conjugates are used for the delivery of single therapeutic agents as well as for combination therapy. The term “polymer-drug conjugate for combination therapy” encompasses at least four types of systems (Fig. 1): (1) Polymer-drug conjugate plus free drug or with another type of treatment as radiotherapy. (2) Polymer-drug conjugate plus polymer-drug conjugate: two polymer-drug conjugates, each with a single anticancer agent, are administered in combination. (3) Single polymer-drug conjugate carrying a combination of drugs: two or more drugs are attached to a single polymeric carrier. (4) polymer-directed enzyme prodrug therapy and polymer enzyme liposome therapy: a

polymer-drug conjugate carrying a single therapeutic agent or a liposomal system is combined with a polymer-enzyme conjugate that is responsible for drug release by acting on the drug-polymer link or the liposomal system [12].

Paclitaxel poliglumex

Paclitaxel, one of the anticancer agents that has garnered considerable interest in therapeutics, inhibits cellular proliferation and induces apoptosis by binding to the N-terminal 31 amino acids of the β -tubulin subunit. As a result, the mitotic spindle is disabled and cell division cannot be completed [13]. Paclitaxel poliglumex (PPX), a polymer-drug conjugate, was designed to enhance the efficacy and safety of paclitaxel by improving its pharmacokinetic profile and providing a water-soluble alternative to the conventional paclitaxel formulation marketed as Taxol[®]. This formulation uses CremophorEL as a solubilizing agent, which is responsible for major serious side effects (hypersensitivity reactions and neuropathies) and for the dose-limiting toxicity associated with Taxol[®]. PPX is water-soluble and can be administered as a 10–20 min infusion [14]. Table 2 summarizes a comparison of the main features of these two paclitaxel formulations.

Paclitaxel is conjugated by ester linkage to the γ -carboxylic acid side chains of poly-L-glutamic, a biodegradable polymer, resulting in a relatively stable conjugate [15]. Because the conjugation site is through the 2' hydroxyl of paclitaxel, a site crucial for tubulin binding, the paclitaxel conjugate does not interact with β -tubulin and is inactive.

Paclitaxel poliglumex, after its parenteral administration, is accumulated at the level of the tumor mass, and internalized in tumor cells by endocytosis of the polymer-drug conjugate followed by intracellular release of active paclitaxel by lysosomal enzymes [14].

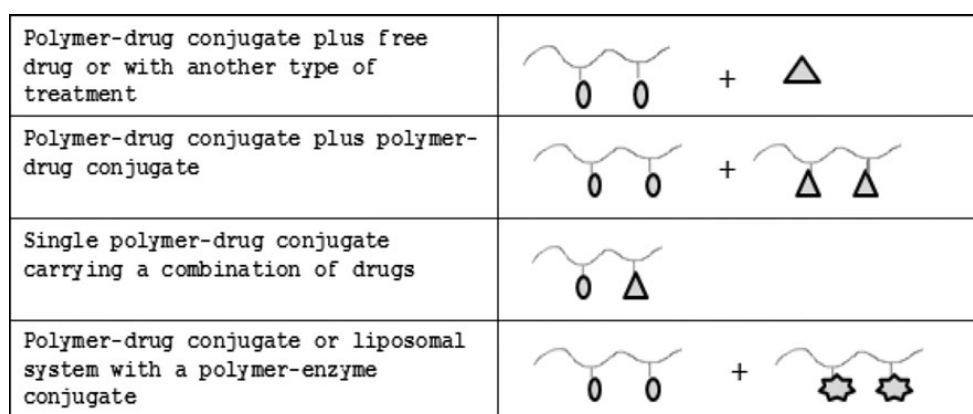


Fig. 1 Types of polymer-drug conjugate for combination therapy system

Table 2 Paclitaxel (PX) characteristics in different formulations

Feature	Taxol [®]	Paclitaxel poliglumex	Abraxane [®]	Genexol-PM	Nk105
Solubility	With toxic solubilising agents (CremophorEL). Administered as 3 h infusion. Routine premedication	Water-soluble complex. Administered as 10–20 min infusion without premedication	Albumin nanoparticles disaggregated in soluble albumin-bound PX complexes. Administered as 30 min infusion without premedication	Soluble micellar formulation	Soluble micellar formulation
Systemic exposure	High. Systemic distribution of the active drug. Solvent associated toxicity	Low. PX is distributed attached to the polymer and therefore inactive	Low. PX is distributed entrapped in nanoparticles	Lower. PX is distributed entrapped in unstable micelles	Low. PX is distributed entrapped in stable micelles
Pharmacokinetics	Non-linear. Limited tissue distribution, short elimination phase	Smaller V_d , longer distribution and elimination phases than Taxol	Linear. Increased tissue distribution and lower T_{max} than Taxol	Decreased AUC compared with Taxol due to the low blood stability of the micelles	Slower clearance, higher AUC and half-life 4–6 times longer than Taxol
Tumor selectivity	No	Yes, due to EPR	Yes, mediated by EPR, 60 kDa glycoprotein and SPARC	Yes, due to EPR	Yes, due to EPR

V_d volume of distribution, T_{max} time of maximum observed concentration, AUC area under the curve, blood concentration versus time

In a preclinical study, PPX exhibited excellent antitumor activity in breast and ovarian cancer models [16]. Safety and efficacy data of PPX in different phase I and II clinical trials have been reported, and remarkable advantages over the conventional paclitaxel formulation have been established.

Several clinical studies report the combination of PPX with platinum derivatives in combination therapy. A phase I trial was carried out in 43 patients with advanced solid tumors, in which a fixed dose of cisplatin (75 mg/m²) was combined with an increasing dose of PPX. This combination showed a good activity in refractory patients. In a phase III trial, PPX in combination with carboplatin was evaluated in lung cancer patients, showing no increased patient survival, although the combination was less toxic.

HPMA-doxorubicin

Doxorubicin causes cardiotoxicity due to its accumulation in heart tissues, often limiting its use after a disease relapse. In this conjugate, doxorubicin is combined with a water-soluble synthetic polymer, *N*-(2-hydroxypropyl) metacrylamide (HPMA), using a tetrapeptide linker (Gly-Phe-Leu-Gly) [17]. This linker allows the selective release of the active drug in the tumor cells due to the action of lysosomal enzymes, while the polymer is cleared by renal excretion. In preclinical animal studies the conjugate, named PK1, showed higher antitumor activity than free doxorubicin [18]. For instance, in mice with melanomas, the total amount of doxorubicin delivered to the tumors in the first 48 h after

parenteral injection of KP1 was up to 75 times higher than after the administration of the free drug. Regarding its bio-distribution, the conjugate was found essentially at the tumor level and to a lesser extent in reticuloendothelial system organs, such as liver and spleen, due to these organs also presenting fenestrated capillaries. As a result of this distribution, this system was not only more effective but also less toxic than free doxorubicin, so the maximum tolerated dose of KP1 was 4–5 times higher than free drug [19].

Phase II clinical trials have been carried out for breast, lung and colon cancers.

After PK1, PK2 was developed, adding galactosamine to the PK1 structure to improve drug delivery to hepatocytes, which express high levels of asialoglycoprotein receptors, where galactosamine binds selectively. In trials with animal models presenting liver carcinoma, 80 % of the administrated dose was delivered to the liver, resulting in high anticancer activity [20]. However, the maximum tolerated dose of this conjugate was lower than that of PK1.

Single polymeric carrier carrying a combination of drugs

In this approach, two or more drugs are attached to a single polymer carrier, making it possible for both agents to reach the tumor simultaneously, which is expected to be more effective. The first conjugate of this type was the HPMA polymer carrying the aromatase inhibitor aminoglutethimide (AGM) and doxorubicin, resulting in the HPMA-AGM-Dox conjugate [12].

Drug loading in this conjugate was approximately 5 % w/w for AGM and 7 % w/w for Doxorubicin. Both drugs were linked to the polymer by a peptidyl linker that is cleaved within the liposomal compartment of cancer cells. The anticancer activity of this conjugate was evaluated in vitro against breast cancer cell lines. Curiously, the combination of two drugs in a single polymer was more active than the combination of two polymers each with a single drug [21].

Another conjugate is that formed by HPMA with gemcitabine and Doxorubicin. In its in vivo evaluation, the conjugate effectively delivered both agents and, as in the previous case, was more active than a combination of two polymers each carrying one of the drugs, and also more active than the combination of the free drugs.

Polymeric micelles

Polymeric micelles are long blood circulating vesicles formed from amphiphilic block polymers that form a hydrophobic core surrounded by a hydrophilic shell. Their hydrophilic surface, usually due to the presence of poly-ethyleneglycol (PEG) polymer, avoids opsonin absorption and subsequent blood clearance by the mononuclear phagocyte system (MPS). Micelles size, within 20–100 nm, prevents kidney filtration but allows their location at the tumor mass level by the EPR effect, and even their cell internalization via the endosomal pathway. These characteristics make polymeric micelles interesting systems for the administration of poorly aqueous soluble anticancer drugs [22].

Paclitaxel formulations

Genexol[®]-PM is a Cremophor-free (Table 2), polymeric micelle formulation of paclitaxel and the block copolymer monomethoxy-PEG-b-poly(D,L-lactide), with size less than 50 nm and drug loading of approximately 16.7 % [23]. In Phase II and III trials for metastatic breast cancer, Genexol[®] PM (administered over 3 h every 3 weeks at 300 mg/m²) was more effective than Abraxane[®] (albumin paclitaxel nanoparticles) and Taxol[®]. Genexol[®] PM combined with cisplatin was more effective than Abraxane[®] alone against non-small cell lung cancer (NSCLC) [24]. Due to its superior efficacy and fewer adverse reactions, currently Genexol[®] PM is commercially available in some countries for treatment of NSCLC, ovarian cancer, breast cancer and gastric cancer, and phase III trials are being carried out in the US.

NK105 is another formulation of paclitaxel into polymeric micelles of PEG-poly(aspartic acid) modified with 4-phenyl-1-butanol with particle size between 20 and 430 nm [22] and drug loading of 23 % (w/w) (Table 2). NK105 shows greater

blood stability than Genexol[®] PM. In phase I clinical trials for pancreatic, bile duct, gastric or colonic cancers, NK105 demonstrated reduced toxicity and fewer adverse reactions compared to Taxol[®] [25]. A Phase III clinical trial comparing NK105 versus Taxol[®] in patients with metastatic or recurrent breast cancer has recently opened [24].

Nanoxel[™] is a newly developed formulation of paclitaxel and a copolymer of *N*-isopropyl acrylamide and vinyl pyrrolidone forming micelles, where the amalgamation of pH sensitivity and tumor targeting may provide an advantage for paclitaxel delivery into cancer cells [26].

SP1049C

SP1049C is a micelle formulation of doxorubicin and block copolymers based on ethylene oxide and propylene oxide named Pluronic[®]. The average particle size in SP1049C is approximately 30 nm. SP1049C is particularly active in multidrug resistant and metastatic cancers, due to the ability of these types of polymers to selectively disrupt mitochondrial functionality and inhibit ABC transporters such as P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in chemoresistant cells. In the US, SP1049C is designated as an orphan drug for carcinoma of the esophagus and in gastric cancers [24].

Liposomes

Liposomes are phospholipidic submicroscopic vesicles capable of transporting hydrophilic drugs in their cores, or lipophilic drugs encompassed in the outer lipid shells. Liposomes increase the therapeutic efficacy of numerous drugs, but present some limitations including relatively fast clearance (especially small liposomes) and a strong tendency to accumulate in the MPS. Liposomes with their surfaces modified with carbohydrates such as monosialogangliosides or with PEG (pegylated liposomes) have been developed to avoid MPS accumulation and to allow their localisation in other organs or cells.

Doxil[®]/Caelix[®]

Doxil[®] (in US)/Caelix[®] (in Europe) is a pegylated liposomal formulation of doxorubicin with size 80–90 nm, composed of hydrogenated soy phosphatidyl choline, cholesterol and PEG linked to phosphatidylethanolamine. Pegylated liposomes facilitate the systemic distribution of doxorubicin without being cleared by the MPS. Furthermore, the size of the liposomes promotes their localisation at the tumor mass level due to EPR [27].

In clinical trials pegylated liposomal doxorubicin showed the same activity as free drug, but the risk of

cardiotoxicity decreased significantly, whether it was administered as a monotherapy or in combination therapy [28].

These liposomes have been approved for the treatment of metastatic ovarian cancer in patients with disease refractory to both paclitaxel and platinum based chemotherapy regimens [29]. Taking into account the evidence of its clinic efficacy, side effect profile, ease of administration (monthly doses), and the improvement in quality of life reported by patients, pegylated liposomal doxorubicin is the non-platinum based medicine chosen as a first-line therapy for patients with metastatic ovarian cancer [30].

Pegylated liposomal doxorubicin is currently being investigated in other tumor types including gynaecologic malignancies, breast cancer, multiple myeloma, lymphoma, hepatocellular carcinoma, prostate cancer and NSCLC.

Phase II trials showed the high efficacy of pegylated liposomal doxorubicin in breast cancer, together with a reduction in the cardiotoxicity and such other cumulative dose-related side effects as neutropenia and stomatitis. Randomized phase III trials concluded that pegylated liposomal doxorubicin has equivalent activity as conventional doxorubicin, vinorelbine and mitomycin with vinblastine, but a better tolerance profile [30–35].

Myocet®

Myocet® is a non-pegylated liposomal doxorubicin, stable and very active as an anticancer agent. These liposomes emerged as an alternative to pegylated liposomes because the latter cause serious skin toxicity, palmar-plantar erythrodysesthesia, in some patients, that is dose limiting [36]. Both Myocet and conventional free doxorubicin show low skin toxicity.

Myocet liposomes are composed of egg phosphatidyl choline/cholesterol (55:45) and 300 nM citrate at pH 4.5 and have an approximate size of 150 nm. The liposome loading technique involves a pH gradient and the formation of a citrate-doxorubicin complex what enables a very high drug-to-lipid ratio in the liposomes (the final doxorubicin/lipid molar ratio is approximately 0.27) [37].

Doxorubicin loaded into liposomes presents very different pharmacokinetics than free doxorubicin in conventional formulations, in such a way that it is targeted at the level of the tumor mass, as was demonstrated in mouse and human carcinoma models, where accumulation of Myocet in tumor tissue was more persistent and pervasive than that obtained with conventional free doxorubicin. In preclinical studies Myocet demonstrated significantly reduced cardiotoxicity and an improved safety profile when it was administered at a dose comparable to free doxorubicin [38].

In a phase III trial comparing Myocet against conventional doxorubicin, only 17 % of patients treated with Myocet as a single agent developed cardiotoxicity, in comparison with 37 % of patients that received conventional doxorubicin. However, the tumor response rate was equal in both formulations [36].

Liposomal daunorubicin

DaunoXome® is a non-pegylated liposomal formulation of daunorubicin composed of highly pure distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol in a 2:1 molar ratio. Several countries, including the US, have approved DaunoXome to treat Kaposi's sarcoma in HIV-positive patients. DaunoXome extravasates selectively and accumulates in solid tumors where the liposomes release drug over a prolonged period (36 h or more), providing sustained, high levels of cytotoxic material within tumor cells. HIV-positive patients tolerate DaunoXome well, with comparable responses to those obtained with the typical therapy with doxorubicin, bleomycin and vincristine; demonstrating reduced toxicity [39].

Albumin as drug carrier

A study enrolling 260 cancer patients showed clearly that serum albumin levels in most patients are far below the normal level of healthy subjects. This drop can be explained because plasmatic proteins such as albumin are the main energy and nutrition source for tumor growth [40, 41].

Albumin transport from the blood to the tumor interstitium is mediated by the 60 kDa glycoprotein, gp60, also known as albondin, which is located on the endothelial cell surface and seems responsible for the transcytosis of albumin by easing its binding to caveolin, forming caveolae that transport the protein to the interstitial space.

Albumin nanoparticles

Albumin nanoparticles are elaborated by the so called nab technology (nanoparticle albumin-bound) developed by American Bioscience. This technology is based on the emulsion evaporation cross-link method, in which an oil phase containing a dissolved lipophilic drug is added drop by drop to an aqueous phase composed of human serum albumin (HSA) solution presaturated with chloroform. The emulsion is formed at a low agitation rate and then homogenization of this emulsion at high pressure is carried out, resulting in an albumin nanosuspension with a particle size of 130 nm [42]. For the purpose of improving nanoparticle stability, the nanoparticle suspension is lyophilized

and a solid powder is obtained. Examples of nanoparticles developed by this technology are Abraxane[®], Nab-docetaxel, Nab-rapamycin, Nab-17 AAG and Nab-5404.

Abraxane[®]

Abraxane[®] is formed by albumin nanoparticles carrying paclitaxel and was first approved for the treatment of metastatic breast cancer in 2005 by the FDA and in 2008 by the European Medicines Agency. In September 2011 Abraxane[®] had already been approved in 41 countries around the world [40]. In October 2012 it was approved by the FDA for another new indication: NSCLC in combination with carboplatin. This drug product is also under clinical investigation for other indications such as pancreatic cancer, melanoma and head and neck cancer, often in combination with conventional chemotherapy [43].

The maximum tolerated dose of paclitaxel in Abraxane[®] is much higher than perfusion administered paclitaxel (Taxol[®]). In a randomized phase III trial, 3 weeks long, enrolling 460 patients with metastatic breast cancer (study presented to obtain its FDA approval), Abraxane[®] showed a statistically significant reduction in tumors and a higher response rate (33 versus 19 %), a longer time to tumor progression (23.0 versus 16.9 weeks) and a higher survival rate (65.0 versus 55.7 weeks) [44] than Taxol[®]. In another phase II study in NSCLC patients, a positive response to Abraxane[®]-carboplatin combined therapy was obtained in 33 % of cases versus 25 % success with conventional paclitaxel-carboplatin treatment.

Paclitaxel-albumin formulations, as the PPX formulation previously described, avoid the use of Cremophor, responsible for major serious side effects and the dose-limiting toxicity associated with conventional taxane-based therapy. When Abraxane[®] is administered as a 30 min intravenous infusion, it is well-tolerated and hypersensitivity reactions are not observed even without premedication with corticosteroids (table 2) [42].

Abraxane[®] is administered as a stable suspension of nanoparticles with a mean size of 130 nm; once in the bloodstream it is disaggregated, resulting in soluble albumin-bound paclitaxel complexes with a size basically comparable to that of endogenous albumin. These complexes leave blood capillaries by gp60-mediated transcytosis, reaching tumor interstitial spaces.

Once in the tumor interstitium, the drug-albumin complex is bound to SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), and is quickly internalized into tumor cells. This protein is overexpressed in various tumor types such as breast, prostate, oesophagus, gastric, colorectal, liver, lung, kidney, skin melanoma, bladder, head and neck, thyroid and several brain tumors, and is associated with metastasis

and poor prognosis. Increased SPARC expression is correlated with higher response to albumin-bound drugs.

Others

The nab technology platform has been successfully used to encapsulate other anticancer lipophilic drugs [42].

Nab-docetaxel (ABI-008) is a preparation of albumin-based nanoparticles of docetaxel. Currently, docetaxel is marketed as a perfusion solution (Taxotere[®]), in which polysorbate 80/ethanol is used to solubilise the docetaxel. In preclinical studies, nab-docetaxel exhibited superior antitumor efficacy and decreased toxicity compared to Taxotere[®]. ABI-008 is currently in phase III clinical trials.

Nab-rapamycin (ABI-009) is a nab-based injectable form of the mTOR inhibitor rapamycin. mTOR protein is a key regulator of cell proliferation and an important target in tumor therapy. The development of rapamycin as an anticancer agent has been hampered due to its poor solubility, low oral bioavailability, and dose-limiting intestinal toxicity. Nab-rapamycin was well-tolerated in preclinical studies and was highly effective against breast and colon xenograft tumors. Currently, it is in phase I clinical trials.

Nab-17 AAG (ABI-010) is an albumin-bound form of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, with a mean particle size of 110 nm. This drug is a hydrophobic inhibitor of Hsp90, which is an attractive therapeutic target because it acts as a chaperone protein stabilizing the conformational maturation of oncogenic signalling proteins. ABI-010 is currently in phase I clinical trials.

Nab-5404 (ABI-011), with a mean particle size of 90 nm, is a nanoparticle albumin-bound form of a novel thiocolchicine dimer that is a dual inhibitor of tubulin polymerisation and topoisomerase I activities. In preclinical studies, Nab-5404 has exhibited strong antiangiogenic activity.

Albumin conjugates

Methotrexate-albumin

Methotrexate-albumin conjugate was synthesized by linking the drug directly to the lysine residues of HSA. Methotrexate-albumin conjugates at an equimolar drug carrier ratio (1:1) result in an optimum distribution pattern with high tumor uptake rate [45]. In contrast, conventional methotrexate (MTX), after intravenous administration, is rapidly and efficiently cleared from the blood stream through the kidneys (40 % after 6 h and 90 % after 24 h), with a distribution half-life ranging from 1.5 to 3.5 h and a terminal half-life of about 8–15 h in patients with normal renal clearance.

Curiously, if the conjugates carry multiple MTX molecules per albumin molecule, they are rapidly cleared from the circulation because they are trapped by the MPS in the liver.

MTX has also been conjugated with lactosaminated bovine serum albumin (MTX LBSA) to develop a liver specific anticancer agent. The galactose-terminal of LBSA would be responsible for the selective localization of the MTX-LBSA conjugate in hepatocytes via asialoglycoprotein receptors [46]. [³H]-MTX LBSA was used to determine the conjugate's distribution, measuring the radioactivity in different organs and plasma after intravenous administration in mice. The study demonstrated that [³H]-MTX LBSA was rapidly cleared from plasma and a considerable amount was taken up by the liver immediately after injection, while the [³H]-MTX-albumin conjugate was slowly taken up. Because MTX causes toxicity mainly in kidney and the gastrointestinal tract, its concentration in these organs was also evaluated, concluding that the MTX concentration was lower when the drug was administered as an albumin conjugate rather than as free MTX solution.

Albuleukin

Recombinant IL-2 (rIL-2) was developed as an antineoplastic agent, activating the cellular immune response through lymphocyte activation. Currently, it is an approved therapy for melanoma and renal cell carcinoma. However, to date the short half-life of rIL-2 and its systemic toxicity limit clinical use of this protein.

Albuleukin is a genetic fusion protein of recombinant HSA (rHSA) and rIL-2 genes created to increase the half-life of rIL-2. Albumin fusion technology provides the advantageous pharmacokinetic properties of albumin. Animal studies showed that following its intravenous injection, Albuleukin is cleared from the plasma approximately 50 times slower than rIL-2, obtaining sustained circulating levels of the fusion protein for approximately 2 days after administration [47]. In these studies, Albuleukin showed a very different biodistribution profile than

rIL-2, with lower uptake in kidneys and much higher uptake in liver, spleen and lymph nodes compared with rIL-2. The greater exposure of Albuleukin to lymphatic tissues may lead to a more pronounced antitumor effect, mediated by an increased immune stimulation.

INNO-206

In 1999, Kratz and co-workers investigated a novel prodrug concept where the prodrug is able, after intravenous administration, to link in situ to the HS-group of cysteine-34 on endogenous circulating HSA.

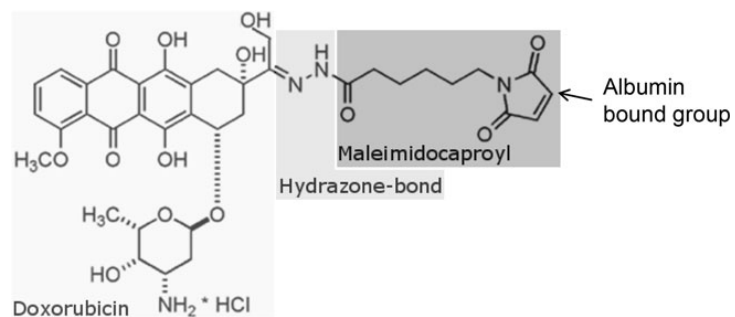
Thus, an acid-sensitive doxorubicin prodrug (INNO-206) was developed, which rapidly and selectively couples to cysteine-34 of endogenous albumin after administration [48]. As a result of the preclinical studies, INNO-206 (Fig. 2) emerged as a good clinic candidate due to the high plasma stability of the serum albumin conjugate formed, its higher efficacy compared to conventional free doxorubicin formulations and its favourable toxicity profile, including a significant reduction of the cardiotoxicity associated with doxorubicin [49].

Both in preclinical and clinical studies, the albumin-bound form of INNO-206 showed smaller distribution volume and lower clearance than free doxorubicin. The prodrug contains an acid-sensitive hydrazone linker that allows doxorubicin to be released either extracellularly in the lightly acidic environment of the tumor mass, or intracellularly in the endosomal or lysosomal compartments after albumin conjugate uptake by the tumor cells. In phase I trials, INNO-206 was able to induce tumor regression in breast cancer, small cell lung cancer and sarcoma [50]. Phase Ib and II trials against sarcoma and gastric cancer, respectively, are ongoing.

Conclusion

In the last years there has been a broad research effort in new drug targeting systems developed from well-known

Fig. 2 Chemical structure of (6-maleimidocaproyl)hydrazone derivate of doxorubicin (INNO-206)



anticancer agents, with the aim of achieving three main objectives: to reduce toxicity, to ease administration and to overcome drug resistance. Most of these systems are designed to selectively release the drug at the level of the tumor mass, in a second order targeting, using two physiological phenomena: the increased permeability to macromolecules of the tumor mass blood vessels, known as the EPR, and the increased albumin transport through endothelial blood capillaries of tumor cells, mediated by the 60 kDa glycoprotein (gp60).

Thus, several conjugate, liposome and nanoparticle systems of different antitumor drugs have been developed and successfully evaluated in clinical trials, showing higher anticancer activity and fewer side effects than conventional formulations, due to the selective location of the drug at the tumor mass level and its reduced accumulation in healthy tissues.

Most of these systems are aqueous formulations without toxic surfactants and with reduced perfusion times, and avoid drug degradation during its biodistribution, resulting in easier administration.

Furthermore, in some cases, the bond of specific ligands to these targeting systems makes possible their localisation at the tumor cell level by specific interactions with membrane receptors, and even its internalization into the cell by different mechanisms, reaching a third order targeting and overcoming some cell resistance mechanisms developed by tumor cells.

Acknowledgments We want to thank the Counseling of Education of the Community of Madrid and the European Social Fund through the Regional Plan of Scientific Research and Technological Innovation. This work was partially funded by the Research Group GR35/10 Santander-UCM, Group: Parenteral administration of drugs.

References

- Agarwal R, Linch M, Kaye SB. Novel therapeutic agents in ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2006;32:875–6.
- Martin CG. Targeted drug conjugates: principles and progress. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;53:171–6.
- 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;65:271–4.
- Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:4607–12.
- Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohalm J, Ulbrich K, Akaike T, et al. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *J Cancer Res*. 1998;89:307–14.
- Koziara JM, Lockman PR, Allen DD, Mumper RJ. Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors. *J Control Release*. 2004;99:259–69.
- Kipp JE. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm*. 2004;284:109–12.
- Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:785–6.
- Broxterman HJ, Georgopadakou NH. Anticancer therapeutics: “addictive” targets, multi-targeted drugs, new drug combinations. *Drug Resist Updat*. 2005;8:183–7.
- Kawasaki ES, Player TA. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine*. 2005;1:101–9.
- Duncan R, Spreafico F. Polymer conjugates. Pharmacokinetic considerations for design and development. *Clin Pharmacokinet*. 1994;27:290–6.
- Greco F, Vicent MJ. Combination therapy: opportunities and challenges for polymer–drug conjugates as anticancer nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61:1203–13.
- Bhalla KN. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene*. 2003;22:9075–6.
- Singer JW. Paclitaxel poliglumex (XYOTAX™, CT-2103): a macromolecular taxane. *J Control Release*. 2005;109:120–6.
- Singer JW, Baker B, De Vries P. Poly-(l)-glutamic acid-paclitaxel (CT-2103) [XYOTAX], a biodegradable polymeric drug conjugate: characterization, pre-clinical pharmacology and preliminary clinical data. *Adv Exp Med Biol*. 2003;519:81–9.
- Li C, Yu DF, Newman RA. Complete regression of well-established tumors using a novel water-soluble poly(l-glutamic acid)-paclitaxel conjugate. *Cancer Res*. 1998;58:2404–9.
- Duncan R, Cable HC, Lloyd JB, Rejmanova P, Kopecek J. Degradation of side-chains of *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers by lysosomal thiol-proteinases. *Biosci Rep*. 1982;2:1041–6.
- Seymour LW, Ulbrich K, Steyer PS, Brereton M, Subr V, Strohalm J, et al. Tumor tropism and anti-cancer efficacy of polymer-based doxorubicin prodrugs in the treatment of subcutaneous murine B16F10 melanoma. *Br J Cancer*. 1994;70:636–41.
- Lammers T. Improving the efficacy of combined modality anticancer therapy using HPMA copolymer-based nanomedicine formulations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62:203–30.
- Li C, Wallace S. Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60:886–98.
- Vicent MJ, Greco F, Paul A, Griffiths PC, Nicholson RI, Duncan R. Polymer therapeutics designed for a combination therapy of hormone-dependent cancer. *Angew Chem (Int Ed)*. 2005;44:4061–6.
- Ying L, Kinam P. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *Int J Pharmaceut*. 2013;453(1):198–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.08.042>. Accessed 30 August 2013.
- Kim TY, Kim DW, Chung JY, Shin SG, Kim SC. Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res*. 2004;10:3708–16.
- Green MR, Manikhas GM, Orlov S, Afanasyev B, Makhson AM, Bhar P, et al. Abraxane®, a novel Cremophor®-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2006;17:1263–8.
- Kato K, Hamaguchi T, Yasui H, Okusaka T, Ueno H. Phase I study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:S83.
- Madaan A, Singh P, Awasthi A, Verma R, Singh AT, Jaggi M, et al. Efficiency and mechanism of intracellular paclitaxel delivery by novel nanopolymer-based tumor-targeted delivery system. *Nanoxel™ Clin Transl Oncol*. 2013;15:26–32.
- Gordon AN, Tonda M, Sun S, Rackoff W. Long-term survival advantage for women treated with pegylated liposomal doxorubicin compared with topotecan in a phase 3 randomized study of recurrent and refractory epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2004;95:1–8.
- Verma S, Dent S, Chow JW, Rayson D, Safra T. Metastatic breast cancer: the role of pegylated liposomal doxorubicin after conventional anthracyclines. *Cancer Treat Rev*. 2008;34:391–6.
- Thigpen JT, Aghajanian CA, Alberts DS, Campos SM, Gordon AN. Role of pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2005;96:10–8.
- Ranson M, Carmichael J, O’Byrne K. Treatment of advanced breast cancer with sterically stabilized liposomal doxorubicin: results of a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol*. 1997;15:3185–91.
- Lyass O, Uziely B, Ben-Yosef R. Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 2000;89(5):1037–47.
- Mlineritsch B, Mayer P, Rass C. Phase II study of single-agent pegylated liposomal doxorubicin HCl (PLD) in metastatic breast cancer after first-line treatment failure. *Onkologie*. 2004;27:441–6.
- Al-Batran SE, Bischoff J, von Minckwitz G. The clinical benefit of pegylated liposomal doxorubicin in patients with metastatic breast cancer previously treated with conventional anthracyclines: a multicenter phase II trial. *Br J Cancer*. 2006;94:1615–20.
- Al-Batran SE, Meerpohl HG, von Minckwitz G. Reduced incidence of severe palmar-plantar erythrodysesthesia and mucositis in a prospective multicenter phase II trial with pegylated liposomal doxorubicin at 40 mg/m² every 4 weeks in previously treated patients with metastatic breast cancer. *Oncology*. 2006;70:141–6.
- Coleman RE, Biganzoli L, Canney P. A randomised phase II study of two different schedules of pegylated liposomal doxorubicin in metastatic breast cancer (EORTC-10993). *Eur J Cancer*. 2006;42:882–7.
- Marty M. Liposomal doxorubicin (Myocet™) and conventional anthracyclines: a comparison. *Breast Suppl*. 2001;2:28–33.
- Madden TD, Harrigan PR, Tai LCL. The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey. *Chem Phys Lipids*. 1990;53:37–46.

38. Swenson CE, Perkins WR, Roberts P, Janoff AS. Liposome technology and the development of MyocetTM (liposomal doxorubicin citrate). *Breast Suppl.* 2001; 2:1–7.
39. Forssen EA. The design and development of DaunoXome[®] for solid tumor targeting. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;24:133–40.
40. Elsadek B, Kratz F. Impact of albumin on drug delivery—new applications on the horizon. *J Control Release.* 2012;157:4–8.
41. Stehle G, Sinn H, Wunder A, Schrenk HH, Stewart JC, Hartung G, et al. Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself—implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1997;26: 77–80.
42. Fu Q, Sun J, Zhang W, Sui X, Yan Z, He Z. Nanoparticle albumin-bound (NAB) technology is a promising method for anti-cancer drug delivery. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2009;4:262–72.
43. Desai N, Trieu V, Damascelli B, Soon-Shiong P. SPARC expression correlates with tumor response to albumin-bound paclitaxel in head and neck cancer patients. *Transl Oncol.* 2009;2(2):59–64.
44. Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(31): 7794–803.
45. Stehle G, Wunder A, Sinn H, Schrenk HH, Schütt S, Frei E, et al. Pharmacokinetics of methotrexate–albumin conjugates in tumor bearing rats. *Anticancer Drugs.* 1997;8:835–44.
46. Lim CR, Oh KH, Kim KM, Yuk SH, Lee HB, Kim CK. The enhancement of liver targetability of [³H]methotrexate-galactosylated serum albumin conjugate in mice. *Int J Pharm.* 1996;132:175–82.
47. Melder RJ, Osborn BL, Riccobene T, Kanakaraj P, Wei P. Pharmacokinetics and in vitro and in vivo anti-tumor response of an interleukin-2-fusion protein in mice. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54:535–7.
48. Kratz F, Muller-Driver R, Hofmann I, Dreves J, Unger C. A novel macromolecular prodrug concept exploiting endogenous serum albumin as a drug carrier for cancer chemotherapy. *J Med Chem.* 2000;43(7):1253–6.
49. Graeser R, Esser N, Unger H, Fichtner I, Zhu A. 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.* 2009;28(1):14–9.
50. Unger C, Haring B, Medinger M, Dreves J, Steinbild S, Kratz F, et al. Phase I and pharmacokinetic study of the (6-maleimidocaproyl)hydrazone derivative of doxorubicin. *Clin Cancer Res.* 2007;13(16):4858–66.

REVISIÓN

Nuevas estrategias en terapia antitumoral basadas en la inducción de la apoptosis

Cristina Martín Sabroso¹ y Ana Isabel Torres Suárez^{1,2*}

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid. ²Instituto de Farmacia Industrial. Universidad Complutense de Madrid.
e-mail: galaaa@farm.ucm.es

Recibido el 3 de abril de 2013

An. Real Acad. Farm. Vol 79, Nº 2 (2013), pag. 213-228

RESUMEN

Según la OMS para el año 2030 se producirán un total de 11,5 millones de defunciones por cáncer. Una alta proporción de estos tumores serán resistentes a los agentes antineoplásicos actuales, por ello, en los últimos años se ha realizado una intensa labor investigadora en la búsqueda de nuevas dianas para el tratamiento de tumores. Una de las dianas que está ofreciendo más posibilidades es el mecanismo de la apoptosis. La apoptosis se produce en condiciones fisiológicas como un mecanismo regulador del crecimiento de tejidos, en equilibrio con la proliferación celular. Su desregulación podría ayudar a explicar la patogénesis de algunos tumores malignos.

Palabras clave: Apoptosis; Antineoplásicos; Resistencia a fármacos.

ABSTRACT

New strategies in antitumor therapies based on apoptosis induction

According to OMS, in 2030 will be a total of 11.5 million deaths by cancer. A high proportion of these tumors will be resistant to current anticancer agents, and therefore, in the last years an intense investigation has been done to search new targets for antitumor treatment. One of the most interesting targets is the apoptosis mechanism. Apoptosis is produced in physiological conditions as a growth tissue regulator mechanism, in equilibrium with cellular proliferation. Its deregulation could explain the pathogenesis of some malignant tumors.

Keywords: Apoptosis; Anticancer agent; Drug resistant.

1. INTRODUCCIÓN

Según la OMS para el año 2030 el número de nuevos pacientes diagnosticados de cáncer ascenderá a 15,5 millones y se producirán un total de 11,5 millones de defunciones. Una alta proporción de estos tumores serán resistentes a los agentes antineoplásicos actuales, y por ello hoy en día hay numerosas líneas de investigación abiertas para desarrollar nuevos fármacos que superen estas resistencias.

La resistencia a los antineoplásicos puede ser natural o adquirida. La resistencia natural hace referencia a la baja respuesta inicial de un tumor a un determinado fármaco, mientras que la adquirida se refiere a la falta de respuesta que surge tras un tratamiento inicial con éxito. Existen tres características tumorales que parecen determinar la resistencia a la quimioterapia: la cinética de crecimiento, la aparición de mutaciones espontáneas y la bioquímica.

1. Cinética de crecimiento de la masa tumoral: La mayoría de los quimioterápicos actúan sobre las células en división, de manera que cuanto menor sea la fracción en crecimiento, es decir, el porcentaje de células con actividad proliferativa, menor será el número de células presumiblemente sensibles al tratamiento. Por ello, las células que se encuentran fuera del ciclo celular, en la llamada fase G₀, serán refractarias a la mayoría de quimioterápicos (1). En los tumores sólidos, el crecimiento se enlentece de forma exponencial, aumentando el número de células en fase G₀ según progresa el tumor. Una importante consecuencia de este tipo de crecimiento es que, en el momento del diagnóstico, la mayoría de los pacientes presentan tumores con una baja fracción de crecimiento y, por tanto, con baja sensibilidad a la mayoría de los quimioterápicos.

2. Aparición de mutaciones espontáneas: A través de cambios citogenéticos aleatorios, algunas células tumorales mutan volviéndose resistentes a ciertos fármacos, sin haber tenido contacto previo con ellos. Esta capacidad de resistencia se transmite a las células descendientes, de tal forma que la población celular de un tumor en crecimiento no es homogénea, coexistiendo clones celulares sensibles y resistentes al tratamiento. El número de células resistentes en un tumor en el momento del diagnóstico, se relaciona directamente con su tamaño y su tasa intrínseca de mutación (2,3).

3. Alteración de mecanismos bioquímicos: Pueden aparecer resistencias a quimioterápicos por diferentes razones bioquímicas que incluyen la incapacidad de que en la célula tumoral se transforme el profármaco a su forma activa, la capacidad de la célula tumoral de inactivar el fármaco (modificación del metabolismo intracelular del fármaco), la disminución de la captación del fármaco por parte de la célula tumoral (modificación de barreras fisiológicas, vascularización tumoral alterada...), el aumento de la expulsión del fármaco a

través de la membrana celular (bombas de eflujo), cambios en los niveles o en la estructura de la diana intracelular, o el aumento de la tasa de reparación del ADN dañado.

Actualmente, se están utilizando diferentes estrategias para aumentar la respuesta a los antineoplásicos. Entre ellas se encuentra la detección precoz del tumor ya que si el tumor es de menor tamaño tendrá un mayor porcentaje de células en división y por tanto sensibles al tratamiento. En este sentido, también resulta eficaz la reducción de la masa tumoral mediante cirugía y/o radioterapia, ya que esta reducción aumenta la fracción de células en crecimiento y produce una mayor susceptibilidad a los fármacos.

Es especialmente importante la eliminación de las masas tumorales necróticas a las que, por baja vascularización, no puede llegar suficiente cantidad de fármaco. Para evitar las resistencias debidas a alteraciones bioquímicas se intenta favorecer el acceso del fármaco al tumor desarrollándose sistemas de vectorización. Mediante esta estrategia se persigue una localización selectiva del fármaco a nivel de la célula tumoral reduciéndose, de forma paralela, la toxicidad asociada a estos fármacos.

Se han desarrollado novedosos sistemas que permiten la vectorización pasiva o activa del fármaco a nivel de las masas o incluso el interior de las células tumorales, evitando en muchos casos, los mecanismos naturales de internalización de ese fármaco en la célula. La asociación de quimioterápicos es un recurso también muy utilizado, que ofrece dos ventajas: la suma o potenciación de efectos citotóxicos (se asocian moléculas con diferente mecanismo de acción), y la disminución de la probabilidad de aparición de resistencias (se asocian fármacos con diferentes mecanismos de resistencias).

Por último, en los últimos años se ha realizado una intensa labor investigadora en la búsqueda de nuevas dianas para el tratamiento de tumores que, por un lado resulten eficaces para la eliminación o detención del crecimiento tumoral y que por otro eviten o dificulten la aparición de resistencias. Una de las dianas que está ofreciendo más posibilidades es el mecanismo de la apoptosis. A continuación se presenta una revisión de las más recientes investigaciones en tratamiento antitumoral basadas en el desarrollo de moléculas que actúan sobre el mecanismo de la apoptosis, analizándose la posibilidad de aparición de resistencias y el balance de su aplicación clínica.

2. MECANISMO DE APOPTOSIS

La apoptosis, o muerte celular programada, es un modo específico de muerte, que se caracteriza por cambios morfológicos tales como condensación de la cromatina, la fragmentación del núcleo, la retracción citoplasmática y la emisión

de 'cuerpos apoptóticos', manteniendo aparentemente intactos los orgánulos celulares (4,5). De hecho, la apoptosis regula un mecanismo de muerte celular que implica la participación activa de la célula afectada en la ejecución de su propio programa de muerte (Figura 1). Los eventos morfológicos y bioquímicos de la apoptosis se conocen desde hace mucho tiempo, y, en algunos aspectos, difieren de aquellos que llevan a la necrosis (6). La apoptosis se produce en condiciones fisiológicas como un mecanismo regulador del crecimiento de tejidos, en equilibrio con la proliferación celular (7). La apoptosis se ha convertido en un foco de interés en oncología debido a que su desregulación podría ayudar a explicar la patogénesis de algunos tumores malignos (8).

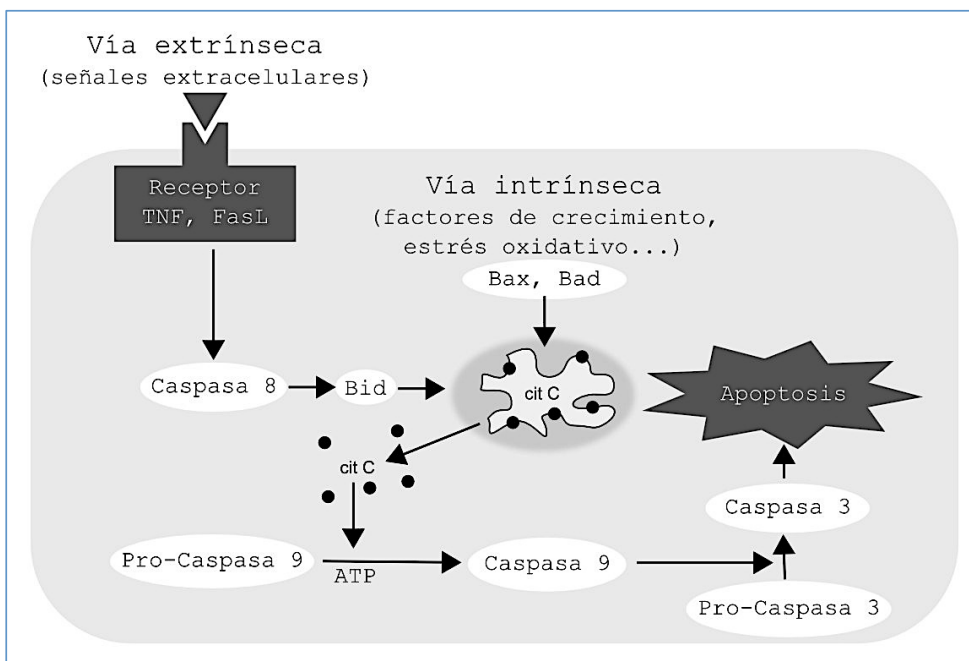


Figura 1.- Mecanismo general de activación de la apoptosis.

3. INDUCTORES DE LA APOPTOSIS

Se han identificado diferentes moléculas capaces de modificar el proceso de la apoptosis en las células tumorales, y que presentan interés como antineoplásicos (Tabla 1). Estos fármacos actúan sobre diferentes dianas moleculares y como consecuencia bien inducen una activación directa de la apoptosis, o bien reducen el umbral de su iniciación por fármacos citotóxicos (9).

Tabla 1.- Fármacos inductores de apoptosis con interés en el tratamiento del cáncer.

Inhibidores de la glutatión S-transferasa	Telcyta 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio)hexanol
Inhibidores de mtor	Temsirolimus Everolimus Deforolimus
Inhibidores de EGFR	Genitinib Erlotinib Cetuximab Matuzumab
Inhibidores de la tubulina	DJ-927 ABT-751 EPO-906 TZT-1027
Otros	Fenoxodiol Inhibidores de c-kit y PDGFR

3.1. Inhibidores de la glutatión S-transferasa (GST)

La glutatión S-transferasa(GST) representa el mayor grupo de enzimas de detoxificación, participando en la fase II de la biotransformación de compuestos tóxicos, exógenos o endógenos, mediante la catalización de reacciones de conjugación en las que se adiciona un grupo polar, el glutatión, a los grupos electrofílicos del tóxico a eliminar, entre los que se incluyen sustancias carcinógenas, dando como resultado un incremento de su solubilidad en agua que favorece su excreción renal.

La GST está también implicada en la regulación de la respuesta de estrés celular y apoptosis, debido a que provoca la inhibición de quinasas, como por ejemplo la jun N-terminal quinasa (JNK). Se han detectado niveles elevados de GST en cáncer de colon, vejiga, estomago, piel, mama, pulmón, bucal y riñón (10,11), en donde forma un complejo con JNK que provoca su inhibición. El estrés oxidativo puede desestabilizar el complejo GST:JNK y causar la activación de la cascada de quinasas que desencadena la apoptosis (12). Esta enzima, también se encuentra implicada en el desarrollo de resistencias de tumores frente diversos fármacos anticancerígenos. Por tanto el uso de inhibidores específicos de la enzima podría potenciar la eficacia de la quimioterapia sobre tumores resistentes a drogas anticancerígenas.

Esta enzima es la diana de algunos de los nuevos agentes antitumorales desarrollados como Telcyta y 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio) hexanol (NBDHEX). El primero es un profármaco sustrato de la enzima, aprovechando su alta concentración a nivel tumoral; sin embargo el segundo es un inhibidor de la GST.

Canfosfamide HCl (Telcyta)

Canfosfamide HCl (Telcyta®) fue diseñado para aprovechar los altos niveles de GST en muchos tumores humanos, lo cual, frecuentemente se asocia con un mal pronóstico y resistencia a ciertos fármacos como agentes alquilantes y compuestos de platino. Canfosfamide HCl (CAN) es un profármaco análogo del glutatión que es activado por GST e induce apoptosis. Tras la activación, la actividad apoptótica de canfosfamide está mediada por la vía de respuesta al estrés, lo que resulta en la inducción de la apoptosis celular. Las células tumorales humanas expuestas a canfosfamide muestran una activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP), quinasa MKK4, la quinasa p38, jun N-terminal quinasa (JNK) y la caspasa 3 (13). La actividad citotóxica de canfosfamide se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* frente a una gran variedad de líneas celulares de cáncer humano. Canfosfamide generalmente, es bien tolerado y presenta pocos efectos adversos.

Canfosfamide ha demostrado no tener resistencia cruzada con platinos, taxanos y antraciclinas, tampoco su toxicidad se solapa con la de estos agentes pero sí posee un efecto sinérgico que hace que estos funcionen mejor en combinación que como agente único. Canfosfamide como agente único no es lo suficientemente activo por ello debe emplearse siempre en combinación con platinos, taxanos y antraciclinas.

6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio) hexanol (NBDHEX)

Un fármaco inhibidor de la GST es 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio) hexanol (NBDHEX). Es un agente hidrófobo que penetra fácilmente a través de la membrana celular y por lo tanto, no es sustrato de las proteínas transportadoras (bombas de eflujo), lo que representa un mecanismo de resistencia del tumor a una variedad de fármacos anticancerosos. NBDHEX posee un importante efecto inhibitorio del crecimiento del melanoma maligno y de otros tipos de tumores, incluidos la leucemia, el cáncer de pulmón y el osteosarcoma (14,15). Este compuesto interrumpe el complejo entre GST y c-Jun N-terminal quinasa (JNK) induciendo la activación de JNK, la detención del ciclo celular y muerte celular (16). Ensayos clínicos indican que la combinación NBDHEX y temozolomida (TMZ) (agente alquilante) redujo significativamente el crecimiento tumoral *in vivo* con respecto a cada medicamento usado de forma individual, sin empeoramiento de la mielotoxicidad del agente alquilante ni retrasó la recuperación de la función de la médula ósea (17).

Las células de melanoma B16 fueron expuestas a diferentes concentraciones de NBDHEX en monoterapia, y los resultados indicaron que este agente tenía efecto apoptótico en las células B16 y que a una concentración de 10 μ M inducía apoptosis en casi el 100% de las células a las 48 h.

3.2. Inhibidores de mtor

mTOR1 (mammalian target of rapamycin), es una serina/Treonina quinasa de 289 kDa, que participa en la vía fosfatidilinositol 3'-quinasa/AKT. Regula múltiples eventos celulares como el crecimiento celular y la proliferación, la diferenciación, la migración, y la supervivencia. Esta proteína está activada en múltiples tumores y su activación es capaz de generar la proliferación celular y de evitar la apoptosis, lo que conduce a su crecimiento desordenado. La rapamicina es un inhibidor de mTOR que actúa formando inicialmente un complejo con una proteína citosólica de 12 kDa, designado FK-506-proteína de unión 12 (FKBP-12), y posteriormente este complejo se une a mTOR inhibiendo su función, lo que desencadena una activación rápida y sostenida de la apoptosis mediante la vía de señalización de la quinasa 1 (18). De esta forma la rapamicina y sus análogos, temsirolimus, RAD001 y AP23573, ahora en ensayos clínicos como agentes anticancerosos, inhiben potentemente la proliferación de células tumorales.

Temsirolimus

Temsirolimus (CCI-779), es un éster derivado de rapamicina con mayor solubilidad en agua. A dosis no tóxicas, temsirolimus presentó actividad antitumoral sobre diversos modelos de cáncer tales como gliomas, rhabdomiosarcomas, meduloblastoma, tumores de cabeza y cuello, líneas celulares de páncreas, próstata y mama (19), obteniéndose un mayor efecto terapéutico cuando se utilizó en combinación con los agentes antineoplásicos que por separado. En 2007 fue aprobado por la FDA como primera línea de tratamiento para el cáncer renal. También se han realizado estudios en fase III para el tratamiento de linfoma y en fase II en cáncer de mama y linfoma mostrando un beneficio frente a otros tratamientos especialmente en el caso del linfoma (20). Los principales efectos secundarios detectados son alteraciones hematológicas, hipercolesterolemia y reacciones alérgicas.

Everolimus

Everolimus (RAD001) es un derivado de la rapamicina de administración oral. Se ha evaluado su actividad antineoplásica en varias líneas celulares tumorales humanas in vitro y en modelos de xenoinjertos in vivo con una IC50 que va de 5 hasta 1800 nM. Se ha demostrado su efecto antineoplásico frente a melanoma, cáncer de pulmón, adenocarcinoma pancreático y carcinoma de colon. Este fármaco posee también actividad antiangiogénica ya que inhibe la proliferación de las células endoteliales vasculares humanas. Los efectos

secundarios detectados a dosis terapéuticas son fatiga, neutropenia, mucositis, hiperglucemia y estomatitis (21). En un estudio en fase II, everolimus ha demostrado actividad antineoplásica en pacientes recién diagnosticados de cáncer de mama. También está siendo evaluado en ensayos con pacientes con cáncer de próstata y neuroendocrinos.

Deforolimus

Deforolimus (AP23573) es el último análogo desarrollado a partir de la rapamicina. Es estable en solventes orgánicos, soluble en agua en un amplio intervalo de pH, así como también en plasma y en sangre, tanto *in vivo* como *in vitro*. AP23573 presenta una potente, rápida y prolongada actividad inhibitoria de mTOR, lo que produce una inhibición del crecimiento de diversas líneas tumorales humanas *in vitro*, ejerciendo este efecto tanto individualmente como en combinación con otros agentes citotóxicos. En un estudio clínico de fase I, se administró por vía intravenosa durante 5 días en intervalos de 24 horas. Durante el primer ciclo de tratamiento se produjo una toxicidad severa tipo 3 limitante de la dosis, consistente en una mucositis oral aguda. Se observaron otros efectos secundarios, aunque de menor intensidad, entre los que destacaron episodios menores o moderados de mucositis, diarrea, anemia, náusea, fatiga, trombocopenia, neutropenia e hiperlipidemia. Se detectó actividad antitumoral preliminar a todas las dosis ensayadas en el estudio. En estudios en fase II en pacientes con sarcoma, deforolimus mostró una tasa de beneficio clínico del 29%; en otro estudio en cáncer de endometrio la tasa de respuesta fue del 9%, al igual que en neoplasias hematológicas (20). Actualmente se están desarrollando estudios en fase III.

3.3. Inhibidores de EGFR

EGFR o receptor del factor de crecimiento epidérmico es un receptor tirosin-quinasa que se activa por ligandos tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Esto desencadena la activación de vías de señalización intracelulares, tales como la proteína-quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la fosfatidilinositol 3-quinasa (P13K)-AKT, ambas involucradas en la supervivencia y proliferación celular (22,23). Su sobreexpresión en tumores a menudo se correlaciona con mal pronóstico, disminución de la supervivencia y resistencia a la terapia. La desregulación de EGFR (por su sobreexpresión o por una activación excesiva) contribuye a la proliferación, transformación, angiogénesis, invasión, metástasis y la inhibición de la apoptosis en células tumorales (24). Por lo tanto, moléculas inhibidores de este receptor tienen especial interés como agentes antineoplásicos. Se han identificado dos tipos de inhibidores de la señalización de EGFR:

- Moléculas pequeñas como gefitinib (ZD1839) y erlotinib (OS1774) que inhiben el dominio tirosina quinasa intracelular del receptor EGFR (9).

- Anticuerpos monoclonales, como el cetuximab y matuzumab.

Gefitinib

Gefitinib es un inhibidor tirosin-quinasa selectivo de EGFR de administración oral, ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer de pulmón ya que interrumpe las señales mitogénicas y antiapoptóticas responsables de la proliferación celular, el crecimiento, la metástasis y la angiogénesis. Comparado con agentes antineoplásicos citotóxicos, gefitinib ofrece unas tasas de supervivencia y beneficios equivalentes, pero proporciona una mejor calidad de vida en pacientes con enfermedad avanzada. Sin embargo este beneficio puede variar debido a mutaciones en el receptor EGFR, obteniéndose mejores resultados en mujeres, no fumadores y asiáticos. Gefitinib es bien tolerado y los efectos adversos más comunes, tales como erupciones cutáneas y diarrea, son de gravedad leve, aunque en algunos casos se ha desarrollado enfermedad pulmonar intersticial (ILD). La aprobación de gefitinib como tratamiento de primera elección en Asia desde julio de 2002 para el tratamiento de cáncer de pulmón, se basa en un estudio en fase III que demostró una supervivencia superior, una mayor tasa de respuesta, mejora de la tolerabilidad y significativa mejora de la calidad de vida para los pacientes tratados con gefitinib en comparación con la doble quimioterapia de carboplatino/paclitaxel (25). Sin embargo, desde su aprobación han sido notificados varios casos mortales de ILD. La incidencia de ILD durante el tratamiento con gefitinib varió entre los diferentes grupos étnicos, detectándose la incidencia más alta en la raza japonesa (incidencia acumulada del 4%), mientras que en el resto del mundo fue del 1%. La ILD inducida por gefitinib puede ser mortal en un 30-40% de los casos (26).

Erlotinib

Erlotinib (Tarceva®) es un fármaco de administración oral, inhibidor de la tirosin-quinasa selectivo de EGFR. Estudios *in vitro* e *in vivo*, muestran que erlotinib tiene actividad frente a diversos tipos de tumores como colorrectal, pulmón, cabeza, cuello y páncreas. La eficacia antitumoral de erlotinib se ha investigado en clínica como agente único y en combinación con otros agentes. Erlotinib se emplea en cáncer de pulmón tras el fracaso de al menos un régimen de quimioterapia. En un ensayo de fase III, la adición de erlotinib a gemcitabina mejoró la supervivencia en el cáncer de páncreas avanzado. Indicios alentadores de actividad antitumoral también se han observado en varios estudios de fase II en los que se utilizó erlotinib como monoterapia en cáncer de cabeza y cuello, colorrectal, hepatocelular, gastroesofágico biliar y cáncer de ovario. Los efectos adversos detectados en estos estudios fueron hepatitis inducida por medicamentos, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome de Stevens-Johnson y necrólisis epidérmica tóxica (27).

Cetuximab

Cetuximab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une con alta afinidad y especificidad al dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Esto interfiere con la regulación de la cascada de señalización, lo que conduce a la inhibición de la proliferación celular, angiogénesis y metástasis. Clínicamente, la radioterapia en combinación con cetuximab demuestra una clara ventaja sobre la radioterapia como tratamiento único. Cetuximab potencia la radiosensibilidad de las células tumorales a través de múltiples mecanismos: inhibición de la proliferación de células cancerosas, perturbación del ciclo celular y acumulación de células en fases radiosensibles, e inducción de apoptosis y necrosis. Cetuximab es generalmente bien tolerado, aunque se ha asociado con toxicidad dermatológica incluyendo xerosis, cambios en las uñas, el pelo, telangiectasia o arañas vasculares y erupciones (28). Cetuximab está aprobado para el cáncer de cabeza y cuello, y en 2009 fue aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer colorrectal metastático refractario, ya sea en combinación con irinotecán o como monoterapia (29), dicha aprobación recoge que este fármaco sólo puede usarse en aquellos casos en los que no exista una mutación en el gen KRAS. Este gen codifica una pequeña proteína G de la ruta de EGFR, de tal forma que en 2012, la FDA, aprobó un test genético para detectar de forma rutinaria siete tipos de mutaciones en el gen KRAS, permitiendo así dirigir de forma adecuada el tratamiento antineoplásico. Este efecto se detecta exclusivamente para el tratamiento del cáncer colorrectal y también se produce con otros inhibidores de EGFR.

Matuzumab

Matuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 que se une a EGFR con alta afinidad. Matuzumab ha sido evaluado en cáncer de cabeza y cuello, gástrico, colorrectal, esofágico, cervical y de pulmón. Un estudio preclínico en líneas celulares muestra que aunque matuzumab se une de manera eficiente a EGFR y bloquea su fosforilación, no es tan eficaz como cetuximab a la hora de inhibir la proliferación de células tumorales. Estudios en fase II de matuzumab en mujeres con cáncer de ovario resistente a platinos muestra que el fármaco tiene un perfil de toxicidad favorable, observándose erupción acneiforme, erupción cutánea, náuseas, vómitos y diarrea aunque con una incidencia más baja que la obtenida con cetuximab (30).

3.4. Inhibidores de la tubulina

Existe una gran cantidad de moléculas capaces de unirse a la tubulina e interferir en el mecanismo de formación de los microtúbulos, de manera que las células detienen su ciclo celular y desencadenándose la apoptosis. Los compuestos que modulan la actividad de tubulina pueden dividirse de forma general en dos

grandes grupos: los inhibidores de su polimerización, como la colchicina y la vincristina, que se unen a ésta impidiendo que forme microtúbulos; y los agentes estabilizantes de microtúbulos, como el paclitaxel y el docetaxel, que se unen preferentemente a la tubulina ensamblada, minimizando la disociación de la tubulina-GDP de los extremos de los microtúbulos e induciendo el ensamblaje de la tubulina-GDP normalmente inactiva. El éxito clínico del paclitaxel y el docetaxel ha conducido a la búsqueda de nuevos compuestos con el mismo mecanismo de acción y al descubrimiento en los últimos años de una gran cantidad de agentes estabilizantes de microtubulos con al menos dos sitios de unión distintos.

DJ-927

DJ-927 es un nuevo taxano que tiene como ventajas su alta hidrosolubilidad (elimina la necesidad de emplear vehículos tóxicos, minimizando el riesgo de reacciones de hipersensibilidad), su elevada biodisponibilidad oral y una potente actividad antitumoral. Su mecanismo de acción implica la inhibición de la tubulina lo que causa detención de la división de ADN en la célula y apoptosis. Este compuesto exhibió una citotoxicidad mayor que los taxanos existentes tales como paclitaxel y docetaxel contra diversos tipos de tumores, especialmente en modelos de cáncer colorrectal. En particular, DJ-927 muestra una marcada eficacia en ensayos, in vitro e in vivo, con células tumorales que presentan una resistencia intrínseca o adquirida a taxanos desarrollada por expresión de bombas de eflujo como la glicoproteína P (P-gp). En estudios en fase II como tratamiento de segunda línea para pacientes con cáncer colorrectal tras fallo de irinotecán u oxaliplatino, y en pacientes con cáncer gástrico avanzado que no han respondido a 5-fluoruracilo, el tratamiento fue bien tolerado, alcanzándose una respuesta positiva en el 40% de los casos (31).

ABT-751

ABT-751 es un agente citotóxico novedoso, de administración oral, que se une a la tubulina e inhibe la polimerización de los microtúbulos, lo que conduce a un bloqueo en la fase G2/M en el ciclo celular y a la apoptosis celular. ABT-751 inhibe la proliferación de diversas líneas celulares humanas derivadas de tumores, incluyendo los fenotipos resistentes a paclitaxel y doxorubicina (32). Una vez administrado, ABT-751 se absorbe rápidamente alcanzándose la concentración máxima (C_{max}) a las 3 h y con una semivida de 4,4 a 16,6 h. La toxicidad producida por ABT-751 fue determinada en un estudio en fase I, detectándose neuropatía periférica, estreñimiento, fatiga y mialgia. ABT-751 está actualmente en ensayos fase II para el cáncer de mama recurrente, cáncer renal, cáncer colorrectal y de pulmón.

EPO-906

EPO-906 (epotilona B) es un miembro de una nueva clase de agentes estabilizantes de microtúbulos conocidos como las epotilonas. EPO906 promueve la polimerización de los heterodímeros de tubulina y estabiliza los microtúbulos contra la despolimerización, provocando la detención del ciclo celular mitótico y la muerte celular por apoptosis (32). En estudios preclínicos, EPO906 muestra actividad anticancerígena tanto in vitro como in vivo contra varios tipos de cáncer, incluyendo modelos resistentes a paclitaxel. Es importante destacar que, EPO906 actúa sobre células que han desarrollado resistencia por sobre-expresión de glicoproteína-P o bomba de eflujo. En estudios clínicos en fase I se observó que el efecto tóxico limitante de dosis fue la diarrea. Los ensayos se realizaron en pacientes con cáncer de colon, mama, pulmón y ovario, incluyendo pacientes que habían recibido taxanos previamente. Posteriormente, se realizaron dos estudios en fase II en monoterapia para cáncer de ovario, próstata, mama y cáncer renal, observándose respuesta antitumoral en todos los casos. En consecuencia, los estudios preclínicos y clínicos indican que EPO906 tiene un espectro relativamente amplio de actividad, incluyendo los tumores resistentes a paclitaxel.

TZT-1027

TZT-1027 es un derivado de dolastatina-10, que fue seleccionado por su alta actividad antitumoral in vitro. TZT-1027 se desarrolló como un nuevo agente inhibidor de la polimerización de la tubulina mediante su unión a los microtúbulos, impidiendo la división celular y activando la apoptosis de las células tumorales, como los alcaloides de la vinca y los taxanos, pero los experimentos in vitro mostraron que además de este efecto de citotoxicidad directa, era capaz de inhibir la angiogénesis del tumor, una actividad que no se ve con los alcaloides vinca o taxanos (33,34). En un estudio en fase I se pudo determinar que la toxicidad limitante de dosis fue debida a neutropenia, neuropatía periférica, leucopenia y fatiga. Los resultados de un estudio en fase II desarrollado en 32 pacientes con cáncer de pulmón mostraron un aumento en la supervivencia global de las pacientes (35).

3.5. Otros agentes inductores de apoptosis**Fenoxodiol**

Fenoxodiol es una isoflavona sintética que ha demostrado actividad antitumoral frente a cáncer de ovario, y que se encuentra en ensayos en fase I para cáncer de próstata y de cérvix. A pesar de la progresión en los ensayos clínicos, la diana sobre la que actúa fenoxodiol no está muy clara, más bien, se cree que regula múltiples señales de transducción. Estudios mecanísticos han demostrado que fenoxodiol inhibe la ADN topoisomerasa II e induce la apoptosis. Esta apoptosis puede desencadenarse de forma dependiente o independiente de caspasas en

función del tipo celular. Así se ha descrito un mecanismo dependiente de caspasas en las células de cáncer de ovario, a través de la vía de transducción de señal de Akt (36), mientras que en otros tipos de cáncer (cabeza, cuello y colon) fenoxodiol induce apoptosis independiente de caspasas por expresión de p21WAF1 (37). Otro mecanismo por el que se cree que actúa fenoxodiol es por alteración del ciclo redox esencial de las células. El control del equilibrio redox intracelular es crítico para la viabilidad celular, de manera que la perturbación de los principales pares redox tales como la relación NADH/NAD⁺ o el glutatión puede tener profundos efectos sobre las células desencadenándose la apoptosis.

La mayoría de los casos de cáncer de ovario con quimioresistencia a platino y taxanos se asocian a la sobreexpresión de factores antiapoptóticos. Fenoxodiol, in vitro, induce apoptosis en células de cáncer de ovario quimioresistentes y restaura la sensibilidad a la quimioterapia de platino, taxanos y topotecan en células quimioresistentes. Estos datos apoyan el estudio en fase II de fenoxodiol llevado a cabo en 40 mujeres con cáncer de ovario quimiorresistente. El fenoxodiol se administró en terapia combinada con taxanos o paclitaxel, y los resultados indicaron que la administración de fenoxodiol da lugar a mayores tasas de respuesta entre las mujeres con cáncer de ovario quimioresistente.

Inhibidores de c-Kit y PDGFR

c-kit (receptor del factor de células madre) y PDGFR (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas) son receptores tirosin-quinasa que estimulan el crecimiento de la célula tumoral, la angiogénesis y la vasculogénesis. c-Kit y PDGFR, así como sus respectivos ligandos están sobre-expresados en un 70% de los cánceres de ovario (38). Las mutaciones de c-kit en las células intersticiales de Cajal en el tracto digestivo son probablemente la clave del 85% de los tumores del estroma gastrointestinal, ya que estas mutaciones desencadenan cascadas de señalización que promueven la proliferación celular y supervivencia. Las mutaciones de PDGFR están implicadas en un 5% de estos tumores.

Imatinib (STI-571, Gleevec®) es una molécula pequeña inhibidora de c-kit, PDGFRA, PDGFRB y de la proteína de fusión BCR-ABL, que ha revolucionado el pronóstico de los pacientes con tumor del estroma gastrointestinal, con un beneficio clínico en el 85% de los casos. Sin embargo un alto porcentaje de los pacientes tratados con imatinib acaban desarrollando resistencia (10-20% muestran resistencia natural y un 50% resistencia adquirida), lo que ha llevado a la necesidad de emplear imatinib en combinación con otro agente antineoplásico con el fin de superar las resistencias a este fármaco. En este sentido, se ha observado que su combinación con un agente proapoptótico potencia la muerte celular y previene de la resistencia a imatinib (39). Esto ha llevado a nuevos estudios sobre el mecanismo de acción de imatinib, determinándose que induce apoptosis en una serie de tumores como leucemia, leucemia mielógena, estroma

C. Martín y A. I. Torres

gastrointestinal, cáncer ganglionar de la retina y glioblastoma. La apoptosis se manifiesta a través de la fragmentación nuclear, la degeneración de la membrana mitocondrial y la activación de las caspasas.

4. CONCLUSIÓN

La búsqueda de nuevas dianas para el tratamiento de tumores pretende, por un lado una mayor eficacia en la eliminación o detención del crecimiento tumoral y por otro evitar o dificultar la aparición de resistencias. Los nuevos agentes antineoplásicos con actividad proapoptótica, han demostrado en diversos ensayos clínicos en los que se ha evaluado como monoterapia que son capaces de disminuir el tamaño de la masa tumoral en diferentes tipos de cáncer, incluso en tumores resistentes a otros tratamientos; pero también se ha demostrado que muchos de ellos ofrecen un efecto sinérgico al utilizarse en combinación con los agentes antineoplásicos actuales evitando incluso la resistencia de las células tumorales hacia estos últimos.

5. AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid y el Fondo Social Europeo mediante el Plan Regional de Investigación Científica e Innovación Tecnológica; y por el Programa de Grupos de Investigación Santander-UCM GR35/10, Grupo: Administración parenteral de medicamentos.

6. REFERENCIAS

1. Chu, E.; DeVita VT. (2001) Principles of Cancer Management: Chemotherapy. Cancer, Principles and Practice of Oncology, 6th Edition. Philadelphia; p 289-386.
2. Goldie, JH.; Coldman, AJ. (1979) A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. Cancer treat Rep 63, 1727-1731.
3. Skipper, HE.; Simpson-Herren, L. (1985) Relationship Between Tumor Stem Cell Heterogeneity and Responsiveness to Chemotherapy. Important Advances in Oncology. Philadelphia; p 63-77.
4. Arends, MJ.; Wyllie, AH. (1991) Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology. Int Rev exp Pathol 32, 223-254.
5. Wyllie, AH. (1992) Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. Cancer Metast Rev 11, 95-103.
6. Gershenson, LE.; Rotello, RJ. (1992) Apoptosis: a different type of cell death. FASEB J 6, 2450-2455.
7. Parchment, RE. (1993) The implications of a unified theory of programmed cell death, polyamines, oxyradicals, and histogenesis in the embryo. Int J Dev Biol 37, 75-83.
8. Sachs, L.; Lotem, J. (1993) Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. Blood 82, 15-21.
9. Agarwal, R.; Linch, M.; Kaye, SB. (2006) Novel therapeutic agents in ovarian cancer. Eur J Surg Oncol 32, 875-886.

10. Satyam, A.; Hocker, MD.; Kane-Maguire, KA.; Morgan, AS.; Villar, HO.; Lyttle, MH. (1996) Design, synthesis, and evaluation of latent alkylating agents activated by glutathione S-transferase. *J Med Chem* 39(8), 1736-1747.
11. Lyttle, MH.; Satyam, A.; Hocker, MD.; et al. (1994) Glutathione-S-transferase activates novel alkylating agents. *J Med Chem* 37(10), 1501-1507.
12. Thévenin, AF.; Zony, CL.; Bahnson, BJ.; Colman, RF. (2011) GSTpi modulates JNK activity through a direct interaction with JNK substrate, ATF2. *Protein Sci* 20(5), 834-848.
13. Vergotea, I.; Finklerb, N.; Del Campoc, J. et al. (2009) Phase 3 randomised study of canfosfamide (Telcyta®, TLK286) versus pegylated liposomal doxorubicin or topotecan as third-line therapy in patients with platinum-refractory or -resistant ovarian cancer. *Eur J Cancer* 45, 2324-2332.
14. Turella, P.; Filomeni, G.; Dupuis, ML. et al. (2006) A strong glutathione S-transferase inhibitor overcomes the p-glycoprotein-mediated resistance in tumour cells. 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) triggers a caspase-dependent apoptosis in MDR1-expressing leukemia cells. *J Biol Chem* 281, 23725-23732.
15. Filomeni, G.; Turella, P.; Dupuis, ML. et al. (2008) 6-(7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol, a specific glutathione S-transferase inhibitor, overcomes the multidrug resistance (MDR)-associated protein 1-mediated MDR in small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther* 7, 371-379.
16. Pellizzari Tregno, F.; Sau, A.; Pezzola, S. et al. (2009) In vitro and in vivo efficacy of 6-(7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) on human melanoma. *Eur J Cancer* 45, 2606-2617.
17. Tentori, L.; Dorio, AS.; Mazzon, E.; Muzi, A.; Sau, A.; Cuzzocrea, S. et al. (2011) The glutathione transferase inhibitor 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) increases temozolomide efficacy against malignant melanoma. *Eur J Cancer* 45, 1219-1230.
18. Huang, S.; Shu, L.; Easton, J. et al. (2004) Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Activates Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 Signaling by Suppressing Protein Phosphatase 5 Activity. *J Biol Chem* 279(35), 36490-36496.
19. Temkin, SM.; Yamada, SD.; Fleming, GF. (2010) A phase I study of weekly temsirolimus and topotecan in the treatment of advanced and/or recurrent gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol* 117, 473-476.
20. Yap, TA.; Garrett1, MD.; Walton, MI.; Raynaud, F.; De Bono, JS.; Workman, P. (2008) Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin in Pharmacol* 8, 393-412.
21. Strimpakos, AS.; Karapanagiotou, EM.; Saif, MW.; Syrigos, KN. (2009) The role of mTOR in the management of solid tumors: An overview. *Cancer Treat Rev*; 35:148-159.
22. Ciardiello F. (2005) Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment. *Future Oncol* 1(2), 221-234.
23. Salomon, DS.; Brandt, R.; Ciardiello, F. et al. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol/Hematol* 19, 183-232.
24. Dummer Meira, D.; Nóbrega, I.; De Almeida, VH.; Mororo, JS.; Cardoso, AM.; Silva, R. (2009) Different antiproliferative effects of matuzumab and cetuximab in A431 cells are associated with persistent activity of the MAPK pathway. *Eur J Cancer* 45, 1265-1273.
25. Oh, IJ.; Jung-Ban, H.; Kim, KS.; Kim, YC. (2012) Retreatment of gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer who previously controlled to gefitinib: A single-arm, open-label, phase II study. *Lung Cancer* 77, 121-127.
26. Chang, SC.; Chang, CY.; Chang, SJ.; Yuan, MK.; Lai, YC.; Liu, YC. (2013) Gefitinib-Related Interstitial Lung Disease in Taiwanese Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* 14(1), 55-61.

C. Martín y A. I. Torres

27. Luo, Q.; Gu, Y.; Zheng, W. et al. (2011) Erlotinib inhibits T-cell-mediated immune response via down-regulation of the c-Raf/ERK cascade and Akt signaling pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 251, 130-136.
28. Duffour, J.; The´zenas, S.; Dereure, O. et al. (2010) Inter-observer agreement between dermatologists and oncologists in assessing dermatological toxicities in patients with metastatic colorectal cancer treated by cetuximab-based chemotherapies: A pilot comparative study. *Eur J Cancer* 46, 3169-3174.
29. Dinh, P.; Harnett, P.; Piccart-Gebhart, MJ.; Awada, A. (2008) New therapies for ovarian cancer: Cytotoxics and molecularly targeted agents. *Crit Rev Oncol/hematol*; 67:103-112.
30. Seiden MV, Burris HA, Matulonis U, et al. A phase II trial of EMD72000 (matuzumab), a humanized anti-EGFR monoclonal antibody, in patients with platinum-resistant ovarian and primary peritoneal malignancies. *Gynecol Oncol* 104, 727-731 (2007).
31. Ismael, GF.; Dornelles, D.; Mano, MS.; Awada, A. (2008) Novel cytotoxic drugs: Old challenges, new solutions. *Cancer Treat Rev* 34, 81-91.
32. Hotta, K.; Ueok, H. (2005) New cytotoxic agents: a review of the literature. *Crit Rev Oncol/hematol* 55, 45-65.
33. Natsume, T.; Watanabe, J.; Koh, Y. et al. (2003) Antitumor activity of TZT-1027 (soblidotin) against vascular endothelial growth factor secreting human lung cancer in vivo. *Cancer Sci* 94, 826-833.
34. Natsume T, Watanabe J, Koh Y, et al. (2003) Antitumor activity of TZT-1027 (Soblidotin) against vascular endothelial growth factor-secreting human lung cancer in vivo. *Cancer Sci* 94, 826- 833.
35. Riely, GJ.; Gadgeel, S.; Rothman, I.; Saidman, B.; Sabbath, K.; Feit, K. (2007) A phase 2 study of TZT-1027, administered weekly to patients with advanced non-small cell lung cancer following treatment with platinum-based chemotherapy. *Lung Cancer* 55, 181-185.
36. Kamsteeg, M.; Rutherford, T.; Sapi, E.; et al. (2003) Phenoxodiol –an isoflavone analog– induces apoptosis in chemoresistant ovarian cancer cells. *Oncogene* 22(17), 2611-2620.
37. Agüero, MF.; Facchinetti, MM.; Sheleg, Z.; Senderowicz, AM. (2005) Phenoxodiol, a novel isoflavone, induces G1 arrest by specific loss in cyclin-dependent kinase 2 activity by p53-independent induction of p21WAF1/CIP1. *Cancer Res* 65(8), 3364-3373.
38. Tonary, AM.; Macdonald, EA.; Faught, W. et al. (2000) Lack of expression of c-Kit in ovarian cancers is associated with poor prognosis. *Int J Cancer* 89(3), 242-250.
39. Reynoso, D.; Nolden, LK.; Yang, D.; et al. (2011) Synergistic induction of apoptosis by the Bcl-2 inhibitor ABT-737 and imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumor cells. *Mol Oncol* 5, 93-104.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm



Validation protocol of analytical procedures for quantification of drugs in polymeric systems for parenteral administration: Dexamethasone phosphate disodium microparticles

Cristina Martín-Sabroso^a, Daniel Filipe Tavares-Fernandes^a, Juan Ignacio Espada-García^a, Ana Isabel Torres-Suárez^{a,b,*}

^a Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Spain

^b Institute of Industrial Pharmacy, Complutense University of Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2013
Received in revised form
20 September 2013
Accepted 22 September 2013
Available online xxx

Keywords:

Validation protocol
Polymeric drug delivery systems
Analytical procedure
Microparticles
Dexamethasone phosphate disodium

ABSTRACT

In this work a protocol to validate analytical procedures for the quantification of drug substances formulated in polymeric systems that comprise both drug entrapped into the polymeric matrix (assay:content test) and drug released from the systems (assay:dissolution test) is developed. This protocol is applied to the validation two isocratic HPLC analytical procedures for the analysis of dexamethasone phosphate disodium microparticles for parenteral administration. Preparation of authentic samples and artificially "spiked" and "unspiked" samples is described. Specificity (ability to quantify dexamethasone phosphate disodium in presence of constituents of the dissolution medium and other microparticle constituents), linearity, accuracy and precision are evaluated, in the range from 10 to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in the assay:content test procedure and from 0.25 to 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in the assay:dissolution test procedure. The robustness of the analytical method to extract drug from microparticles is also assessed. The validation protocol developed allows us to conclude that both analytical methods are suitable for their intended purpose, but the lack of proportionality of the assay:dissolution analytical method should be taken into account.

The validation protocol designed in this work could be applied to the validation of any analytical procedure for the quantification of drugs formulated in controlled release polymeric microparticles.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the last years numerous scientific works about long-term administration systems for parenteral administration of different drugs have been published. Most of these systems are polymeric microparticles from which drug is sustained released for periods within a week to several months. In these works, different analytical procedures for drug quantification are used, but few evidences of their validation are reported.

When considering microparticles elaboration, it is essential to have a well defined and validated analytical method in order to determine microparticle drug loading as well as drug release from microparticles (Gil-Alegre et al., 2005).

Indeed, within the pharmaceutical development of microparticles for a specific drug, there are two main analytical aspects to take into account:

Quantification of drug content into microparticles: it belongs with the assay:content test described in The International Conference on Harmonization (ICH) guidelines (ICH, 2005). A procedure for microparticle breakage must be established that ensures the total extraction of the drug. Once this is achieved, drug extracted must be quantified in a specific, accuracy and reproducible way (Rivas et al., 2006).

Quantification of drug released from microparticles: It belongs with the assay:dissolution test described in ICH guidelines. Microparticles are long-term administration systems, specially microparticles for parenteral administration, and drug release kinetic must be evaluated by an in vitro assay carried out at 37 °C using phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4 as dissolution medium (Balmayor et al., 2009). Due to the low drug release rate from microparticles for parenteral administration, the developed analytical procedure must detect low drug concentrations in the

* Corresponding author at: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-2040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913941735; fax: +34 913941736.

E-mail addresses: ai.torres@hotmail.es, galaaaa@farm.ucm.es (A.I. Torres-Suárez).

G Model

IJP-13646; No. of Pages 9

ARTICLE IN PRESS

2

C. Martín-Sabroso et al. / International Journal of Pharmaceutics xxx (2013) xxx–xxx

dissolution medium and selectively quantify them in presence of other microparticle constituents also dissolved in the medium.

The objective of this work is to develop a procedure to validate two isocratic HPLC analytical methods for the quantification of drugs in polymeric microspheres for parenteral administration: one of them for the quantification of drug loaded into microparticles (assay:content test), and the other one for the quantification of drug released from microparticles (assay:dissolution test). Poly lactic-co-glycolic (PLGA) dexamethasone phosphate disodium microparticles are used as model.

Dexamethasone is a synthetic adrenocortical steroid with basic glucocorticoid activity. It can be used as anti-inflammatory (Gómez-Gaete et al., 2008), immunosuppressor (Gross et al., 2011) and finds applications in endocrine and rheumatic disorders as adjunctive therapy for short-term administration (Elron-Gross et al., 2009), and also in several dermatological diseases. Recently it is observed that dexamethasone also has proapoptotic activity (Schwartz et al., 2010; Carlet et al., 2010), useful in the treatment of cancer. Due to its wide therapeutic application field, it is interesting to develop microparticles as a long-term administration system for dexamethasone. These microparticles would allow a controlled release of the drug while reducing the side effects and achieving better dosage option (Balmayor et al., 2009). These systems would also ensure a technological advantage because of the improvement of dexamethasone's stability against light and oxygen.

The validation of both analytical methods for dexamethasone phosphate disodium has been based on the following parameters: selectivity, linearity, precision (within and between days variability), accuracy and limit of quantification, following the requirements established by ICH and USP (Shabir, 2003). The validation carried out includes the evaluation of the robustness. Thus, the validation procedure developed of both analytical methods could be applied to any other microencapsulated drug.

2. Experimental

2.1. Materials

HPLC grade acetonitrile (Panreac Química, S.A., Barcelona, Spain), glacial acetic acid (Panreac Química, S.A., Barcelona, Spain), Phosphate buffer solution (PBS), and HPLC grade water (obtained with a Milli-Q system, Millipore S.A., Molsheim, France) are used to prepare the mobile phase. All these solvents are degassed and filtered before used. Phosphate buffer solution, used as mobile phase and as dissolution medium, is prepared from potassium di-hydrogen phosphate (Panreac Química, S.A., Barcelona, Spain) and di-sodium hydrogen phosphate dihydrate (Merk, Dormstadt, Germany). Dichloromethane (DCM) stabilized with 20 ppm of amylene (Panreac Química, S.A., Barcelona, Spain) is the polymer solvent used to break the microparticles. Dexamethasone phosphate disodium is supplied by Sigma-Aldrich Chem. Co., Steinheim, Germany.

Dexamethasone phosphate disodium microparticles are elaborated in our laboratory by the solvent evaporation technique based on O/W emulsions (Jaraswekin et al., 2007), using the copolymer poly(lactic-co-glycolic acid) RG502 approved by FDA for therapeutic devices, owing to its biocompatibility and biodegradability. Briefly, an emulsion is formed where the external phase is an aqueous solution of polyvinyl alcohol and the internal phase is a solution of dexamethasone phosphate disodium and the polymer in the volatile organic solvent dichloromethane. The initial drug:polymer ratio is 1:10. Spherical microparticles loaded with dexamethasone phosphate disodium are obtained when the organic solvent is

extracted – evaporated from the internal phase under mechanical agitation. Their volume mean diameter is of $79 \pm 19.89 \mu\text{m}$.

Unloaded microparticles are also elaborated in our laboratory following the same procedure as that used for dexamethasone phosphate disodium loaded microparticles, and with all the components but dexamethasone phosphate disodium.

2.2. Equipment

The HPLC system consists of a quaternary pump, an automatic injector with a fixed loop of 20 μL , an ultraviolet/visible detector, a vacuum degasser and an oven, all from 1200 series Agilent Technologies. Analyst software (ChemStation, Agilent Technologies) is used for controlling the equipment, for coordinating data acquisition and for the analysis of data.

2.3. Chromatographic conditions

A reverse phase liquid chromatographic analysis is performed under the following conditions:

Column: Tracer Excel 120 ODSB 5 μm , 15 cm \times 0.46 cm (Teknokroma, Barcelona, Spain).

Mobile phase: PBS (pH 7.4; 0.05 M)–acetonitrile–glacial acetic acid (70:26:4, v/v/v). The final pH is 4 ± 0.2 .

Flow-rate: 1 mL min⁻¹.

Temperature: room temperature.

Injected volume: 20 μL .

Wavelength: 244 nm.

These conditions are based on those proposed by Thote et al. (2005). In both analytical methods the same chromatographic conditions are used in order to make their routine implementation easier.

2.4. Preparation of dexamethasone phosphate disodium standard solutions

Different standard solutions are used for assay:content analytical procedure, and for assay:dissolution analytical procedure, because the solvent of the samples and the range of concentrations to be analyzed are different in both procedures.

Assay:content. A stock solution (A) with a concentration of 1 mg mL⁻¹ is prepared by dissolving 20 mg of dexamethasone phosphate disodium in 20 mL of water pH 4 (adjusted with glacial acetic acid). From this stock solution, standard dexamethasone phosphate disodium solutions (A) with different concentrations are prepared, by dilution with water pH 4 (adjusted with glacial acetic acid).

Assay:dissolution. A stock solution (B) with the same concentration of 1 mg mL⁻¹ is made, but using PBS (pH 7.4; 0.05M) as solvent. From this stock solution, standard dexamethasone phosphate disodium solutions (B) with different concentrations are prepared by dilution with PBS pH 7.4.

2.5. Preparation of authentic samples solutions

Assay:content. The proposed analytical procedure is based on the breakage of the microparticles by dissolution of the polymer in an organic solvent and the subsequent extraction of the drug in an aqueous phase (Thote et al., 2005; Butoescu et al., 2009). 2 mL of dichloromethane is added to approximately 15 mg, exactly weighted, of dexamethasone phosphate disodium microparticles. The mixture is vigorously stirred until the complete breaking of the microparticles. Then 18 mL of water pH 4 (adjusted with acetic acid) are added. Sample is stirred in a vortex stirrer every 5 min during 35 min in order to extract the drug from dichloromethane

Please cite this article in press as: Martín-Sabroso, C., et al., Validation protocol of analytical procedures for quantification of drugs in polymeric systems for parenteral administration: Dexamethasone phosphate disodium microparticles. Int J Pharmaceut (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.026>

to the aqueous phase. Later, the aqueous phase is separated by decantation and it is analyzed by HPLC.

Assay:dissolution. In the dissolution assay of dexamethasone phosphate disodium microparticles approximately 15 mg (exactly weighed) of microparticles are placed in 30 mL of PBS pH 7.4. After three days an aliquot is withdrawn from the dissolution medium, it is filtered through a hydrophilic PVDF syringe filter of 0.45 μm of pore size and it is directly analyzed by HPLC.

2.6. Preparation of artificially "spiked" and "unspiked" samples solutions

Assay:content. 2 mL of dichloromethane is added to approximately 15 mg, exactly weighed, of unloaded microparticles. The mixture is vigorously stirred until the complete breaking of the microparticles. Then 18 mL of the standard dexamethasone phosphate disodium solution (A) is added and the mixture is stirred in a vortex stirrer every 5 min during 35 min. Later, the aqueous phase is separated by decantation (spiked sample solution (A)) and it is analyzed by HPLC.

Unspiked sample solution (A) is prepared following the same procedure but using 18 mL of water pH 4 instead of the standard dexamethasone phosphate disodium solution (A).

Assay:dissolution. Approximately 15 mg (exactly weighed) of unloaded microparticles are placed in 30 mL of standard dexamethasone phosphate disodium solution (B) in PBS pH 7.4. After three days an aliquot is withdrawn from the dissolution medium, it is filtered through a hydrophilic PVDF syringe filter of 0.45 μm and it is directly analyzed by HPLC (spiked sample solution (B)).

Unspiked sample solution (B) is prepared following the same procedure but using 30 mL of PBS pH 7.4 instead of the standard dexamethasone phosphate disodium solution (B).

2.7. Validation protocol

2.7.1. Specificity

In order to determine the ability of both analytical procedures to assess unequivocally dexamethasone phosphate disodium in the presence of the other microparticle constituents which may be present (polymer and PVA traces), standard solutions (A) and (B) with dexamethasone phosphate disodium concentration of 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively; spiked samples solutions (A) and (B) with the same dexamethasone phosphate disodium concentration that the standard solutions; and unspiked samples solutions (A) and (B), are prepared and analyzed in triplicate by HPLC.

Specificity is evaluated by analyzing the chromatograms obtained, and by comparing, by means of a "t" Student's test, the peak area corresponding to dexamethasone phosphate disodium obtained in the analysis of the standard and spiked samples solutions.

2.7.2. Linearity and range

Linearity is established from standard solutions, with different analyte concentration, prepared by dilution from the stock solutions (A) and (B) across the following ranges (Nozal et al., 2000):

Assay:content: three stock solutions (A) are made and from each, 5 standard solutions with concentrations from 10 to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ are prepared and analyzed by HPLC, all in the same day.

Assay:dissolution: three stock solutions (B) are made and from each, 6 standard solutions with concentrations from 0.25 to 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ are prepared and analyzed by HPLC, all in the same day.

For each analytical procedure all the data obtained are evaluated as a whole. Correlation between dexamethasone phosphate disodium concentration and the area of the chromatographic peak is statistically determined through the value of the correlation coefficient. The regression line is calculated by the least-squares method, and the "lack of fit" test is used to statistically evaluate the linearity. By means a "t" Student's test of the y-intercept the proportionality of the regression line is established (Elbarbry et al., 2006).

Calibration sensitivity is calculated from the slope of the regression line, and the discriminatory capacity (d.c) or lowest difference of analyte concentration that the analytical procedure can detect, is determined from the Eq. (1):

$$\text{d.c} = \frac{\text{SD}_y \cdot t_{(i-1)}}{b} \quad (1)$$

where "SD_y" is the combined standard deviation of responses; $t_{(i-1)}$ is the t-Student value corresponding to a probability threshold of 0.05 and the degrees of freedom of the studied sample; "i" is the number of different concentrations used; and "b" is the slope of the calibration curve of the analyte (Rivas et al., 2006).

2.7.3. Precision and accuracy

To evaluate precision two kinds of samples are used: homogeneous authentic samples and artificially prepared samples. These artificially prepared samples are also used for the assessment of the accuracy. Precision is considered at two levels: repeatability (within-assay precision) and intermediate precision, where the day of analysis is evaluated as variation source.

Artificially prepared samples: allow to assess accuracy (by comparing true and experimental values of analyte concentration), and precision at different concentration levels (following ICH guidelines), which is not possible from authentic samples (Remiro et al., 2010). Three spiked sample solutions (A) with dexamethasone phosphate disodium concentration of 10, 30 and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (assay:content procedure) and three spiked sample solutions (B) with dexamethasone phosphate disodium concentration of 0.25, 2.5 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (assay:dissolution procedure) are prepared in triplicate, and are analyzed in the same day, to evaluate repeatability and accuracy. Results are reported as amount of analyte in the samples and as percent recovery by the assay of the known amount of analyte in the sample.

Authentic samples: allow to assess precision at 100% of the test concentration. Six authentic samples solutions (A) (assay:content procedure) and (B) (assay:dissolution procedure) are prepared from the same dexamethasone phosphate disodium microparticles batch and are analyzed in the same day, in order to determine repeatability. In the next second and third days, another three samples are prepared and analyzed in the same way in order to evaluate the intermediate precision. Results are expressed as amount of dexamethasone phosphate disodium in the samples.

To evaluate precision the standard deviation, coefficient of variation and confidence interval of the data are calculated. Accuracy is evaluated by comparing the amount of analyte recovery in the samples with the true value.

2.7.4. Quantitation limit

Quantitation limit is the lowest concentration of analyte which can be quantified with suitable precision and accuracy, and it is calculated according to the Eq. (2):

$$\text{QL} = 10 \left(\frac{\text{SD}}{b} \right) \quad (2)$$

where b is the slope and SD is the standard deviation of y-intercepts of regression line of the linearity study.

Six spiked samples solutions (B), with dexamethasone phosphate disodium concentration equal to the quantitation limit, are

G Model

IJP-13646; No. of Pages 9

ARTICLE IN PRESS

4

C. Martín-Sabroso et al. / International Journal of Pharmaceutics xxx (2013) xxx–xxx

Table 1

System suitability parameters for the chromatographic method. Mobile phase: PBS (pH 7.4; 0.05 M)–acetonitrile–glacial acetic acid (70:26:4, v/v/v); pH = 4 ± 0.2; flow-rate: 1 mL min⁻¹.

	RT (min)	Theoretical plates (N)	Tailing factor (T)	Quantification precision (RSD%)
Assay:content	5.08	9442	0.84	1.12
Assay:dissolution	5.09	9494	0.87	0.93

RT: retention time; RSD: relative standard deviation.

prepared and are analyzed in the same day, in order to check repeatability and accuracy at the quantitation limit calculated.

2.8. Robustness of the analytical procedures

All along the development and optimization phase of the analytical procedures the influence of different analytical conditions on the analysis reliability is evaluated.

2.8.1. pH of the mobile phase

Due to the ionic character of the analyte, the measurements could be susceptible to variations according to the pH of the mobile phase. Because of this, the reliability of the analysis with respect to changes in the pH of the mobile phase is evaluated.

2.8.2. Extraction time in sample preparation

In the preparation of authentic sample solutions for assay:content procedure, the extraction time of dexamethasone phosphate disodium from the polymeric organic phase to the aqueous phase is optimized in order to guarantee that the analytical procedure allows to quantify all the drug loaded into the microparticles. For this, the analysis of samples at increasing extraction times is carried out.

3. Results

3.1. Optimization of the chromatographic system

In the HPLC analysis for both analytical procedures, the composition of the mobile phase initially used was PBS (pH 7.4; 0.05 M)–acetonitrile–glacial acetic acid at 75% (70:28:2, v/v/v), with a pH value of 4.43. With these conditions dexamethasone phosphate disodium was not suitably eluted, needing a long cleaning time of the column between analysis. For this reason, a rise in the mobile phase acidity was tested, achieving the expected results of drug elucidation when the mobile phase composition was changed to 70:26:4; with a pH value of 4. pH changes larger than ±0.2 units led to dexamethasone phosphate disodium elution problems. This pH of 4 is the mobile phase pH described in the USP for dexamethasone phosphate disodium assay, whereas to determine the limit of free dexamethasone a higher pH (5.4) is proposed.

With these chromatographic conditions system suitability was determined by calculating the parameters of Table 1. As can be seen, dexamethasone phosphate disodium retention time (RT) was very similar in both procedures (*assay:content* and *assay:dissolution*) and lower than the retention time depicts in the pharmacopeias (a RT of 14 min in EP method and a run time of 65 min in USP gradient method), so it is considered appropriate for a faster routine analysis. The number of theoretical plates (N) was around 10,000, exceeding the 900 theoretical plates recommended in the USP. Dexamethasone phosphate disodium peak tailing factor (T) was, in both procedures, lower than 1.6, which is the USP specification.

Finally, quantification precision was calculated from five replicate injections of the analyte. For both analytical procedures, the value obtained was lower than 1.5%, which is the maximum value

of relative standard deviation for dexamethasone phosphate disodium in dosage forms according to USP.

3.2. Validation of the assay:content analytical procedure

According to ICH guideline, in the validation of an analytical procedure for quantifying drug content the following characteristics should be determined: linearity, range, specificity, accuracy and precision (repeatability and intermediate precision).

3.2.1. Specificity

Fig. 1 shows the chromatograms obtained with the different samples. All the chromatograms (from spiked and unspiked samples), showed a mobile phase front at around 2 min. The chromatograms of the standard solution samples showed a single peak at a retention time of 5 min corresponding to dexamethasone phosphate disodium. This peak did not appear in the chromatograms of the unspiked samples. The chromatograms of the spiked samples also showed a unique peak, with the same retention time that dexamethasone phosphate disodium. To confirm that there were not interferences between the analyte and other substances with the same retention present in the spiked samples, the areas of the peaks of the standard and spiked samples were compared by a Student's *t*-test (Table 2). No significant differences were detected (*p* value >0.05), which confirmed that there were not interferences with any component of microparticle formulation in the quantification of dexamethasone phosphate disodium.

3.2.2. Linearity and sensitivity

The linearity is evaluated in a range from 10 to 50 µg mL⁻¹ using five dexamethasone phosphate disodium concentration levels. The parameters obtained in the statistical treatment of the results are shown in Table 3. A strong correlation between the two variables analyzed was observed, so more than 99.5% of the variation observed in the response (*Y* variable) was explained by the variation in the concentration of analyte (*X* variable). The Bartlett test confirmed that the analyte concentration factor had not influence on the variance of the response (homoscedastic error), and therefore the analysis of the regression was performed by ordinary least squares, resulting in a curve characterized by the slope and intercept depicted in the table. The correlation between the two variables fitted a linear model as it was shown by the *F*-lack of fit test (*p* > 0.05). The low values of residual sum of squares and residual CV also supported this linear model. The analytical method was proportional as it was demonstrated by the Student's *t*-test (*p* > 0.05).

Table 4 shows the results of the statistical evaluation of the sensitivity. The value of discriminatory capacity obtained indicated that the least difference in concentration of analyte that could be detected by the analytical method (with a 95% probability) was quite smaller than the difference between two concentrations used in the linearity study.

3.2.3. Accuracy and precision

3.2.3.1. Optimization of the extraction of dexamethasone phosphate disodium microencapsulated. The extraction of dexamethasone phosphate disodium from microparticles is the critical step of

Please cite this article in press as: Martín-Sabroso, C., et al., Validation protocol of analytical procedures for quantification of drugs in polymeric systems for parenteral administration: Dexamethasone phosphate disodium microparticles. Int J Pharmaceut (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.026>

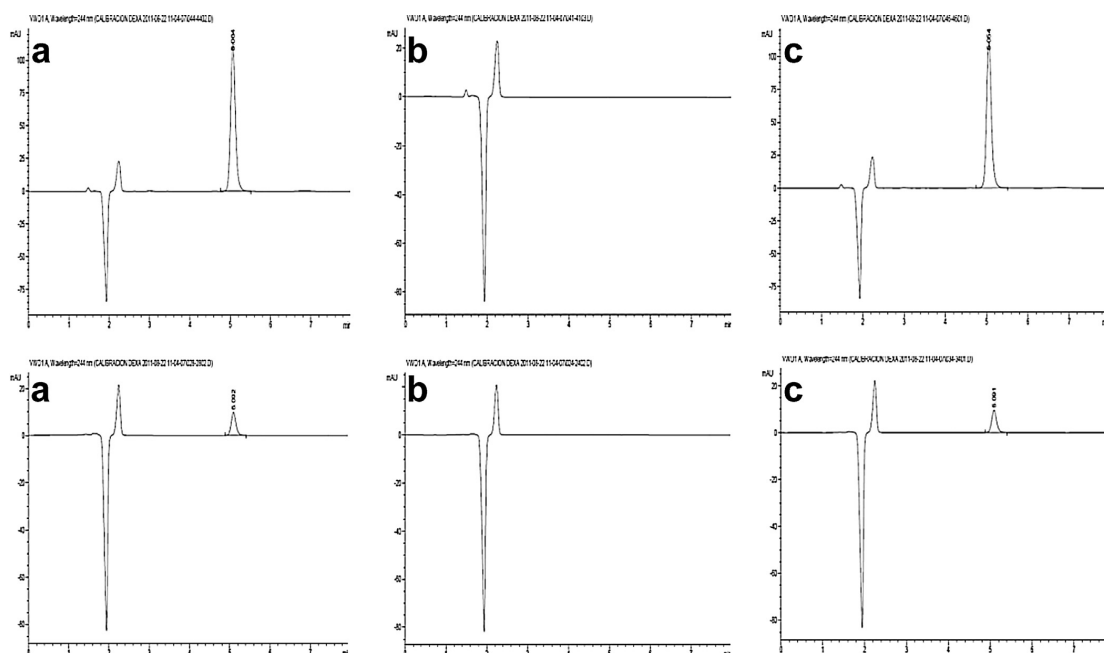


Fig. 1. Chromatograms obtained in the specificity study of the assay:content analytical procedure (up) and assay:dissolution analytical procedure (down). (a) Standard solution samples; (b) unspiked samples and (c) spiked samples. Mobile phase: PBS (pH 7.4; 0.05 M)–acetonitrile–glacial acetic acid (70:26:4, v/v/v); pH = 4 ± 0.2; flow-rate: 1 mL min⁻¹.

Table 2

Statistical evaluation of the specificity. Comparison, by a Student's *t*-test, of the areas of the peaks of standard and spiked samples. Analysis performed in triplicate.

	Assay:content	Assay:dissolution
Standard solution sample mean area (<i>n</i> = 3)	946.64	78.75
Spiked sample mean area (<i>n</i> = 3)	942.45	77.62
Student's <i>t</i> -test (<i>p</i>) ^a	1.406 (0.190)	0.585 (0.590)

^aStatistical significance (*p* value lower than 0.05).

the assay:content analytical procedure. The extraction is carried out in two steps: breakage of microparticles by dissolution of the polymer in dichloromethane, and subsequent add of water to selectively extract dexamethasone phosphate from the organic to the aqueous phase. Then, this procedure is based on the partition of dexamethasone phosphate between dichloromethane and

water. To optimize this step different extraction solvents and different extraction times were tried. When water pH 4 (adjusted with glacial acetic acid) was used as solvent, the amount of drug extracted was higher than when deionized water was directly used. The partition coefficient dichloromethane: water pH 4 was determined using 20 mg dexamethasone phosphate disodium and an

Table 3

Linearity statistical parameters determined from dexamethasone phosphate disodium standard solutions with different concentration levels obtained from three stock solutions, but evaluating all the data as a whole for each analytical procedure.

	Assay:content	Assay:dissolution
Number of data points	15	18
Range (μg mL ⁻¹)	10–50	0.25–10
Correlation coefficient (<i>r</i>)	0.99	0.99
Determination coefficient (<i>r</i> ²)	99.79	99.96
"χ ² " Barlett test (<i>p</i>)	1.48 (0.5089)	2.17 (0.1670)
Residual sum of squares	5076.33	66.40
Slope "b" (A mL μg ⁻¹)	28.65	30.55
Standard derivation of "b" (A mL μg ⁻¹)	0.36	0.14
Intercept "a" (A)	-9.81	3.05
Standard derivation of "a" (A)	11.96	0.66
Residual CV (%)	0.23	1.99
"F" ANOVA test for regression (<i>p</i>)	6307.47 (0.0000) ^a	46916.4 (0.0000) ^a
"F" ANOVA test for linear model (<i>p</i>)	0.39 (0.7659)	2.07 (0.1479)
"t" Student's test for proportionality (<i>p</i>)	0.82 (0.4268)	4.61 (0.0003) ^a

^a Statistical significance (*p* value lower than 0.05).

Please cite this article in press as: Martín-Sabroso, C., et al., Validation protocol of analytical procedures for quantification of drugs in polymeric systems for parenteral administration: Dexamethasone phosphate disodium microparticles. Int J Pharmaceut (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.026>

G Model

IJP-13646; No. of Pages 9

ARTICLE IN PRESS

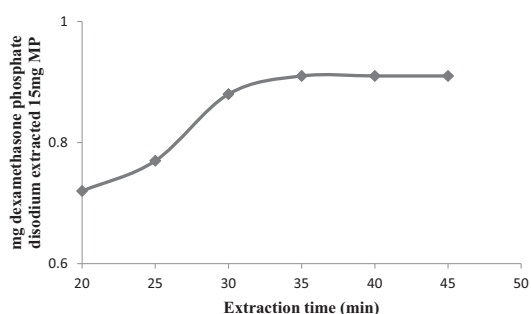
6

C. Martín-Sabroso et al. / International Journal of Pharmaceutics xxx (2013) xxx–xxx

Table 4

Sensitivity statistical parameters determined for both analytical procedures. Parameters were calculated from linearity data. Analysis performed in triplicate.

	Assay:content	Assay:dissolution
Calibration sensitivity ($\text{A mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$)	28.65	30.55
Mean analytical sensitivity ($\text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$)	1.34	9.30
Discriminatory capacity ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.90	0.12

Calibration sensitivity = "b" of the regression line; mean analytical sensitivity = b/SD_y ; discriminatory capacity = $\text{SD}_y t_{(n-1)}/b$; SD_y = combined standard deviation of responses.**Fig. 2.** Optimization of dexamethasone phosphate disodium extraction process from microparticles. Figure shows changes in the amount of drug extracted as contact time with aqueous phase pH = 4 increases.

organic: aqueous phase ratio of 1:9. The value of partition coefficient organic: aqueous phase obtained was 0.201 ($\text{SD} = 0.06$, $n = 5$). This value highly favorable to the aqueous phase is due to at pH 4 dexamethasone phosphate is speciated essentially as a monoanion (pK_a 6.4 and 1.89).

With regard to the extraction time, the results of dexamethasone phosphate disodium extraction using different extraction times are summarized in Fig. 2. Once microparticles were broken with dichloromethane, water pH 4 was added and samples were stirred in a vortex agitator during 30 s every 5 min. Only after 35 min with this discontinuous stirring the drug was completely extracted from the polymer to the water phase.

This procedure to extract dexamethasone phosphate disodium from microspheres was validated with the evaluation of the accuracy (Section 3.2.3.3) where artificially "spiked" samples were prepared following this same procedure.

3.2.3.2. Precision: repeatability (within-day precision) and intermediate precision. Table 5 shows the statistical analysis conducted on

Table 5

Repeatability and accuracy statistical analysis with artificially prepared samples in the validation of the assay:content analytical procedure. Three spiked samples are prepared in triplicate and are analyzed in the same day.

Actual drug content (μg 15 mg MP)	Estimated drug content (μg)	Recovery R (%)	Mean recovery (%)	SD (%)
200	205.72	102.86	100.08	2.41
	197.10	98.55		
	197.66	98.83		
600	594.48	99.08	99.89	1.17
	596.10	99.35		
	607.44	101.24		
1000	1024.4	102.44	100.06	2.46
	975.3	97.53		
	1002.2	100.22		
Bartlett's test (p) [*]	1.2 (0.6274)	"F" ANOVA (p) [*]	0.01 (0.9925)	
SD (%)	1.82	Mean R (%)	100.01	
CV (%)	1.82	$R \pm "t" \text{SD}$	104.2–95.82	
		"t" $R=100$ (p) [*]	0.0177 (0.9863)	

SD: standard deviation of recovery; CV: coefficient of variation of recovery; "t" $R=100$: t-Student value for a theoretical recovery of 100%; *statistical significance (p value lower than 0.05).**Table 6**

Results of the study of precision with dexamethasone phosphate disodium authentic samples in the validation of the assay:content analytical procedure. Authentic solutions-A samples are prepared from the same dexamethasone phosphate disodium microparticles batch.

Day	μg Dexamethasone phosphate 15 mg MP	Mean (X) (μg)	SD (μg)
1	920	935	20.73
	930		
	930		
	960		
	960		
2	910	946.66	15.27
	930		
	960		
	950		
	950		
3	930	943.33	11.54
	950		
	950		
	950		
	950		
CV (%) repeatability	2.21		
$X \pm t$ SD repeatability	988.29–881.71		
N ($\alpha = 0.05$)	1.3		
CV (%) intermediate precision	1.81		
$X \pm t$ SD intermediate precision	977.52–902.48		

CV (%) repeatability = coefficient of variation of responses from day 1; CV (%) intermediate precision = coefficient of variation of responses from the three days; N = number of required determinations to obtain a result with a precision of 95%.

data of the repeatability study carried out with artificially prepared samples. The result of the Barlett test, with $p > 0.05$, indicated that the analyte level did not influence on the variance of the response. Thus, all the data were pooled and a global coefficient of variation (CV) and confidence interval were calculated as a measure of precision. The global CV value was considered suitable according to The Association of Official Analytical Chemists (AOAC), which proposes a limit value of coefficient of variation of 2.8% when the analyte concentration in the samples is within 1–10% (estimated percentage of dexamethasone phosphate disodium inside the microparticles) (Aguirre, 2001). This CV value was even lower when authentic samples were analyzed (Table 6). From this value, the number of required determinations (n) to obtain a precise result can be calculated. This "n" value for a 95% acceptance level is lower than 2. Then, in the routine analysis, two determinations of each sample would be enough to get a precise result.

The results of the intermediate precision study are also shown in Table 6. The day of analysis is the variation source analyzed. The coefficient of variation obtained from the measurements conducted in different days was lower than the coefficient of variation of the repeatability study (samples analyzed the first day), so it can be

Please cite this article in press as: Martín-Sabroso, C., et al., Validation protocol of analytical procedures for quantification of drugs in polymeric systems for parenteral administration: Dexamethasone phosphate disodium microparticles. Int J Pharmaceut (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.026>

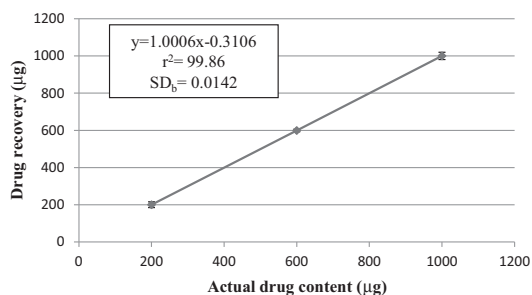


Fig. 3. Graphic representation of analyte recovery against actual analyte in samples in the assay:content analytical procedure. The mathematical correlation between both variables is used to establish the accuracy of the method. Samples analyzed in triplicate. r^2 : determination coefficient; SD_b : standard deviation of the slope.

concluded that the day of analysis did not influence the precision of the analytical method.

3.2.3.3. Accuracy. Accuracy was assessed by analyzing artificially prepared samples over three drug levels. The values of percentage of dexamethasone phosphate disodium recovery and the statistical parameters of the accuracy study are shown in Table 5. The influence of the drug level on the drug recovery was evaluated through a one-way analysis of variance (ANOVA). Since the probability value (p) of the F -test was greater than 0.05, there were not statistically significant differences among the drug recovery from the samples with different drug level. Then, all the data were pooled and one average recovery from the three analyte levels was calculated. This value was quite near 100%, and its confidence interval included 100%. The Student's test also confirmed that the mean value of percent recovery did not differ from 100%.

When the relationship between drug recovery and actual drug in the samples was evaluated, a straight line was obtained with a slope very close to 1.0 (Fig. 3), what also demonstrated that, according to USP, the method met the accuracy acceptance criterion.

3.3. Validation of the assay:dissolution analytical procedure

According to ICH guideline, the validation characteristics which should be considered for the validation of an analytical procedure for content and for dissolution are the same. However, USP makes a difference in such a way that in the validation of analytical procedures for determination of performance characteristics (e.g. dissolution) only information of precision is required. In spite of this, in the validation of the assay:dissolution analytical procedure for dexamethasone phosphate disodium microparticles, specificity, linearity, range, accuracy and quantitation limit were also studied.

3.3.1. Specificity

Specificity was evaluated in order to verify the lack of interferences of soluble constituents of the microparticles in the quantitation of drug released.

Fig. 1 shows the chromatograms obtained from standard solution samples (B), samples prepared from unloaded microparticles after 3 days in dexamethasone phosphate disodium solution (B) ("spiked sample") and samples prepared from unloaded microparticles after 3 days in dissolution medium ("unspiked sample"). Dexamethasone phosphate disodium peak appeared at a retention time of 5 min in the chromatogram of the standard and spiked samples. In the chromatogram of the unspiked samples only the mobile phase front was detected. The Student's t test (Table 2) indicated that there was no significant difference between the area of dexamethasone phosphate disodium peak of the standard and the

spiked samples, which confirmed that there were not interferences with any soluble component of microparticles or of the dissolution medium in the quantification of dexamethasone phosphate disodium released from microparticles.

3.3.2. Linearity and sensitivity

Linearity was evaluated across a range established according to the anticipated drug concentrations in release tests, and using the dissolution medium as solvent of the samples.

A very wide interval of concentrations was set with a very low lower limit ($0.25\text{--}10\ \mu\text{g mL}^{-1}$), with the aim of detecting low concentrations of drug released in the dissolution medium. Six analyte concentrations were used to cover all this range. According to ICH, the range for dissolution testing should be $\pm 20\%$ over the specified dissolution range. There is not a standard procedure for drug release testing of controlled drug delivery systems, but in USP it is established that at least three test times should be chosen to characterize the in vitro drug release profile: an early time point, to evaluate dose dumping; an intermediate time point, to define the in vitro release; and a final time point to show essentially complete release of the drug. In parenteral preparations, where the drug is released during time periods of months or even years, several test times should be established to define the release profile; and in each sampling time, the release medium is withdrawn and replaced with fresh medium in order to keep sink conditions during all the tests. Thus, the analytical procedure for release-dissolution testing should cover values of drug concentration lower than 10–20% of the label claim. In this situation the quantitation limit of the analytical procedure was used to establish the lower limit of the range.

The results of the study of the linearity are shown in Table 3. A strong correlation between the two variables analyzed was observed, since almost 100% of the variation observed in the response was explained by the concentration of analyte variation. The correlation between the two variables fitted a linear model as it was proved by the F -lack of fit test ($p > 0.05$). The low values of residual sum of squares and residual CV also supported this linear model. The analytical method was not proportional as it was demonstrated by the Student's t -test (probability value lower than 0.05). This lack of proportionality of the method will oblige to use a calibration curve in the routine analysis of samples instead on a single standard solution sample.

Table 4 shows the results of the statistical evaluation of the sensitivity. The value of discriminatory capacity indicated that the least difference in concentration of analyte that could be detected by the analytical method (with a 95% probability) was quite smaller than the difference between two concentrations used in the linearity study.

3.3.3. Accuracy and precision

3.3.3.1. Precision: repeatability (within-day precision) and intermediate precision. The statistical analysis of data of the repeatability study conducted on artificially prepared samples is shown in Table 7. As a measure of precision, the global coefficient of variation (CV) and confidence interval were calculated by pooling all the data. The global CV value (1.35%) was considered suitable according to The Association of Official Chemists Analytical, which proposes a limit value of coefficient of variation of 2.7 when de analyte concentration in the samples is within 1 and 10 (estimated dexamethasone phosphate disodium concentration in the release medium) This value of CV was even lower when authentic samples were analyzed (Table 8). From this CV the number of required determinations (n) to obtain a precise result for a 95% acceptance level was calculated, resulting in a value lower than 2.

Table 8 also shows the results of the intermediate precision study, these results can be concluded that the day of analysis does

G Model

IJP-13646; No. of Pages 9

ARTICLE IN PRESS

8

C. Martín-Sabroso et al. / International Journal of Pharmaceutics xxx (2013) xxx-xxx

Table 7

Repeatability and accuracy statistical analysis with artificially prepared samples in the validation of the assay: dissolution analytical procedure. Three spiked samples are prepared in triplicate and are analyzed in the same day.

Actual drug concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Estimated drug concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery R (%)	Mean recovery (%)	SD (%)	
0.25	0.248	99.37	99.37	1.3	
	0.244	97.63			
	0.252	101.12			
	0.251	100.56			
	0.246	98.39			
	0.247	99.15			
2.5	2.55	102.09	100.04	1.85	
	2.46	98.48			
	2.49	99.57			
	10.12	101.25			
10	9.86	98.62	99.92	1.31	
	9.98	99.89			
	1.04 (0.9034)	$F_{\text{ANOVA}} (p)^*$			0.14 (0.8717)
	1.35	Mean R			99.68
Bartlett's test (p) [†]		$R \pm t \text{ SD}$	102.65–96.71		
SD		$t_{R=100}^{\text{th}} (p)^*$	0.820 (0.4296)		
CV (%)	1.35	$CV (\%)_{X=0.25}$	1.31		
		$t_{X=0.25}^{\text{th}} (p)^*$	1.19 (0.2875)		

SD: standard deviation of recovery; CV: coefficient of variation of recovery; $t_{R=100}^{\text{th}}$: t-Student value for a theoretical recovery of 100%; $CV (\%)_{X=0.25}$, $t_{X=0.25}^{\text{th}}$: statistical parameters at the quantitation limit of 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; *statistical significance (p value lower than 0.05).

Table 8

Results of the study of precision with dexamethasone phosphate disodium authentic samples in the validation of the assay: dissolution analytical procedure. Authentic solutions-B samples are prepared from the same dexamethasone phosphate disodium microparticles batch.

Day	Dexamethasone phosphate concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mean (X) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	3.7	3.64	0.04
	3.61		
	3.64		
	3.58		
	3.66		
	3.62		
2	3.58	3.63	0.04
	3.63		
	3.66		
	3.64		
3	3.56	3.61	0.04
	3.62		
	3.62		
CV (%) repeatability		1.18	
$X \pm t \text{ SD}$ repeatability		3.75–3.53	
$N (\alpha=0.05)$		0.37	
CV (%) intermediate precision		1.1	
$X \pm t \text{ SD}$ intermediate precision		3.72–3.55	

CV (%) repeatability = coefficient of variation of responses from day 1; CV (%) intermediate precision = coefficient of variation of responses from the three days; N = number of required determinations to obtain a result with a precision of 95%.

not affect the precision of the analytical method and the CV measurement obtained on different days is similar to the CV of the repeatability study.

3.3.3.2. Accuracy. The results of the statistical analysis of the accuracy study conducted with three analyte levels are shown in Table 7. According to F value of ANOVA, there were not statistically significant differences among the estimated drug concentration from the samples with different drug level. Thus, all the data were pooled and an overall mean value with its standard deviation and coefficient of variation were calculated. This mean value was near 100% and its confidence interval included 100%. The Student's test also confirmed that the mean value was not statistically different from 100%.

Fig. 4 shows the relationship between estimated and actual drug concentration in the samples. A strain line was obtained with a slope close to 1, and therefore it could be concluded that the procedure met the USP accuracy requirements.

3.3.4. Quantitation limit

The value of quantitation limit calculated from the values of slope and y -intercepts standard deviation of the regression line

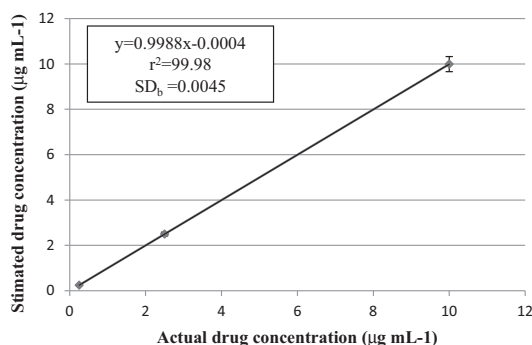


Fig. 4. Graphic representation of estimated drug concentration versus actual analyte concentration in the assay: dissolution analytical procedure. The mathematical correlation between both variables is used to establish the accuracy of the method. Samples analyzed in triplicate. r^2 : determination coefficient; SD_b = standard deviation of the slope.

Please cite this article in press as: Martín-Sabroso, C., et al., Validation protocol of analytical procedures for quantification of drugs in polymeric systems for parenteral administration: Dexamethasone phosphate disodium microparticles. Int J Pharmaceut (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.026>

of the linearity study was of $0.22 \mu\text{g mL}^{-1}$, and from it, a quantitation limit and lower value of the range of $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ was established. This value corresponded to a percentage of dexamethasone phosphate disodium released from microparticles lower than 1%. Therefore, the analytical procedure developed allows the determination of dexamethasone phosphate disodium released at the earliest times of the dissolution-release assay.

To evaluate with more reliability the precision and accuracy at the quantitation limit ($0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$), six artificial "spiked" samples were prepared and analyzed. The results are also shown in Table 8. The low values of coefficient of variation, lower than 2%, and the Student's *t* ($p > 0.05$) confirmed the precision and accuracy of the analytical procedure at the quantitation limit.

4. Conclusion

A protocol for the validation of analytical methods for the quantification of drugs in polymeric systems for parenteral administration has been designed, according to the USP and ICH guidelines but adapted to the intended use of the analytical methods: one of them is intended to the quantification of drug content into microparticles (assay:content test) and the other one is intended to the quantification of drug released from microparticles (assay:dissolution test) taking into account that the systems are developed for their parenteral administration.

To quantify microencapsulated dexamethasone phosphate disodium a previous extraction step is defined where the solvent and the extraction time that guarantee the complete recovery of the drug loaded into the microparticles are critical variables. The specificity, linearity, proportionality, precision and accuracy have been assessed in the dexamethasone phosphate disodium range from 10 to $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (assay:content analytical procedure) and in the range from 0.25 to $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (assay:dissolution analytical procedure) using artificially prepared samples and authentic samples. The proposed analytical procedures are suitable for their intended purpose, but the lack of proportionality of the assay:dissolution analytical procedure should be taken into account.

As a response to the rising develop and approval of microparticles as controlled delivery systems for the administration of drugs, the validation protocol designed in this work should be useful to the validation of any analytical procedure for the quantification of drugs formulated in controlled release polymeric microparticles for parenteral administration.

Acknowledgments

We want to thank the Counseling of Education of the Community of Madrid and the European Social Fund through the Regional Plan of Scientific Research and Technological Innovation. This work was partially funded by the Research Group GR35/10 Santander-UCM, Group: Parenteral administration of drugs.

References

- Aguirre, O., et al., 2001. Validación de métodos de análisis en materias primas y especialidades farmacéuticas. In: AEFI (Ed.), Validación de Métodos Analíticos. Barcelona, pp. 68–75.
- Balmayor, E.R., Tuzlakoglu, K., Azevedo, H.S., Reis, R.L., 2009. Preparation and characterization of starch-poly-ε-caprolactone microparticles incorporating bioactive agents for drug delivery and tissue engineering applications. *Acta Biomater.* 5, 1035–1045.
- Butoescu, N., Jordan, O., Burdet, P., Stadelmann, P., Petri-Fink, A., Hofmann, H., Doelker, E., 2009. Dexamethasone-containing biodegradable superparamagnetic microparticles for intra-articular administration: physicochemical and magnetic properties, in vitro and in vivo drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 529–538.
- Carlet, M., Janjetovic, K., Rainer, J., Schmidt, S., Panzer-Grümayer, R., Mann, G., Prelog, M., Meister, B., Ploner, C., Kofler, R., 2010. Expression, regulation and function of phosphofructo-kinase/fructose-biphosphatases (PFKFBs) in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. *BMC Cancer* 10, 638–649.
- Elbarbry, F., Wilby, K., Alcorn, J., 2006. Validation of a HPLC method for the determination of p-nitrophenol hydroxylase activity in rat hepatic microsomes. *J. Chromatogr. B* 834, 199–203.
- Elron-Gross, I., Glucksam, Y., Margalit, R., 2009. Liposomal dexamethasone-diclofenac combinations for local osteoarthritis treatment. *Int. J. Pharm.* 376, 84–91.
- Gil-Alegre, M.E., Lareo-Barone, M., Torres-Suárez, A.I., 2005. Extraction and determination by liquid chromatography and spectrophotometry of naloxone in microparticles for drug-addiction treatment. *J. Sep. Sci.* 28, 2086–2093.
- Gómez-Gaete, C., Tsapis, N., Silva, L., Bourgaux, C., Besnard, M., Bochot, A., Fattal, E., 2008. Supramolecular organization and release properties of phospholipid-hyaluronan microparticles encapsulating dexamethasone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 116–126.
- Gross, K.L., Oakley, R.H., Scoltock, A.B., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A., 2011. Glucocorticoid receptor α isoform-selective regulation of antiapoptotic genes in osteosarcoma cells: a new mechanism for glucocorticoid resistance. *Mol. Endocrinol.* 25, 1087–1099.
- International Commission for Harmonisation (ICH), 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, I.C.H. Harmonised Tripartite Guideline, ICH Topic Q2(R1).
- Jaraswekin, S., Prakongpan, S., Bodmeier, R., 2007. Effect of poly(lactide-co-glycolide) molecular weight on the release of dexamethasone sodium phosphate from microparticles. *J. Microencapsul.* 24, 117–128.
- Nozal, M.J., Bernal, J.L., Toribio, L., Jimenez, J.J., Martin, M.T., 2000. Validation of the removal of acetylsalicylic acid: recovery and determination of residues on various surfaces by high performance liquid chromatographic. *J. Chromatogr. A* 870, 69–75.
- Remiro, R., Ibañez-Vea, M., Gonzalez-Peñas, E., Lizarraga, E., 2010. Validation of a liquid chromatography method for the simultaneous quantification of ochratoxin A and its analogues in red wines. *J. Chromatogr. A* 1217, 8249–8256.
- Rivas, I.P., Gil-Alegre, M.E., Torres-Suarez, A.I., 2006. Development and validation of a fast high-performance liquid chromatography method for the determination of microencapsulated pyrethroid pesticides. *Anal. Chim. Acta* 557, 245–251.
- Schwartz, J.R., Sarvaiya, P.J., Vedeckis, W.V., 2010. Glucocorticoid receptor knock down reveals a similar apoptotic threshold but differing gene regulation patterns in T-cell and pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol. Cell. Endocrinol.* 320, 76–86.
- Shabir, G.A., 2003. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A* 987, 57–66.
- Thote, A.J., Chappell, J.T., Gupta, R.B., 2005. Reduction in the initial-burst release by surface crosslinking of PLGA microparticles containing hydrophilic or hydrophobic drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1, 43–57.

POLIMERIC AND LIPID DEXAMETHASONE MICROPARTICLES FOR
INHIBITION OF CELL PROLIFERATION IN ANTITUMOR THERAPIES

Martín-Sabroso, C.^(a); Moreno-Ortega, A.J.^(c,d,e); Cano-Abad, M.F.^(c,d,e); Torres-Suárez,
A.I.^{*(a,b)}.

^(a)Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,
Complutense University of Madrid, Spain.

^(b) Institute of Industrial Pharmacy. Complutense University of Madrid, Spain.

^(c) Clinical Pharmacology, Health Research Institute, La Princesa University Hospital,
Madrid, Spain.

^(d) Teófilo Hernando Institute, Madrid, Spain.

^(e) Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, Autonomous
University of Madrid, Spain.

* Corresponding author. Tel.: +34 913941735; Fax: +34 913941736.

E-mail: galaaaa@farm.ucm.es. Address: Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-2040
Madrid, Spain

Enviado a Journal of Controlled Release

(Factor de impacto 7.633)

Abstract

Glucocorticoids (GCs) and dexamethasone (dex) play a central role in the treatment of lymphoid malignancies, particularly acute lymphoblastic leukaemia (ALL). Preclinical studies have shown that GCs also affect cell differentiation, proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells, hepatoma cells, mammary tumour cells, glioma cells, melanoma cells and thyroid cancer cells. The proliferation and apoptotic effects of GCs are cell type-specific as well as time and concentration dependent. The aim of this work was to improve chemotherapy protocols developing controlled drug delivery systems by using polymeric and lipid microparticles as controlled drug delivery systems of dex.

The optimisation of both microparticle elaboration methods resulted in polymeric and lipid microparticles with optimal sizes for parenteral administration, and with high encapsulation efficiency and drug loading. *In vitro* assays showed, on one hand, that polymeric microparticles had a slow and sustained dex release for more than a month. On the other hand, lipid microparticles dex release was faster, reaching 100% of drug released within 24 h. Characterisation of the cytotoxic effect on PC12 cells was carried out by cell proliferation and apoptosis assays. After a single administration of loaded microparticles, the cellular death rate for 26 days was similar to that obtained with the dex solution administered for 48 h. Dex solution and loaded polymeric microparticles induced apoptosis around 15.8% and 19.9%, respectively, after 2 days of incubation; and cell cycle arrest at G2 phase was detected. These results allow us to propose loaded polymeric microparticles as an alternative to the current dex administration systems in combined chemotherapy. Lipid microparticles induced cell death similar to dex solution administered every 48 h for 3 days assays; however, there was a statistically significant increase in apoptosis induction in PC12 cells compared with the dex solution; and beside, significant antiproliferative effects on PC3 cells in contrast to the dex solution. These results allow us to propose these dex lipid microparticles as a possible tool to revert GC resistance.

Keywords

Dexamethasone, Polymeric microparticles, Lipid microparticles, Apoptosis, Cytotoxicity.

1. Introduction

Glucocorticoids (GCs) are used in therapeutics as anti-inflammatory and immunosuppressive agents. Due to their ability to induce cell cycle arrest and cell death, these agents have a central role in the treatment of lymphoid malignancies, particularly acute lymphoblastic leukaemia (ALL) and multiple myeloma (MM). Indeed, dexamethasone (dex), a potent synthetic glucocorticoid, is a part of all combined chemotherapy protocols, for its strong apoptosis-inducing effect on malignant lymphoblasts [1], with an important synergic effect in combination with drugs such as bortezomib, rituximab or lenalidomide. In addition to their cytotoxic effect on haematologic malignancies, preclinical studies have shown that GCs also exert effects on cell differentiation, proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells [2], hepatoma cells, mammary tumour cells, glioma cells, melanoma cells and thyroid cancer cells [3]. In spite of the high effectiveness of dex treatment in ALL, mainly in children, GC resistance occurs in 10–30% of untreated patients, being more frequent in T-lineage than B-precursor acute lymphoblastic leukaemia. Furthermore, systemic administration of high doses of dex are required for inducing tumour cell apoptosis but causes severe side effects such as osteoporosis, Cushing's syndrome or an increased risk of infections [4]. Even though most combined chemotherapy protocols currently used in clinics include dex at high doses, recent clinical investigations on the efficacy of dex in refractory multiple myeloma have shown synergic effects of low doses of this GC combined with pomalidomide or lenalidomide [5,6].

The apoptotic effect of GCs is cell type-specific and time and concentration dependent [7]. GCs mediate most of their effects via their receptor (GR), a ligand-activated transcription factor. The GR is expressed in almost every cell in the body and regulates genes controlling development, metabolism, and the immune response. The unbound receptor is complexed with a variety of proteins in the cytoplasm of cells. Upon GC binding, proteins are released and the GR migrates to the nucleus where it is involved in the regulation of gene transcription by two main mechanisms: transactivation and transrepression [8]. Transactivation occurs by direct binding of GR dimers to Glucocorticoid Response Elements around the target genes and generally results in a potentiation of transcription [8]. Activated GR can also complex with other

transcription factors preventing them from binding their target genes and, hence, repressing the expression of genes that are normally upregulated. This indirect mechanism of action is referred to as transrepression.

It seems that GC-induced apoptosis critically depends on sufficient levels of GR and a subsequent alteration in gene expression. However, the precise nature of the GC-regulated genes responsible for the apoptotic effects remains elusive [9]. Mitochondria are important death signal integrators and key organelles involved in the onset of the intrinsic apoptotic pathway [10]. Dex induces changes in mitochondrial membrane properties [11] that together with the reduced expression of mitochondrial transporters of substrates and proteins may lead to repressed mitochondrial respiratory activity and lower ATP levels that contribute to GC-induced apoptosis.

The mechanisms that underlie the development of GC resistance are also poorly understood and likely vary with disease type, treatment regimen and genetic background of the patient. Resistance to GC therapy may occur if inactive GRs are present in the vast majority, if the members of the ABC-transporter family are overexpressed or if the apoptotic pathway is inhibited [12]. An increasing numbers of reports indicate that activation of the mammalian target of the rapamicin (mTOR) signalling pathway may contribute to GC resistance in haematological malignancies [1].

In conclusion, the complex pattern of GC-induced cell death warrants further investigation, and there must be more efforts to improve therapy protocols and revert GC resistance.

PC12 cells are derived from a pheochromocytoma of the rat adrenal medulla and can be differentiated into a neuronal phenotype by stimulation with nerve growth factor. Functional GR expression in PC12 cells has been reported [13,14]. Because GCs upregulate catecholamine-synthesizing enzymes and storage proteins [15-17], dex has been extensively used to improve catecholamine secretion in PC12 cells [18]. The concentrations employed range from 1 to 5 μM [19,20] with different time exposures, but no cytotoxic effects were reported for dex.

The aim of this work was to improve chemotherapy protocols with dex by developing controlled drug delivery systems, and to evaluate the effect of these systems on dex effectiveness as an apoptotic drug and their ability to revert GC resistance for

chemotherapy purposes. Thus, we have developed two types of microparticles, by using polymeric or lipid carriers, for parenteral administration of dex.

Microparticles could improve the dosage of dex, reducing the number of administrations and improving patient compliance. But more importantly, microparticles could also improve treatment effectiveness and reduce GC side effects by providing a suitable pharmacokinetic drug release profile [21]. Indeed, these systems could allow an extended drug release (for weeks or months after an unique administration) while degrading [22], providing controlled constant blood levels of drug and avoiding the pharmacokinetic peak trough fluctuations characteristic of conventional formulations. With this in mind, polymeric microparticles were elaborated by an emulsion solvent extraction/evaporation technique using biocompatible and biodegradable polymers derived from lactic and glycolic acids (PLGA). In addition, lipid microparticles have also been developed as additional efficient drug carriers to protect the integrity, stability and functionality of dex [23]. They were elaborated by a spray drying technique, which avoids the use of organic solvents [24]. Although both microencapsulation techniques are conceptually simple, a large number of formulations and process variables can affect the properties of the microparticles [25]. Thus, for parenteral administration, it is important to take into account that microparticle size has to be smaller than 100 μm to allow their injection with a conventional needle, but larger than 10 μm to avoid macrophage phagocytosis [26].

The characteristics of the polymeric and lipid microparticles that were determined included size, dex loading and encapsulation efficacy, drug disposition into microparticles, compatibility and *in vitro* controlled release. Furthermore, the cytotoxic effects and apoptotic activity of dex was tested using PC12 cells, comparing the results obtained after a single administration of polymeric and lipid microparticles with those obtained with dex solution administration for 48 h. Finally, the possibility that lipid carriers facilitate the suppression of GC cell resistance was also investigated.

2. Material and Methods

2.1. Material

Dexamethasone 21-phosphate, polyvinyl alcohol (PVA, $M_w=30,000-70,000$), albumin from chicken egg, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide and propidium iodide were

obtained from Sigma- Aldrich (Madrid, Spain). PLGA Resomer RG502 and RG504H were provided by Boehringer Ingelheim (Barcelona, Spain), Dichloromethane (DCM) (HPLC grade), acetonitrile, potassium dihydrogen phosphate, disodium hydrogen phosphate dehydrate, methanol, acetic glacial acid, ethanol, sodium chloride, lactose, mannitol and threalose were provided by Panreac (Barcelona, Spain). Lipoid E80 (egg phospholipids with 80% phosphatidylcholine) was a generous gift from Lipoid GmbH (Switzerland). Distilled demineralised Milli-Q® water (Millipore, Madrid, Spain) was used. PC12 and PC3 cell lines obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Dulbecco's Modified Medium (DMEM), fetal bovine serum, horse serum, L-glutamine, penicillin-streptomycin, Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1649 and phosphate buffer solution (PBS) were provided by Life Technologies (Madrid, Spain).

2.2. Methods

2.2.1. Microparticle preparation

Polymeric microparticles were prepared by the oil-in-water (O/W) emulsion-solvent evaporation method using PLGA 50:50 copolymers. Briefly, the organic phase consists of a 500 mg polymer and 0.5 ml of dex solution (100 mg/ml) in methanol, dissolved in 5 ml of a volatile organic solvent. The organic phase was emulsified by stirring in an aqueous phase with PVA and NaCl. Later, vigorous stirring was maintained at 500 rpm for 2.5 h in order to allow suitable evaporation of the organic solvent and hardening of the microparticles. The microparticles were collected by filtration (through a 5 µm Millipore® SMWP membrane filter) and washed with distilled water. Finally, the microparticles were freeze-dried at 200 mT (Flexi-Dry MP, FTS® Systems, NY, USA) and were stored at 4 °C. Different experimental conditions were evaluated, and the details of each condition are summarised in Table 1.

	Organic phase		Aqueous phase		Stirring rate
	Organic Solvent	Polymer	Volume	Composition	
Protocol 1	4.5 ml DCM	RG502	100 ml	1 % PVA, 1 N NaCl	800rpm
Protocol 2	3 ml DCM	RG502	100 ml	1 % PVA, 1 N NaCl	800rpm
Protocol 3	3 ml Chlorofom	RG502	100 ml	1 % PVA, 1 N NaCl	800rpm
Protocol 4	3 ml DCM	RG502	50 ml	1 % PVA, 1 N NaCl	800rpm
Protocol 5	3 ml DCM	RG502	100 ml	0.5 % PVA, 0.5 N NaCl	800rpm
Protocol 6	3 ml DCM	RG502	100 ml	0.25 % PVA, 0.25 N NaCl	1200rpm
Protocol 7	3 ml DCM	RG504H	100 ml	0.25 % PVA, 0.25 N NaCl	1200rpm

Table 1: Experimental conditions evaluated in the optimization of the elaboration procedure of polymeric microparticles.

Lipid microparticles were obtained by spray drying. A spray drier (B-191, BüCHI) equipped with a 0.7 mm diameter fluid nozzle was used. The spray drying parameters were fixed at an air-flow rate of 800 l/h, feed-flow rate of 50%, inlet temperature of 110 °C, outlet temperature of 50–55 °C and aspiration at 100%. Lipid and dex were dissolved in ethanol, and ovoalbumin and lactose in water. Aqueous and ethanolic solutions were then mixed (30/70, v/v), and the mixture was maintained under moderate stirring while fed into the spray dryer. The total amount of solids used was 2 g/l, of which 10% were dex and 90% were excipients. The powder obtained was stored at 4–8 °C. To optimise the process, different lipid proportions and sugar types were employed, maintaining ovalbumin and sugar at the same ratio.

For all of the microencapsulation process, the yield was calculated as a percentage by dividing the mass of the powder collected by the initial mass of solids in the solution.

2.2.2. Microparticle characterisation

2.2.2.1. Morphology and size

The surface and shape of the microparticles were examined by scanning electron microscopy (SEM) (Jeol-JSM-6400 Electron Microscope Tokyo, Japan). The samples were deposited on aluminium stubs with a carbon tape and were coated with gold under vacuum (Emitech K550X, Eitech Ltd., UK). The particle size of the microparticles was measured by laser diffraction (Microtrac® SRA 150 Particle Size Analyser, Leeds & Northrup Instruments, Ireland), after dispersing the particles in water. The volume mean diameter was calculated. Each sample was measured in triplicate.

2.2.2.2. Drug disposition into the microparticles and compatibility

The drug excipients' compatibility, as well as the physical state of the drug within the microparticle, were evaluated by differential scanning calorimetry (DSC). DSC scans were carried out using a Mettler-Toledo DSC820 with a Huber TC100 intracooler (Madrid, Spain) calibrated with indium. The samples were heated in pin-holed sealed aluminium pans under an inert nitrogen atmosphere at a flow rate of 70 mL/min. With polymeric microparticles, thermal events were measured in the second heating cycle of the following heat-cool-heat loop: the sample was heated from 20 to 80 °C, held isothermally for 2 min, quenched from 80 to 20 °C, held isothermally for 2 min and heated from 20 to 280 °C. The rate of heating and quenching was 10 °C/min. Lipid microparticle DSC runs were conducted from 0 to 280 °C at a rate of 5 °C/min. Samples of pure drug, raw excipients, drug:excipients physical mixtures, unloaded and loaded microparticles were analysed in triplicate.

2.2.2.3. Drug loading and encapsulation efficiency

High performance liquid chromatography (HPLC) was used for the quantification of dex inside the microparticles. The HPLC system consisted of a quaternary pump, an automatic injector, an ultraviolet/visible detector, a vacuum degasser and an oven, all from 1200 series Agilent Technologies (Madrid, Spain). The method, adapted from that of Thote et al. [27] was previously validated. The mobile phase was a mixture of PBS 0.05 M (pH 7.4):acetonitrile:glacial acetic acid (70:26:4 v/v, pH = 4 ± 0.2), and a flow rate of 1 mL/min was fixed. Samples of 20 µL were injected and detected at 244 nm. The analytical column was a Tracer Excel 120 ODSB 5 µm, 15 x 0.46 cm (Teknokroma, Barcelona, Spain). The retention time of dex was 5 min.

To determine the amount of dex encapsulated in the polymeric microspheres, 15 mg of microparticles was dissolved in 2 mL of DCM. The mixture was vigorously stirred until the complete breaking of the microparticles. Then, 18 ml of water at pH 4 (adjusted with acetic acid) was added. The sample was stirred in a vortex stirrer every 5 min for 35 min in order to extract all the drug [27,28]. Later, the aqueous phase was diluted and analysed by HPLC. In the case of lipid microparticles, 5 mg of microparticles was dissolved in 2 ml of ethanol. After sample sonication for 1 min, it was centrifuged at 5,200 rpm for 5 min to eliminate the excipients that were not soluble in ethanol. Then, 500 µl of the supernatant was diluted in 4.5 ml of methanol (1:10) and analysed by HPLC. The amount of dex was determined using a calibration curve constructed over the range of 5–50 µg/ml ($r = 0.99$). All measurements were conducted in triplicate.

The dex content in the microparticles was expressed as mg of dex in 100 mg of microparticles. The entrapment efficiency was calculated using Eq. (1).

$$EE(\%) = \frac{\text{actual Dex : Polymer ratio}}{\text{initial Dex : Polymer ratio}} \cdot 100$$

2.2.3. *In vitro* dex release from microparticles

In vitro release of dex from microparticles was carried out under sink conditions. Briefly, 5 mg of microparticles was weighed, suspended in 10 ml of PBS pH 7.4 in closed vials, and immersed in a thermostatic shaking water bath (Clifton® NE5-28, United Kingdom) at 37 °C with continuous agitation (50 strokes/min). At specific time intervals, 8 mL of the supernatants was withdrawn, filtered through 0.45 µm nylon filters (Teknokroma®, Barcelona, Spain) and analysed for dex content by HPLC (as described above). The amount of dex released was determined using a calibration curve constructed over the range of 0.25–10 µg/ml ($r = 0.99$). The withdrawn volume was immediately replaced with an equal volume of fresh and pre-warmed medium.

2.2.4. Evaluation in cell cultures

2.2.4.1. Cell cultures

The PC12 cell line was maintained as a monolayer in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 7.5% fetal bovine serum, 7.5% horse serum, 1% L-glutamine and 0.1% penicillin-streptomycin and PC3 cell line was maintained as a

monolayer in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1649 supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin-streptomycin-amphotericin B 25 mg/mL. Cells were incubated at 37 °C in a humidified chamber in an atmosphere containing 5% CO₂ [29].

2.2.4.2. Cell proliferation assay

PC12 cells were seeded in 48-well plates and treated with different concentrations of dex (3–1000 μM) for 1, 2 and 3 days to determine the cytotoxic effect of the dex solution. The cytotoxic effect of dex released from the polymeric microspheres cannot be determined directly by adding dex-loaded microspheres to the cell culture because the polymeric microparticles have dex release times of up to 30 days, and cell cultures' maximum life is approximately 6–7 days. To solve this problem, parallel *in vitro* release assays were carried out, as previously described, employing sterile PBS pH 7.4 as the release medium, which was withdrawn and replaced by fresh medium at predetermined time intervals to maintain sink conditions during all of the assays. When target days were reached, the release medium was withdrawn and replaced with a fresh culture medium, adding this suspension of microparticles in culture medium to the cell culture. Once the microparticles were added, the culture was maintained for 6 days, and the resulting effects on cell proliferation were compared with that obtained with a daily dex solution administration during the same time interval.

As dex release from lipid microparticles occurred within two–three days, the cell proliferation assay was carried out directly by adding dex lipid microparticles to the cell culture and comparing the results obtained after three days of incubation with those obtained after daily administration of dex solution.

To assess the mitochondrial function of cells, bromide (3-[4, 5-dimethyliazol-2-yl]-2, 5-diphenyl) (MTT) reagent was added to each well for 1 h at 37 °C, and formazan crystals were formed; then, dimethylsulfoxide (DMSO) was added to dissolve the crystals. After resuspending the content of the wells, the optical density (OD) was read using an Elisa reader at 550 nm (Berthold Detection Systems, Sirius). Phenylarsine oxide (PAO) at 10 μM was used as a positive control for cell death. Cell viability, expressed as a percentage of the control, was calculated with the following equation: $\text{viability} = (\text{OD test}/\text{OD control}) \times 100$. Each result described is based on 6 to 12 different determinations.

2.2.4.3. Apoptosis assay

PC12 cells were seeded in 6-well plates. After 24 h, cells were treated with 10 μ M of dex, with the polymeric or lipid microparticles, or with 1 μ M staurosporine as a positive apoptosis control for different time periods. Treated cells were fixed in 70% ethanol and DNA was stained with propidium iodide (PI) at a final concentration of 20 mg/ml. The number of apoptotic cells (DNA content $< 2n$) was determined by flow cytometry (FC500 MLP, Beckman Coulter). The percentage of the apoptotic cells in the sub-G1 fraction was determined using CXP analysis software. Each result described was based on 6 to 12 different determinations [29].

2.2.5. Statistical analysis

Statistical analysis of data was made by Statgraphics® and GraphPad Prism v. 5.0 assuming sample homogeneity. Different formulations and different treatments were compared by ANOVA tests. Differences in p values below 0.05 were considered statistically significant. Mean values \pm standard deviations are shown.

3. Results

3.1. Polymeric microparticle preparation and characterisation

The microencapsulation procedure developed was reproducible, with process yields for the different protocols tested above 82%, except in protocol 3, where the yield was lower (Table 2). In most of the cases, the resulting microparticles were spherical, individualized, nonporous, and uniform, with a smooth surface without hollows or deformations (Fig. 1).

3.1.1. Optimisation of the microparticle preparation procedure

Initially, DCM was selected as the organic solvent. The organic solvent volume was adjusted (protocols 1 and 2) to improve the extraction of such solvent during microsphere formation. Solvent extraction-evaporation leads to polymer precipitation encapsulating the drug. Therefore, the faster the solvent is evaporated the faster the polymer precipitation is and the higher the drug loading that can be obtained [30]. Nevertheless, in our study the reduction in solvent volume did not lead to an improvement in the drug loading (Table 2), nor did it result in any morphological alteration of the microparticles (Fig. 1).

DCM was substituted by chloroform in protocol 3. Many authors describe that the use of organic solvents with good miscibility in water, such as chloroform, improves microparticle drug loading [31-33]. In our study, this change resulted in microparticles with a more irregular surface (Fig. 1), increasing microparticle aggregation and lowering microparticle drug loading (Table 2).

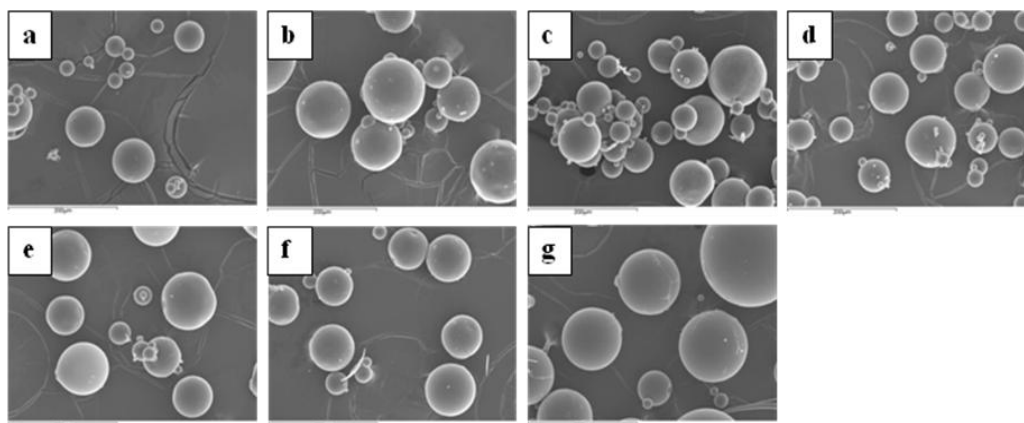


Figure 1. SEM images of polymeric microparticles obtained under different experimental conditions (scale bar = 200 μm). Microparticles obtained in protocol 1 (a); protocol 2 (b); protocol 3 (c); protocol 4 (d); protocol 5 (e); protocol 6 (f); and protocol 7 (g). Representative microphotographs of the seven types of polymeric microparticles are shown.

In order to increase drug loading, the volume of the aqueous phase was reduced (protocols 2 and 4) looking for limiting drug diffusion to the external aqueous phase during solvent removal. Nevertheless, the improvement in drug loading obtained was not significant (Table 2).

The decrease of PVA concentration in the external aqueous phase (from 1% PVA in protocol 2 to 0.5% PVA in protocol 5) resulted in an increase in drug loading but also to an increase of microsphere size (Table 2). Indeed, PVA acts as a stabilizer, reducing the surface tension between the aqueous and organic phases and, thus, facilitating internal organic phase dispersion in smaller droplets [31]. On the other hand, a high concentration of PVA favours dex diffusion to the aqueous phase, thus, decreasing drug loading and encapsulation efficiency. To increase drug loading while maintaining a microsphere size of less than 100 μm , the PVA concentration was reduced by up to 0.25%, while the stirring speed during emulsion formation was increased (protocol 6).

Finally, protocol 7 is the same as protocol 6, but the characteristics of the polymer are slightly different. In both cases, poly(dl-lactide/glycolide) 50:50 copolymers were used but with different molecular weights and, therefore, different inherent viscosities (RG504H > RG502). In addition, the RG504H resomer contains carboxylic acid in chains and hydrates faster, showing a faster degradation *in vitro* than the non-H one. A large increase in microparticle size was observed when the RG504H copolymer was used, exceeding 100 μm , probably due to the less diffusion of this higher viscosity polymer through the PVA external solution [33]. Furthermore, microparticle drug loading was reduced (Table 2), maybe due to both the longer contact time between dex and the external phase, and the higher porosity of the microparticles (as described in the bibliography); although in the SEM images, modifications in the surface of these microspheres (Fig. 1g) were not observed [25].

	Yield (%)	Volume mean diameter	Drug loading (mg DEX / 100 mg MPs)	Encapsulation efficiency (%)
Protocol 1	90.06	66.06 \pm 32.04	2.98 \pm 0.20	30.62 \pm 2.11
Protocol 2	92.12	73.31 \pm 30.89	2.89 \pm 0.18	29.79 \pm 1.91
Protocol 3	63.23	83.59 \pm 48.95	1.53 \pm 0.10	15.48 \pm 1.05
Protocol 4	81.88	81.34 \pm 37.41	3.25 \pm 0.24	33.48 \pm 2.51
Protocol 5	95.68	92.81 \pm 41.55	5.79 \pm 0.29	61.51 \pm 3.18
Protocol 6	97.08	59.69 \pm 22.35	7.30 \pm 0.26	78.84 \pm 2.86
Protocol 7	93.05	135.26 \pm 52.53	4.63 \pm 0.29	48.19 \pm 3.09

Table 2. Microparticle characteristics obtained from the different protocols of table 1.

Together, these results led to the conclusion that protocol 6 was the best microencapsulation procedure to elaborate polymeric microparticles, achieving microparticles with an optimal size and morphology for parenteral administration, and with high encapsulation efficiency and drug loading.

3.1.2. Drug disposition into the microparticles and compatibility

DSC thermograms of pure dex, raw R502 polymer, a mixture of RG502:dex and microparticles are shown in Figure 2. The DSC trace of pure dex showed two peaks near 100 $^{\circ}\text{C}$, which correspond to linked water molecules and free water molecules, respectively. A sharp and large exothermic peak was also observed at 228.05 $^{\circ}\text{C}$, which corresponds to the drug melting point with an enthalpy of fusion of $\Delta H_m = -77.8 \text{ J/g}$.

Raw polymer RG502 showed an endothermic peak at 46.17 °C with heat of fusion of 4.32 J/g, which is consistent with the data previously published by Boehringer Ingelheim. The thermograms of the physical mixtures at actual proportions showed two peaks, which correspond to polymer RG502 and dex, indicating that there are no chemical interactions between both compounds. In the thermogram of dex microparticles, the peak corresponding to the melting of dex was not detected in DSC thermogram obtained of microparticles, indicating that the drug was dissolved or molecularly dispersed within the polymeric matrix.

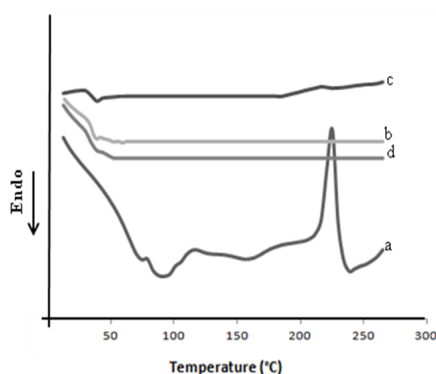


Figure 2. DSC thermograms obtained upon heating from 20 to 280 °C at 10 °C/min of pure dex (a), pure polymer RG502 (b), physical mixture (c) and microparticles protocol 6 (d).

3.2. Lipid microparticle preparation and characterisation

Microparticles were obtained directly as a powdered product. The microencapsulation procedure developed was reproducible, with microencapsulation yields around 40%.

3.2.1. Optimisation of the microparticle preparation procedure

Different lipid microparticle batches were elaborated using four different lipid proportions (40, 60, 70 and 80%). With 40, 60 and 70% of lipid (batches 1, 2 and 3), a powdered free-flow product was directly obtained from the spray drier, but when the lipid proportion increased up to 80% the flowability of the obtained product decreased significantly, as deduced by its trend to stick on the walls of the cyclone and collector recipient of the equipment. When the size of batches 1, 2 and 3 were determined by laser diffraction, mean diameters ranging from 18 to 31 μm and narrow unimodal size distributions were obtained (Fig. 3e). These results do not correspond with the images

obtained by SEM (Figs. 3a, b, c, d). Indeed, a high aggregation was observed in all cases, although in most of the batches the microparticle did not lose their spherical shape, and individual microparticles could be distinguished. In addition, an increase in lipid proportion led to higher aggregation. This high aggregation state observed in SEM images may be due to the imaging process because the sample was subjected to high temperatures and as a consequence the lipid was partially melted favouring aggregate formation.

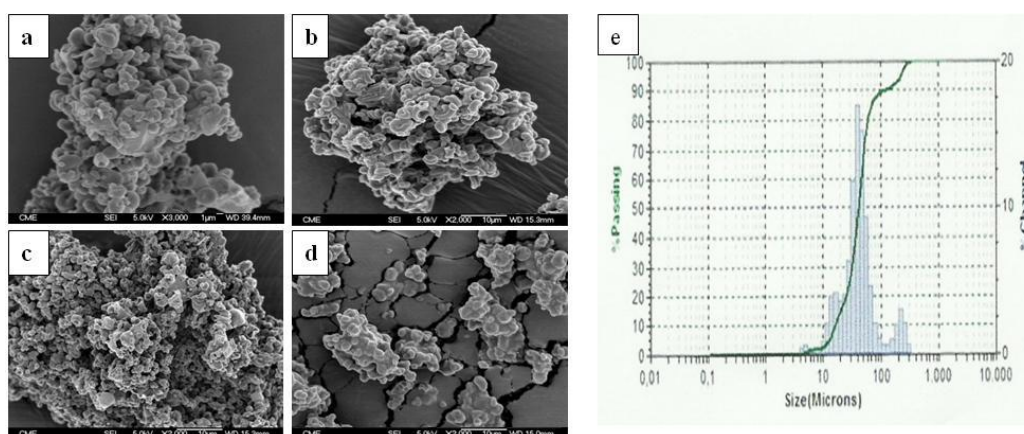


Figure 3. SEM images from lipid microparticles with different lipid proportions: a) 40% lipid, b) 60% lipid, c) 70% lipid y d) 80% lipid. Representative microphotographs of the four types of microparticles are shown. The figure 3 e) shows the particle size distribution of microparticles obtained in the batch 5. Results correspond to percentage volume diameter distribution.

The microencapsulation yield was in all cases around 40%, decreasing significantly in batch 4 where microsphere aggregation was higher. This is an important disadvantage of this production technique. However, one of the main advantages of the technique, which compensates for the low yield, is the high encapsulation efficiency (Table 3), achieving a drug loading of about 9 mg of dex/100 mg of microparticles in all batches.

In order to reduce the sensitivity of the lipid microparticles to temperature, due to the low melting point of lipid, and thus to increase their physical stability, modifications on the nature of the sugar (lactose, mannitol and threulose in batches 4, 5 and 6, respectively) were done. Microparticles with different aggregation states, but maintaining their morphology and individual shape, were always observed. The lowest aggregation was observed using threulose, obtaining a product that was easier to handle.

Analysing microparticle size (Table 3), we can conclude that it is not affected by lipid proportion nor by the nature of the sugar used. Lipid microparticles showed a lower size than polymeric ones but were higher than 10 μm , avoiding phagocytosis by macrophages.

In conclusion, batch 6, with 70% lipid and threalose, was selected for the following studies.

	% Lipoid	Sugar	Volume mean diameter	Drug loading (mg Dex / 100 mg MPs)	Encapsulation efficiency (%)
Batch 1	40	Lactose	29.8 \pm 10.8	8.13 \pm 0.22	79.63 \pm 2.21
Batch 2	60	Lactose	27.93 \pm 9.71	9.5 \pm 0.41	94.32 \pm 4.11
Batch 3	70	Lactose	19.48 \pm 7.82	8.74 \pm 0.21	86.27 \pm 2.06
Batch 4	80	Lactose	30.42 \pm 18.81	9.21 \pm 0.37	91.34 \pm 3.69
Batch 5	70	Manitol	23.15 \pm 11.22	9.06 \pm 0.20	87.79 \pm 1.96
Batch 6	70	Threalose	25.36 \pm 19.26	9.23 \pm 0.49	89.61 \pm 3.79

Table 3. Characteristics of the different batches of lipid microparticles.

3.2.2. Drug disposition into the lipid microparticles and compatibility

DSC analysis of lipid microparticles was complex due to the high number of excipients that were used in the production procedure. Thermograms for all the pure excipients were first analysed, to continue with all the physical mixtures (1:1) of all the components (data not shown). Incompatibilities between components in the physical mixtures were not detected. All the pure component thermograms and the one from batch 6 microparticles are shown in Figure 4. The DSC thermogram of pure lipid (Fig. 4d) exhibited a single endothermic thermal event at $T_{\text{onset}} = 38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ with an enthalpy (ΔH) of 18.99 J/g, which would correspond to the melting of the aliphatic chains. This melting temperature justifies the results obtained in the SME analysis previously presented. In DSC thermograms of the microparticles, it is difficult to characterise the individual excipient peaks due to their low concentration and to the overlap of different peaks at the same temperatures. However, the absence of the characteristic dex peak indicates that the drug was dissolved or molecularly dispersed within the lipid matrix.

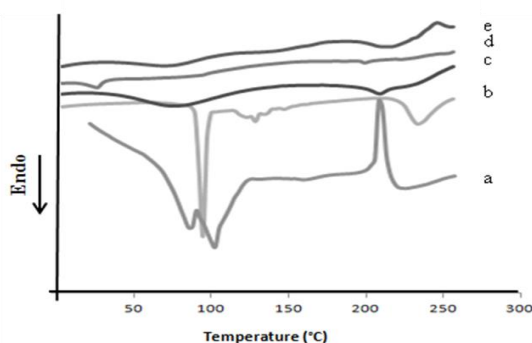


Figure 4. DSC thermograms obtained upon heating at 5 °C/min of pure dex (a), threalose (b), ovalbumin (c), lipid (d) and batch 6 microparticles (e).

3.3. *In vitro* release of dex from microparticles

As depicted in Figure 5a, dex release from polymeric microparticles showed a multi-stage release behaviour. Due to the low molecular weight of dex and the hydrolysis of the aliphatic polyester polymers such as poly(dl-lactide/glycolide) in aqueous medium, drug release from the microspheres would contribute to both mechanisms: drug diffusion through the polymeric matrix and microparticle degradation. A low burst effect in the first 24 h (less than 10% of the drug was released from the MP) was detected. Next, a rapid release stage was observed, probably a consequence to a great extent of Dex diffusion from the outer layers of the microparticles and with a low contribution of microparticle degradation, showing 70% of the drug released by day 14. After that, dex release was slower mainly due to microparticle degradation; in such a way that after 28 days, 81% of the drug was released. The maximum drug release was reached after 90 days with a total of 92% of the drug released.

As shown in Figs. 5b and 5c, dex release profiles obtained from the lipid microparticles were significantly different from the polymeric ones, because the release was much faster, reaching 100% of drug released after 24 h of assay. Figure 5b shows the different release profiles at different lipid proportions. These profiles show that the higher the lipid proportion the better the control of drug release. All of the drug was released in an immediate way from 40% and 60% lipid microspheres, however, drug release was slightly slower with the 70% lipid microspheres. (all of the drug was released within 24 h). Comparing the different 70% lipid microsphere batches made with different

sugars (Fig. 5c), differences in kinetic profiles were not detected, suggesting that lipid is the unique component affecting dex release.

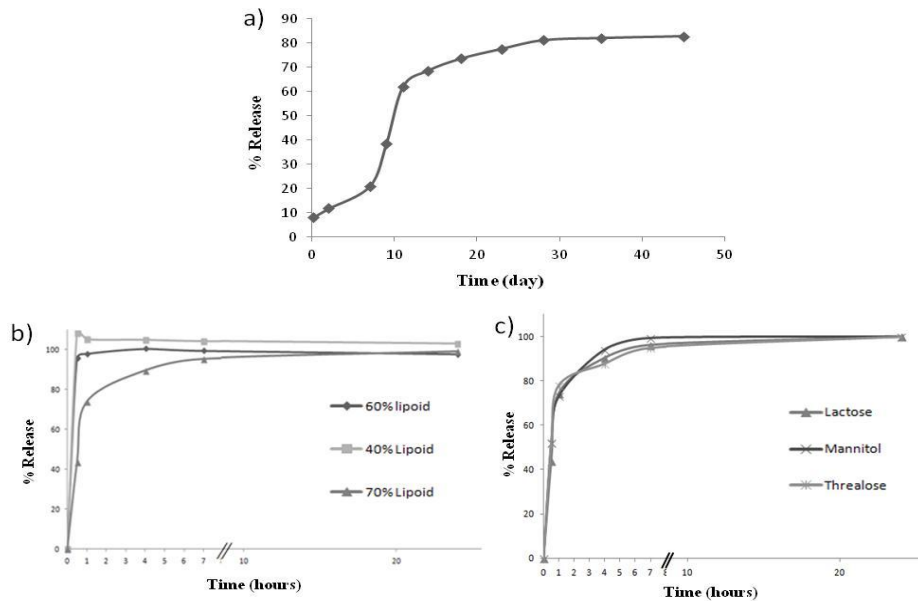


Figure 5. A) Release profile of dex from polymeric microparticles obtained from protocol 6. B) Release profiles of dex from lipid microparticles with different lipid proportions. C) Release profiles of dex from lipid microparticles obtained with different sugars. For the *in vitro* release studies, microspheres were incubated in PBS (pH 7.4) and maintained in a shaking incubator at 37 °C. At predetermined time intervals, supernatants were withdrawn and the media was replaced. The concentration of dex in the release medium was quantified by HPLC. Data correspond to the cumulative amount of drug released at the indicated time points, and are expressed as mean percentage of dex released relative to the total amount of dex in microspheres (n = 3).

3.4. Cell proliferation assay

3.4.1. Dex solutions

To establish the cytotoxic concentration of dex, a dose-response curve was performed by treating the cells with dex at 3, 10, 100 and 1,000 μM . In addition, cytotoxic time dependence was established by incubating for 1, 2 and 3 days. As depicted in Figure 6A, when 10 μM dex was used the viability was reduced by approximately 30% between days 1 and 3. However, after 3 days of incubation with 100 and 1,000 μM ,

approximately 50% of cell death was induced. In order to establish longer incubation periods, we used a concentration of dex at 10 μM since 50% of the cell death elicited by larger concentrations of dex could result in higher cytotoxic effects from longer exposure times.

Once 10 μM was set as the working concentration, cell proliferation assays were carried with longer exposition periods. A time-response correlation was established in such a way that after 7 days of incubation, the cell viability was reduced by 35% (Fig. 6B). Dex solution was administered daily in fresh medium during all the assays. These experiments were carried out in parallel with phenylarsine oxide (PAO) as a positive control of cell death. PAO induced a cell death of 65% from day 1, which reached 90% after 7 days of treatment. PAO treatments also were administrated daily (data no shown).

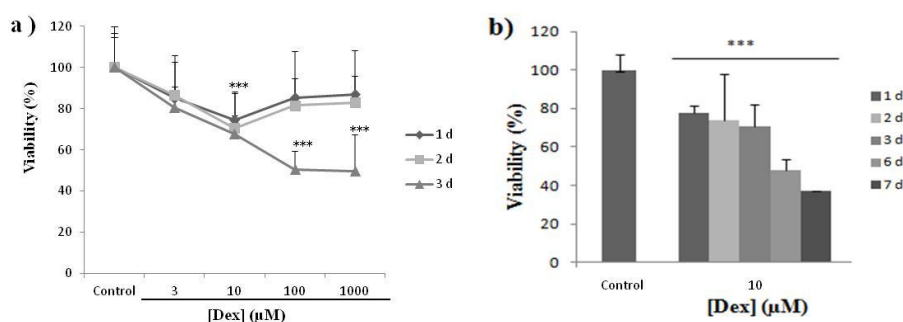


Figure 6. Concentration- and time-dependence curves of the cytotoxic effects of dex. A) Cytotoxic effect of increasing concentrations of dex, measured as percentage cell viability, in cells exposed for 1, 2 and 3 days to dex solution. B) Cytotoxic effect of 10 μM dex solution, measured as % cell viability, in cells exposed from 1 to 7 days. Data correspond to the means \pm S.E.M. of 6–12 wells for four different batches of cells. *** $P < 0.05$ with respect to control cell viability (ANOVA).

3.4.2. *In vivo* release of dex from polymeric microparticles

Polymeric microparticles were studied in terms of cell viability to determine if dex released from these systems has a similar effect as repeated dex solution administration. From the data of the *in vitro* release assay of dex from polymeric microparticles, a daily release rate of 2.89 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was established, which corresponds with the average rate of the release profile shown in Figure 5A. This value allowed us to calculate the amount of

microparticles required to reach a daily dex release of 10 μM from a single microparticle administration.

Because the length of dex release from the microparticles is longer than the maximum period of cell culture (6–7 days), direct incubation of microparticles in the cell culture medium only allowed us to evaluate the effect of dex released during the first 6–7 days. For this reason, microparticles with different degradation levels coming from a release test as described in the Methods section were added to the cell culture. Thanks to this strategy, proliferation assays were extended up to 26 days. To test the impact on cell viability of the unloaded polymeric microparticles, these microparticles were tested in parallel with loaded ones.

Unloaded polymeric microparticles (Fig. 7) were not cytotoxic for the time tested. However, loaded polymeric microparticles, after a single administration, afforded the same cytotoxic effect as dex solution administered every 48 h, during the entire assay period (26 days), showing statistically significant differences regarding with control effect from day 1 and with unloaded microparticle effects from day 3.

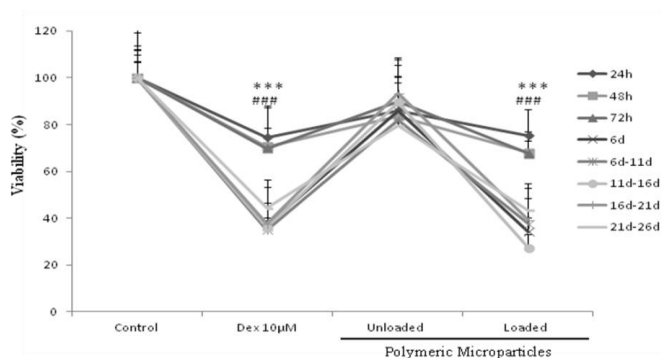


Figure 7. Cytotoxicity of a 10 μM dex solution, unloaded and loaded polymeric microparticles from 1–26 days. 10 μM of dex was significantly cytotoxic after 3 days of exposure. Unloaded polymeric microparticles were not cytotoxic for the time exposure period tested. Loaded polymeric microparticles were significantly cytotoxic from 3 to 26 days of the incubation period.

The morphology of the cells during the viability assay was observed (Fig. 8). No differences in cell morphology were detected between control cells (Fig. 8A) and those incubated with dex in solution (Fig. 8B), unloaded polymeric microparticles (Fig. 8C, left panel) and loaded polymeric microparticles (Fig. 8C, right panel). A clear

diminution of the number of cells was observed when compared to cells incubated with dex loaded microparticles and cells incubated with unloaded microparticles at all the release times tested (Figs. 8C-1 to 8C-4). In addition, as the release time progressed, the microparticles showed a higher opacity and a loss in shape, with these changes more evident for loaded microparticles after 26 days of treatment (Fig. 8C-4).

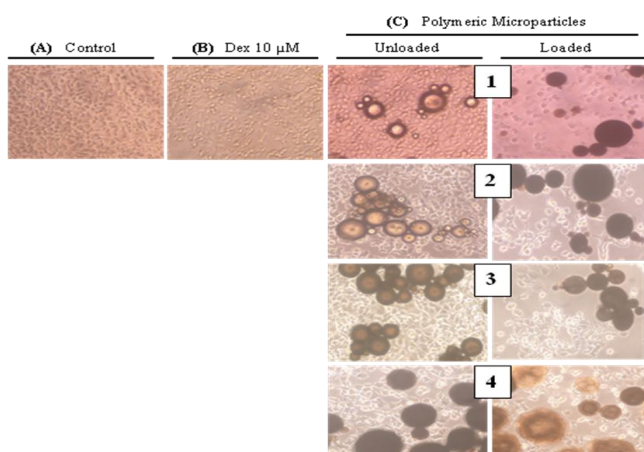


Figure 8. PC12 cell morphologies after polymeric microparticle treatment. (A) Microphotography of control cells, (B) Dex in solution for 1 day, (C) Unloaded polymeric microparticles (left panel) and loaded polymeric microparticles (right panel). Images from an optic microscope were taken after 6 days of culture with polymeric microparticles from different release times; 1 day (1), 6 days (2), 16 days (3) and 26 days (4).

3.4.2.1. Apoptosis assay

The effects of dex solution on apoptosis were studied for short periods of time (3–5 h) using 1 μ M staurosporine as a positive control. dex did not increase apoptosis control levels, but staurosporine resulted in 10% apoptosis. We tested the effects of dex and polymeric microparticles on apoptosis for longer exposure periods of 1–2 days (Fig. 9).

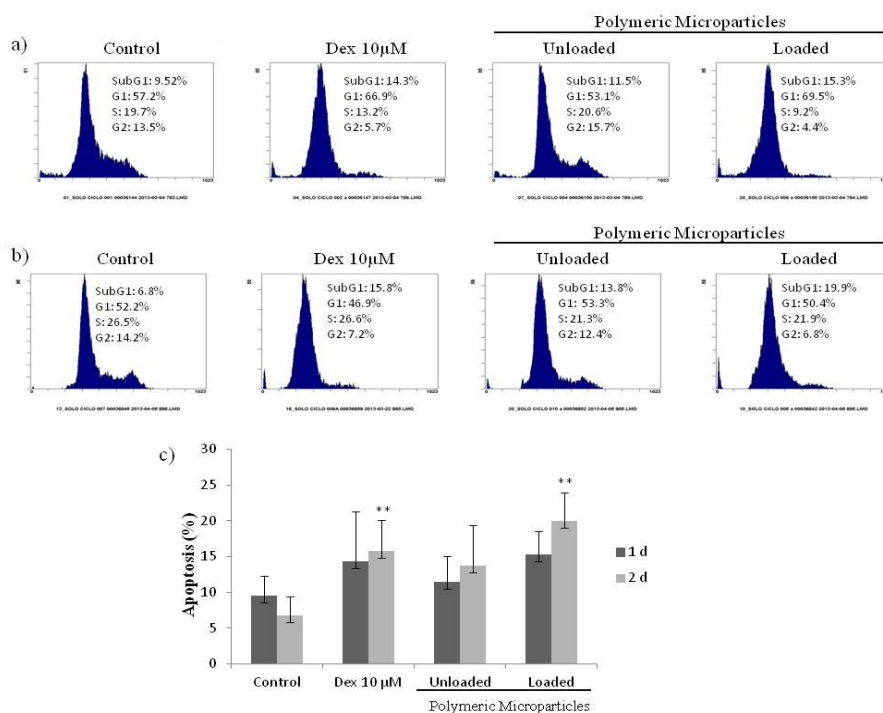


Figure 9. Determination of apoptosis under dex and polymeric microparticle treatments. A) and B) show flow cytometry records obtained from control cells (Control) and from cells incubated with 10 μ M dex solution and with unloaded and loaded microparticles for 1 day (a) and 2 days (b). C) Averaged pooled results of all of the experiments, expressing the apoptotic effects (ordinate) of dex. Cells were also incubated with a positive reference compound (i.e., 1 μ M staurosporine). Data are means \pm S.E.M. of six experiments from at least six different cultures. Within each experiment, the measurement was performed at least in duplicate. ** $p < 0.001$ with respect to control.

To evaluate the cytotoxic effects of dex in solution and polymeric microparticle FACS experiments, PI staining was performed. Dex in solution and polymeric microparticles were incubated for short periods of 2–5 h. However, there was no effect on cell cycle progression or cell cycle arrest (data not shown). Cells were also incubated for longer exposure periods of 1–2 days. FACS analysis showed that the cell cycle was stopped with almost the disappearance of the G2 phase in cells treated with dex in solution and dex microparticles, but not in those treated with unloaded microparticles (Figs. 9A–B). Dex solution and loaded polymeric microparticles induced apoptosis around 15.8 and 19.9%, respectively, after 2 days of incubation. However, unloaded polymeric

microparticles did not induce apoptosis during both times period tested (Fig. 9C). Again, 1 μM staurosporine was used as a positive control for apoptosis.

These results demonstrate the cytotoxic effect of dex (10 μM) in PC12 cells. Studied references used 1–5 μM concentrations of dex, showing a gene induction that led to an increase in calcium secretion and upregulation of catecholamine synthesis and storage proteins [15-17], but not in any cases described in the literature was apoptosis induced. However, this effect was significantly displayed after raising the dose to 10 μM after 24 h of treatment.

After dex solution and dex polymeric microparticle administration, cellular proliferation was inhibited, stopping the cellular cycle during the G2 phase. This was also described in references, where it was observed that glucocorticoid had the ability to stop the cell cycle in osteosarcoma cells, hepatoma, glioma, and breast tumour cells [3], and being able to trigger, as a consequence, cellular death. In a recent study carried out on human medullary thyroid cancer cell lines [3], the apoptotic effect of a 1 μM dex solution was demonstrated, however, it was related to a decrease in the transition of G1 to S phase. In contrast, dex induced cell cycle arrest at the G0/G1 phase using T-ALL cells [10].

3.4.3. *In vitro* release of dex from lipid microparticles

The cytotoxic effect of dex incorporated into lipid microparticles was compared to that produced by a 10 μM dex solution. As stated, lipid microparticles released *in vitro* 100% of microencapsulated dex within a day. Therefore, the data of microparticle drug loading were used to determine the amount of microparticles corresponding to 10 μM dex. This was the amount of lipid microparticles used, in a single administration, in a cell proliferation assay prolonged up to three days, whereas dex solution was added to the cell culture medium each 48 h.

As illustrated in Figure 10, the cytotoxicity of unloaded lipid microparticles could be discarded because the cell viability after treatment with the microparticles during the incubation time tested did not show statistically significant differences with respect to the control. In addition, dex incorporation into these lipid carriers did not affect their activity, resulting in similar cytotoxic effects as the dex solutions. Cellular death observed after 1 day of treatment both with dex solution and with loaded lipid microparticles was statistically significant with respect to control cells. In the same way,

cytotoxicity produced both by the dex solution and loaded lipid microparticles after 3 days of treatment also showed statistically significant differences with respect to unloaded microparticle treated cells (Fig. 10). Although the drug was released within a day, assays were carried out for 3 days, obtaining the same effects with a single administration of dex lipid microparticles as with dex solution administrated each for 48 h.

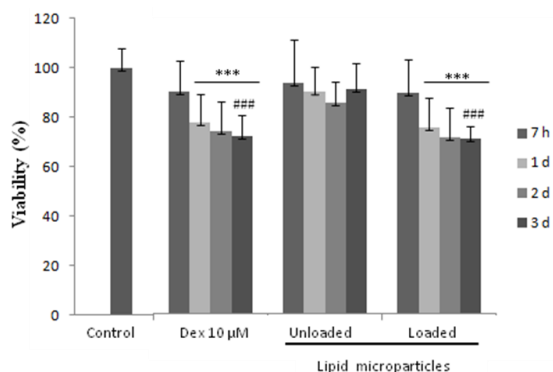


Figure 10. Time dependence of the cytotoxic effects of lipid microparticles. The figure shows the cytotoxic effect of the 10 µM dex solution, unloaded and loaded lipid microparticles, measured as % cell viability, in cells exposed for 7 hour and 1–3 days.

Cell morphology was observed through an optical microscope. Control cells showed the classical polygonal PC12 cell morphology. This morphology was also observed when cells were treated with dex solution. However, when cells were treated with lipid microparticles (unloaded and loaded), they lost their classical morphology (Fig. 11).

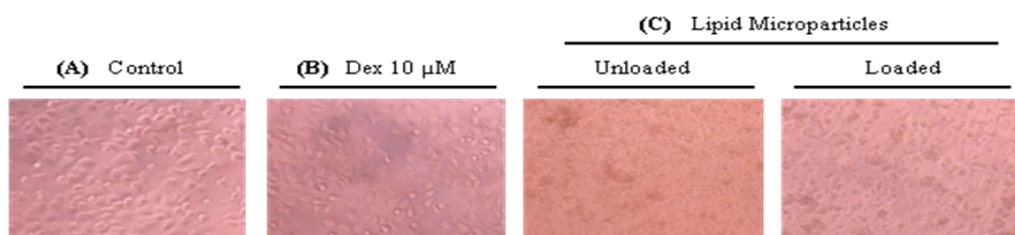


Figure 11. PC12 morphology after 3 days of incubation period with dex in solution, unloaded and loaded lipid microparticles.

This cell morphology alteration was believed to result from a physical interaction between lipid microparticles and cells. This interaction could be facilitated by the phospholipidic constituent of the lipid microparticles. To confirm this, the assay was

repeated using Transwell: a system that allowed us to separate cells and microparticles, but sharing the same medium and, therefore, allowing the dex released from to microparticles to affect cells. This assay was carried within 3 days of treatment, observing that cells did not show any morphological alteration after that time period. At the same time, cell viability results did not show differences with those shown in Figure 10, suggesting that cytotoxicity was not caused directly by the physical interaction.

3.4.3.1. Apoptosis assay

As described in Figure 9, 48 h was established as the optimal time to study apoptosis induction by dex solution or loaded polymeric microparticles. For this reason, we used the same incubation time for lipid microparticle analyses. Typical FACS analyses are shown in Figure 12A, for the control, 10 μ M dex solution, unloaded lipid microparticles and loaded lipid microparticles, respectively. Notice that unloaded lipid microparticles did not increase apoptosis. However, cells treated with dex solution and loaded lipid microparticles, resulted in almost the disappearance of the G2 phase. The most interesting finding was that the apoptosis induced by dex lipid microparticles was around of 7.7% higher (with statistical significance) than that obtained with Dex solution (Fig. 12B). These results could be due to phospholipid release from lipid microparticles, which could modify cell membrane permeability, thus, facilitating dex internalisation into the cell. Mitochondrial alterations have been related to GC apoptosis, although the mechanism is not yet clarified. Dex induces changes in mitochondrial membrane properties that together with the reduced expression of mitochondrial transporters of substrates and proteins may lead to repression of mitochondrial respiratory activity and lower ATP levels that contribute to GC-induced apoptosis [10].

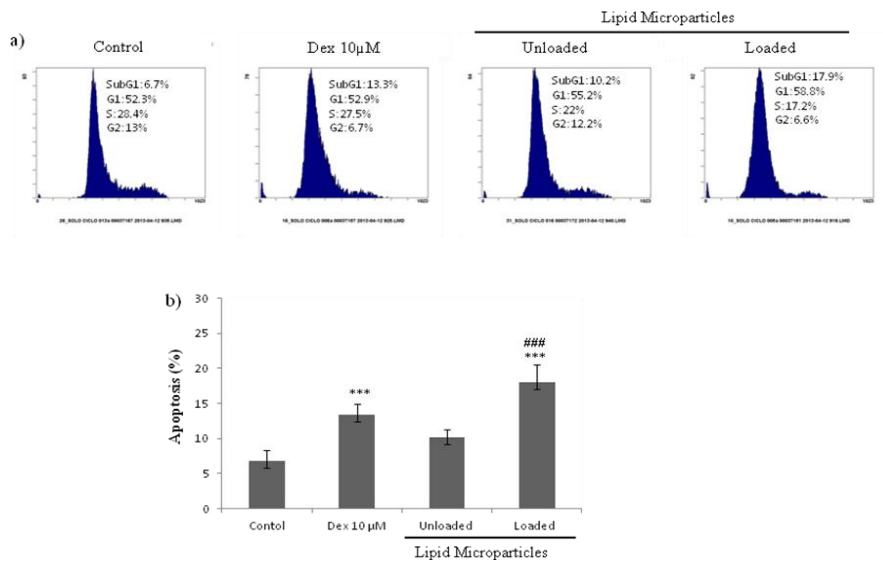


Figure 12. Micromolar concentrations of dex induce apoptosis of PC12 cells. A) Flow cytometry records obtained from control cells, cells treated with 10 µM dex solution and cells treated with unloaded and loaded lipid microparticles after 2 days of incubation. B) Averaged pooled results of all of the experiments, showing the apoptotic effects (ordinate) of 10 µM dex solution, unloaded lipid microparticles and loaded lipid microparticles.

These last results inspired us to evaluate the effect of dex lipid microparticles on PC3 cells. In previous studies, PC3 cells were GC resistant, meaning that no cytotoxic effect was detected when PC3 cell cultures were incubated with different concentrations of dex solution. As depicted in Figure 13, loaded lipid microparticles induced statistically significant cytotoxicity in these cells, whereas with dex solution and unloaded lipid microparticles did not produce a significant effect after 48 h of incubation. This is an important result requiring further investigation. The mechanisms that underlie the development of GC resistance are complex and poorly understood. Data currently available suggest that there is not a main mechanism responsible for GC resistance, but several that act either alone or in combination. For example, GC resistance may occur if inactive GCR isoforms are present in the vast majority, if members of the ABC-transporter family are overexpressed or if the apoptotic pathways are inhibited. An increasing number of reports indicate that activation of the mammalian target of the rapamycin (mTOR) signalling pathway may contribute to GC resistance in haematological malignancies, and so the selective mTOR inhibitor rapamycin capability

to re-sensibilise the resistant cells to dex treatment has been evaluated [13]. They are potential targets of pharmacological actions that could lead to important clinical benefits.

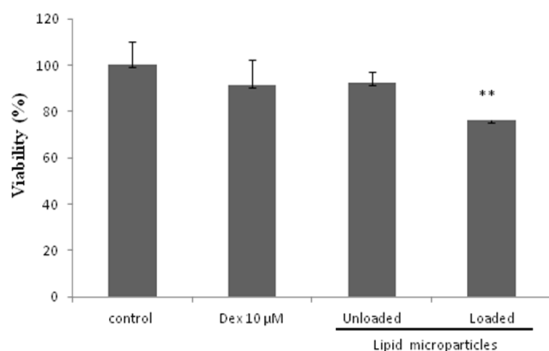


Figure 13. Cytotoxic effects of lipid microparticles in PC3 cells. The figure shows the cytotoxic effects of dex solution (10 µM), unloaded lipid microparticles and loaded lipid microparticles after 48 h of assay. The measure is as % cell viability.

Conclusion

Two dex controlled-release systems were developed using different types of carriers: a synthetic lactic-glycolic copolymer was used to develop polymeric microparticles, and egg phospholipids with 80% phosphatidylcholine were used to obtain lipid microparticles. Optimisation of the microencapsulation procedures was carried out in both cases to achieve an optimal size for parenteral administration, high encapsulation efficiency and, therefore, high drug loading of the systems. Moreover, incompatibilities between drug and excipients were discarded in the optimised formulations.

The *in vitro* release kinetics of dex from polymeric microparticles showed an efficient dex release control, allowing a prolonged release for more than one month without showing a significant burst effect. Unloaded polymeric microparticles were not cytotoxic to PC12 cells, but after a single administration of loaded microparticles, the cellular death rate for 26 days was similar to that obtained with the dex solution administered for 48 h. Dex solution and loaded polymeric microparticles induced apoptosis around 15.8% and 19.9%, respectively, after 2 days of incubation; and cell cycle arrest at G2 phase was detected. These results allow us to propose loaded polymeric microparticles as an alternative to the current dex administration systems in combined chemotherapy. Indeed, the last clinical trial, published in “The Lancet

Oncology” [5,6] on the efficacy of pomalidomide plus low dose of dex versus high dose of dex in patients with refractory multiple myeloma showed the importance of a good control of dex plasmatic levels to optimise the efficacy of the treatments with this GC. Loaded polymeric microparticles developed in this work would provide prolonged drug plasmatic levels avoiding the pharmacokinetic peak trough fluctuations characteristic of conventional formulations, improving treatment effectiveness, decreasing GC side effects and improving patient compliance.

With respect to lipid microparticles, dex release was faster, reaching 100% of drug released within 24 h. Dex lipid microparticles showed comparable results in terms of proliferation inhibition of PC12 cells to dex solution administered every 48 h in assays up to 3 days; however, there was a statistically significant increase in apoptosis induction compared with the dex solution. This effect could be due to the phospholipids released from the lipid microparticles, which could modify cell membrane permeability, thus, facilitating dex internalization into the cell. This hypothesis is supported by the results obtained on GC resistant PC3 cells, where dex lipid microparticles showed significant antiproliferative effects in contrast to the dex solution. These results allow us to propose these dex lipid microparticles as a possible tool to revert GC resistance.

Acknowledgments

We want to thank the Counseling of Education of the Community of Madrid and the European Social Fund through the Regional Plan of Scientific Research and Technological Innovation. This work was partially funded by the Research Group GR35/10 Santander-UCM, Group: Parenteral administration of drugs. We also thank the UCM Microscopy Research Support Centre for the valuable technical and professional assistance. AJMO is granted by Ministry of Economy and Competitiveness by the FPU Program (Ref. AP2009/0343).

References

- [1] L. Gu, C. Zhou, H. Liu, J. Gao, Q. Li, D. Mu, Z. Ma, Rapamycin sensitizes T-ALL cells to dexamethasone-induced apoptosis, *J. Exp. Clin. Canc. Res.* 29 (2010) 150-159.
- [2] D. Hong, H.X. Chen, H.Q. Yu, C. Wang, H.T. Deng, Q.Q. Lian, R.S. Ge, Quantitative proteomic analysis of dexamethasone-induced effects on osteoblast

differentiation, proliferation, and apoptosis in MC3T3-E1 cells using SILAC, *Osteoporos. Int.* 22 (2011) 2175–2186.

[3] Y.J. Chung, J.I. Lee, S. Chong, J.W. Seok, S.J. Park, H.W. Jang et al, Anti-proliferative effect and action mechanism of dexamethasone in human medullary thyroid cancer cell line, *Endocr. Res.* 36(4) (2011) 149-157.

[4] M. Wang, Y. Jin, Y.X. Yang, C.Y. Zhao, H.Y. Yang, X.F. Xu et al, In vitro biodistribution, anti-inflammatory, and hepatoprotective effects of liver targeting dexamethasone acetate loaded nanostructured lipid carrier system, *Int. J. Nanomedicine.* 5 (2010) 487-497.

[5] J. San Miguel, K. Weisel, P. Moreau, M. Lacy, K. Song, M. Delforge et al, Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial, *Lancet Oncol.* 14(11) (2013) 1055–1066.

[6] V. Rajkuma, S. Jacobus, N.S. Callander, R. Fonseca, D.H. Vesole, M.E. Williams et al, Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial, *Lancet Oncol.* 11(1) (2010) 29–37.

[7] S.C. Higgins, G.J. Pilkington, The in vitro effects of tricyclic drugs and dexamethasone on cellular respiration of malignant glioma, *Anticancer Res.* 30 (2010) 391-398.

[8] J.A. Polman, J.E. Welten, D.S. Bosch, R.T. Jonge, J. Balog, S.M. Van Der Maarel, E.R. Kloet, N.A. Datson, A genome-wide signature of glucocorticoid receptor binding in neuronal PC12 cells, *Neuroscience* 13 (2012) 118-135.

[9] M. Carlet, K. Janjetovic, J. Rainer, S. Schmidt, R. Panzer-Grümayer, G. Mann, M. Prelog, B. Meister, C. Ploner, R. Kofler, Expression, regulation and function of phosphofructo-kinase/fructose-biphosphatases (PFKFBs) in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells, *BMC Cancer.* 10 (2010) 638-649.

[10] K. Eberhart, J. Rainer, D. Bindreither, I. Ritter, E. Gnaiger, R. Kofler, P.J. Oefner, K. Renner, Glucocorticoid-induced alterations in mitochondrial membrane properties

and respiration in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Biochim. Biophys. Acta.* 1807 (2011) 719–725.

[11] U. Nuutinena, A. Ropponena, S. Suorantaa, J. Eeva, M. Erayb, R. Pellinenc, J. Wahlforsd, J. Pelkonen. Dexamethasone-induced apoptosis and up-regulation of Bim is dependent on glycogen synthase kinase-3, *Leukemia Res.* 33 (2009) 1714–1717.

[12] J. Dobos, I. Kenessey, J. Tímár, A. Ladányi, Glucocorticoid Receptor Expression and Antiproliferative Effect of Dexamethasone on Human Melanoma Cells, *Pathol. Oncol. Res.* 17 (2011) 729–734

[13] D.J Anderson, A.M Michelson, Role of glucocorticoids in the chromaffin-neuron developmental decision, *Int. J. Dev. Neurosci.* 12 (1989) 83–94.

[14] S.N. Ebert, S.L. Balt, J.P.B. Hunter, A. Gashler, V. Sukhatme, D.L. Wong, Egr-1 activation of rat adrenal phenylethanolamine N-methyltransferase gene, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 20885–20898.

[15] A.S. Tischler, R.L. Perlman, G.M. Morse, E. Beth, Glucocorticoids Increase Catecholamine Synthesis and Storage in PC 12 Pheochromocytoma Cell Cultures, *J. Neurochem.* 40(2) (1983) 364–370.

[16] K.T Kim, D.H Park, T.H. Joh, Parallel up-regulation of catecholamine biosynthetic enzymes by dexamethasone in PC12 cells, *J. Neurochem* 60 (1993) 946-951.

[17] D.J. Rozansky, H. Wu, K. Tang, R.J. Parmer, D.T. O'Connor, Glucocorticoid activation of chromogranin A gene expression. Identification and characterization of a novel glucocorticoid response element, *J. Clin. Invest* 94 (1994) 2357-2368.

[18] A. Elhamdani, M.E. Brown, C.R. Artalejo, H.C. Palfrey, Enhancement of the Dense-Core Vesicle Secretory Cycle by Clucocorticoid Differentiation of PC12 Cells: Characteristics of Rapid Exocytosis and Endocytosis. *J. Neurosci.* 20(7) (2000) 2495-2503.

[19] K.N. Green, S.C. Taylor, I.F. Smith, C. Peers, Differential coupling of voltage-gated Ca²⁺ channels to catecholamine from separate PC12 cell batches, *Neurosci. Lett.* 301 (2001) 13-16.

- [20] S. Van Der Laan, R.A. Sarabdjitsingh, M.S. Van Batenburg, S.B. Lachize, H. Li, T.F. Dijkmans, E. Vreugdenhil, E. Ron de Kloet, O.C. Meijer. Chromatin immunoprecipitation scanning identifies glucocorticoid receptor binding regions in the proximal promoter of a ubiquitously expressed glucocorticoid target gene in brain, *J. of Neurochem.* 106 (2008) 2515-2523.
- [21] S.J. Kim, S.K. Hahn, M.J. Kim, D.H. Kim, Y.P. Lee, Development of a novel sustained release formulation of recombinant human growth hormone using sodium hyaluronate microparticles, *J. Control. Release.* 104 (2005) 323–335.
- [22] M.K. Yeh, J.L. Chen, C.H. Chiang, Z.Y. Chang, The preparation of sustained release erythropoietin microparticle, *J. Microencapsul.* 24(1) (2007) 82-93.
- [23] C. Gómez-Gaete, N. Tsapis, L. Silva, C. Bourgaux, M. Besnard, A. Bochot, E. Fattal, Supramolecular organization and release properties of phospholipid-hyaluronan microparticles encapsulating dexamethasone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 116–126.
- [24] C. Gómez-Gaete, N. Tsapis, L. Silva, C. Bourgaux, M. Besnard, A. Bochot, E. Fattal, Morphology, structure and supramolecular organization of hybrid 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine–hyaluronic acid microparticles prepared by spray drying. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34 (2008) 12–21.
- [25] S. Jaraswekin, S. Prakongpan, R. Bodmeier, Effect of poly(lactide-co-glycolide) molecular weight on the release of dexamethasone sodium phosphate from microparticles, *J. Microencapsul.* 24(2) (2007) 117-128.
- [26] C. Le Visage, F. Quaglia, M. Dreux, S. Ounnar, P. Breton, N. Bru, P. Couvreur, E. Fattal, Novel microparticulate system made of poly(methylidene malonate 2.1.2), *Biomaterials.* 22 (2001) 2229-2238.
- [27] A.J. Thote, J.T. Chappell, R.B. Gupta, Reduction in the initial-burst release by surface crosslinking of PLGA microparticles containing hydrophilic or hydrophobic drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1 (2005) 43-57.
- [28] N. Butoescu, O. Jordan, P. Burdet, P. Stadelmann, A. Petri-Fink, H. Hofmann, E. Doelker, Dexamethasone-containing biodegradable superparamagnetic microparticles

for intra-articular administration: Physicochemical and magnetic properties, in vitro and in vivo drug release, *Eu. J. Pharm. Biopharm.* 72 (2009) 529-538

[29] N. Diaz-Prieto, I. Herrera-Peco, A.M. de Diego, A. Ruiz-Nuno, S. Gallego-Sandin, M.G. Lopez, A.G. Garcia, M.F. Cano-Abad, Bcl-2 mitigates Ca²⁺ entry and mitochondrial Ca²⁺ overload through downregulation of L-type Ca²⁺ channels in PC12 cells, *Cell Calcium* 44 (2008) 339–352.

[30] J.L. Chen, C.H. Chiang and M.K. Yeh, The mechanism of surface-indented protein-loaded PLGA microparticle formation: the effects of salt (NaCl) on the solidification process. *J. Microencapsul.* 21(8) (2004) 877-888.

[31] S.W. Cho, S.I. Song, Y.W. Choi, Effects of solvent selection and fabrication method on the characteristics of biodegradable Poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing ovalbumin, *Arch. Pharm Res.* 23(4) (2000) 385-390

[32] H.K. Kim, T.G. Park, Microencapsulation of Human Growth Hormone within Biodegradable Polyester Microspheres: protein aggregation stability and incomplete release mechanism. *Biotechnol. Bioeng.* 65(6) (1999) 659-666.

[33] C. Le Visage, F. Quaglia, M. Dreux, S. Ounnar, P. Breton, N. Bru, P. Couvreur, E. Fattal, Novel microparticulate system made of poly(methylidene malonate 2.1.2), *Biomaterials.* 22 (2001) 2229-2238.

DEVELOPMENT OF OVALBUMIN MICROPARTICLES AND EVALUATION OF
THEIR EFFECT ON CELLULAR PROLIFERATION

Martín Sabroso, C⁽¹⁾; Cano-Abad, M.F^(3,4,5); Torres-Suárez, A.I^{*(1)(2)}.

(1) Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,
Complutense University of Madrid, Spain.

(2) Institute of Industrial Pharmacy. Complutense University of Madrid, Spain.

(3) Clinical Pharmacology, Health Research Institute, La Princesa University Hospital,
Madrid, Spain.

(4) Teófilo Hernando Institute, Madrid, Spain.

(5) Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, Autonomous
University of Madrid, Spain.

* Corresponding author. Tel.: +34 913941735; Fax: +34 913941736.

E-mail: galaaaa@farm.ucm.es . Address: Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-2040
Madrid, Spain

Enviado a European Journal of Pharmaceutical Science

(Factor de impacto 3.212)

Abstract

Poly (d,l-lactic-co-glycolic) acid (PLGA) has been widely studied to develop controlled release systems for proteins, and water-in oil-in water (W/O/W) solvent evaporation technique have been commonly used. But this technique presents three important limitations to microencapsulate proteins: the low loading capacity; the burst effect during release; and the protein inactivation during microencapsulation, mainly by denaturalization and formation of aggregates. The aim of this work was to analyze different strategies of formulation to optimize the loading of microparticles of OVA and the further release of the protein from the microparticles.

The incorporation of NaCl in the external aqueous phase increased drug loading, but the increase of PVA concentration slightly decreased drug loading and increased particle aggregation. Drug loading also decreased then more hydrophilic or lower molecular weight polymers were used. Importantly, PEG improved protein loading in PLGA microparticles but only when it was added both in the internal aqueous phase as in the organic phase; and the higher protein loading values were obtained with 0.5% PVA as internal aqueous phase. These microparticles *in vitro* released the protein in a sustained way over a period of 130 days. The effect of the microencapsulation process on the stability of microencapsulated OVA was also determined by quantifying the effect of the protein released from microparticles on cell proliferation using PC12 cells. This assay demonstrated that the microencapsulation procedure optimized in this work did not affect the biological stability of the microencapsulated protein.

Keywords

Protein, ovalbumin, microparticles, cellular proliferation

1. Introduction

A large variety of protein drugs such as hormones, growth factors and vaccines with interesting pharmacological activities have been developed but their incorporation into therapeutic find the difficulty of their low oral bioavalilability and their short half-lives, as consequence of the action of plasmatic and tissular proteases, that make necessary repeated injections for parenteral route. An interesting approach aimed to reduce the number of injections in these biological therapies consists of microencapsulate the proteins using biodegradable polymers. These microparticles allow a slow protein release while degradates (Yeh et al 2007), and more important, provide protection for the proteins against proteases in the administration site.

Poly (d,l-lactic-co-glycolic) acid (PLGA) has been widely studied to develop controlled release systems for proteins and vaccines, and water-in oil-in water (W/O/W) solvent evaporation technique have been commonly used to entrap protein into PLGA microparticles (Bodmeier et al 1992). In this process, originally developed by Vranken and Claeys and modified by Ogawa et al (1988), the drug is dissolved in an inner aqueous phase, which is emulsified in the organic phase containing the polymer dissolved in an organic solvent, usually dichloromethane (DCM). This primary W/O emulsion is subsequently emulsified in an external aqueous phase containing an emulsifier such as poly (vinyl alcohol) (PVA). Polymer precipitation and as consequence microparticles formation are induced due to solvent removal from the organic phase by extraction towards the external aqueous phase and by evaporation. This technique presents three important limitations to microencapsulate proteins: the low loading capacity; the burst effect during release; and protein inactivation during microencapsulation and release, mainly by denaturalization and formation of aggregates.

The stage of formation of the primary W/O emulsion is considered the principal cause of denaturalization and formation of aggregates (Morlock et al 1997), due to both the contact of the proteins with the organic solvent, favored by the dispersion of the small droplets of the aqueous phase into the organic phase, as the mechanical agitation (Chen et al 2004). On the other hand, during proteins release from microparticles, the hydrophobic PLGA prevents water penetration into the core of microspheres, thus forming an acidic microenvironment due to the accumulation of breakdown products of

the polymer, which favors protein degradation (Dorati et al 2008). Some substances as sugars, salts or amino acids have been used to increase proteins stability.

Another problem of the microencapsulation of proteins is the low loading and the burst initial release. During microencapsulation process, the partition of hydrophilic proteins from the internal phase to the external aqueous continuous phase, leads to a reduction of the entrapment of proteins into the microparticles (usually less than 10% w/w) (Ogawa et al 1988, Chen et al 2002) and to an increase of their burst initial release. Beside, the release of the proteins from microparticles is commonly low and non-uniform. To solve these problems, different excipients have been incorporated during microencapsulation process, as poly (ethylene glycol) (PEG) and sodium chloride (NaCl) (Morlock et al 1997, Van de Weert et al 2000). These both excipients also improve proteins stability.

The aim of this work was to analyze different strategies to improve the loading, the release kinetic and the stability of microencapsulated proteins obtained by the water-in-oil-in-water (W/O/W) solvent evaporation technique, using PLGA as biodegradable polymer.

Albumin from chicken egg (OVA) was used as protein model, because of its good water solubility, its high molecular weight and its thermal stability (Dorati et al 2005). Plasmatic proteins such as albumin are the main energy and nutrition source for tumour growth. Albumin transport from the blood to the tumour interstitium is mediated by the 60 kDa glycoprotein, gp60, also known as albondin, which is located on the endothelial cell surface and seems responsible for the transcytosis of albumin by easing its binding to caveolin, forming caveolae that transport the protein to the interstitial space. This selective location of albumin at tumour mass level has been used in the last year to develop different drug-albumin complex to target antitumor drugs. Once in the tumour interstitium, the drug-albumin complex is bound to SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), and is quickly internalized into tumour cells. This protein is overexpressed in various tumour types such as breast, prostate, oesophagus, gastric, colorectal, liver, lung, kidney, skin melanoma, bladder, head and neck, thyroid and several brain tumours, and is associated with metastasis and poor prognosis. Increased SPARC expression is correlated with higher response to albumin-bound drugs.

In this work, microparticles loaded of OVA were developed and characterized in terms of particle size, surface morphology, protein entrapment efficiency and release properties. In addition, to determine the effect of the microencapsulation procedure on the stability of the protein, the activity of the microencapsulated OVA on the proliferation of PC12 cells was evaluated.

2. Material and methods

2.1. Material

Albumin from chicken egg grade V and polyvinyl alcohol (PVA, Mw=30,000–70,000) was obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), Poly (d,l-lactic-coglycolic acid) (PLGA) with a ratio of 50:50 (Resomer RG504, RG504H, RG502) and with a ratio of 75:25 (Resomer RG756S) were purchased from Boehringer Ingelheim (Barcelona, Spain). Dichloromethane (HPLC grade), acetone, hydrochloric acid, sodium hydroxide, potassium dihydrogen phosphate, disodium hydrogen phosphate dehydrate, sodium chloride, poly (ethylene glycol) 400 and poly (ethylene glycol) 4000 were provided by Panreac (Barcelona, Spain). Distilled demineralised Milli-Q® water (Millipore, Madrid, Spain) was used.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of OVA microparticles.

The microparticles were prepared by the water-in oil-in water (W/O/W) solvent evaporation technique, from a procedure described by Chen et al (2002). Briefly, to obtain the primary emulsion, 1 ml of OVA aqueous solution (30 mg/ml) was added to 5 ml of dichloromethane (DCM) containing 300 mg PLGA. Then, it was homogenized (8000 rpm for 2 min). The resulting emulsion was then mixed at 1000 rpm with 30 ml of continuous phase solution containing 5% w/v polyvinyl alcohol (PVA) as emulsion stabilizer. The resulting w/o/w multiple emulsion was stirred with a magnetic stirrer for 18 h at room temperature to extract DCM. Microparticles were separated by centrifugation (2000 rpm for 5 min), and were resuspended in distilled water to remove PVA. This process was repeated three times. Finally the microparticles were freeze-dried for 12 h at - 60 °C, 200 mT (Flexi-Dry MP, FTS® Systems, NY, USA) and were stored at 4 °C.

From this initial procedure, the variations reflect in table 1 was done.

Batch	Polymer	Organic phase solvent	External aqueous phase	Inner aqueous phase
1	RG504	DCM	2% PVA	1 ml Water
2	RG504	DCM	2% PVA 5% NaCl	1 ml Water
3	RG504H	DCM	2% PVA 5% NaCl	1 ml Water
4	RG502	DCM	2% PVA 5% NaCl	1 ml Water
5	RG756S	DCM	2% PVA 5% NaCl	1 ml Water
6	RG504	DCM	5% PVA 5% NaCl	1 ml Water
7	RG504	Ethyl acetate	2% PVA 5% NaCl	1 ml Water
8	RG504	DCM	2% PVA 5% NaCl	1 ml PBS pH 7.4
9	RG504	DCM	2% PVA 5% NaCl	1 ml Water 0.5% PVA
10	RG504	DCM	2% PVA 5% NaCl	1 ml Water + 500 μ l PEG 400
11	RG504	DCM	2% PVA 5% NaCl	1 ml Water + 100 mg PEG 4000
12	RG504	DCM + 100 mg PEG 4000	2% PVA 5% NaCl	1 ml Water
13	RG504	DCM + 100 mg PEG 4000	2% PVA 5% NaCl	1 ml Water + 500 μ l PEG 400

Table 1. Experimental conditions evaluated in the optimization of the elaboration procedure of OVA polymeric microparticles.

The yield of the process was calculated for all of the microparticles batches by dividing the mass of the microparticles collected by the initial mass of polymer and OVA in the formulation.

2.2.2. Characterization of the microparticles

2.2.2.1. Morphology and shape

The surface and shape of the microparticles were examined by scanning electron microscopy (SEM) (Jeol-JSM-6400 Electron Microscope Tokyo, Japan). For SEM examination the samples were placed onto aluminium stubs with a carbon tape and they were coated with gold under vacuum (Emitech K550X, Eitech Ltd, UK).

2.2.2.2. Size

The particles size was measured by laser diffraction (Microtrac® SRA 150 Particle Size Analyser, Leeds & Northrup Instruments, Ireland). Volume diameter distribution was obtained and mean particle size, expressed as volume mean diameter, and standard deviation were determined. Each sample was run in triplicate.

2.2.2.3. Drug loading and encapsulation efficiency

The content of encapsulated OVA was determined using a bicinchoninic acid (BCA) protein determination assay. 3 ml of 0.1 N sodium hydroxide (NaOH) were added on 20 mg of microparticles in a thermostated bath at 37 °C in order to dissolve the microparticles. After overnight 1 ml of 0.3N hydrochloric acid (HCl) was added to neutralize the solution. The solution was centrifuged (10,000 rpm for 15 min) and the supernatant was analyzed by spectrophotometry at 562 nm to determine the OVA concentration. The protein content was determined from a standard curve of known concentrations of OVA over the range 25–250 µg/ml ($r = 0.998$) contained in an equal volume of 0.1N NaOH and 0.3N HCl. All measurements were conducted in triplicate.

The OVA content in the microparticles was expressed as mg of OVA in 100 mg of microparticle. The entrapment efficiency was calculated using Eq. (1).

$$EE(\%) = \frac{\text{actual OVA:Polymer ratio}}{\text{initial OVA:Polymer ratio}} \cdot 100 \quad (1)$$

2.2.2.4. *In vitro* release assay

20 mg of microparticles was suspended in 5ml of 0.01M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, in closed vials and immersed in a thermostatic shaking water bath (Clifton® NE5-28, United Kingdom) at 37 °C with continuous agitation (50 strokes/min). At specific time intervals, 4 mL of the supernatant were withdrawn and fresh medium was added. Sink conditions were maintained during the entire assay.

The supernatant was analyzed for protein content using the microBCA protein assay. The amount of OVA released was determined using a calibration curve constructed over the range of 0.5–20 µg/ml ($r=0.996$). Release profiles were expressed in terms of the cumulative OVA released at the different incubation time.

Concurrently the polymer degradation during the release assay was observed by SEM.

2.2.2.5. Cell proliferation assay

The assay was performed using PC12 cells, which were maintained as a monolayer in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 7.5% fetal bovine serum, 7.5 % horse serum, 1 % L-glutamine and 0.1 % penicillin-streptomycin. Cells were incubated at 37 ° C in a humidified chamber in an atmosphere containing 5 % CO₂ (Diaz-Prieto et al 2008).

To evaluate the effect of OVA on cell proliferation, cells were seeded in 48-well plates and treated with OVA 34.19 µg/ml during 1, 2 and 3 days. Later the effect of unloaded and OVA loaded microparticles on cell proliferation were also evaluated

To assess mitochondrial function of cells, bromide (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl) (MTT) reagent was added to each well for 1 h at 37°C, and formazan crystals were formed; then, dimethylsulfoxide (DMSO) was added to dissolve the crystals. After resuspending the content of the wells, optical density (OD) was read using an Elisa reader at 550 nm (Berthold Detection Systems, Sirius). Phenylarsine oxide (PAO) 10 µM, was used as positive control of cell death.

Cell viability, expressed in percentage of control, was calculated with the following equation: viability = (OD test/OD control) x100. Each result described is based on 6 different determinations.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of OVA microparticles.

Using the initial microencapsulation procedure (batch 1), OVA microparticles with a mean diameter of 55.9±19.12 µm were obtained which is adequate for parenteral administration; but the process yield was lower than 50% and the amount of protein microencapsulate was lower than the quantification limit of the analytical method. From this initial microencapsulation procedure different modifications were made in order to improve microencapsulation yield and the characteristics of the microparticles obtained. The values of microencapsulation yield for all the microcapsules batches elaborated are

represented in figure 1; the values of microparticle size are depicted in figure 2; and the values of protein loading and encapsulation efficiency are stated in table 2.

3.1.1. Effect of the incorporation of sodium chloride (NaCl) in the external aqueous phase

The first variable studied was the effect of the incorporation of NaCl in the external aqueous phase during microparticles preparation (batch 2). When 5% (w/v) of NaCl was added (batch 2) no significant change in microparticles mean diameter and size distribution were detected, and spherical microparticles with smooth surfaces were observed by scanning electron microscopy. However, a highly significant increase in the process yield and in the encapsulation efficiency was observed, in such a way that the OVA loading was of 37.13 μg OVA/mg microparticles. These results are according to the literature (Dorati et al 2005, 2008, Chen et al 2002, Jiang et al 2002, Uchida et al 1995) where it is noticed that the incorporation of NaCl to the aqueous phase leads to an increase in the osmotic pressure that prevents protein diffusion to this external aqueous phase and as consequence the encapsulation efficiency and the protein loading are increased. According to Chen et al (2002), the microstructure of microparticles prepared using NaCl was very dense and compact independently to the physical-chemical properties of the polymer used. This structural characteristic limits the permeations of protein molecules across the polymeric chains during the solidification process (Dorati et al 2008).

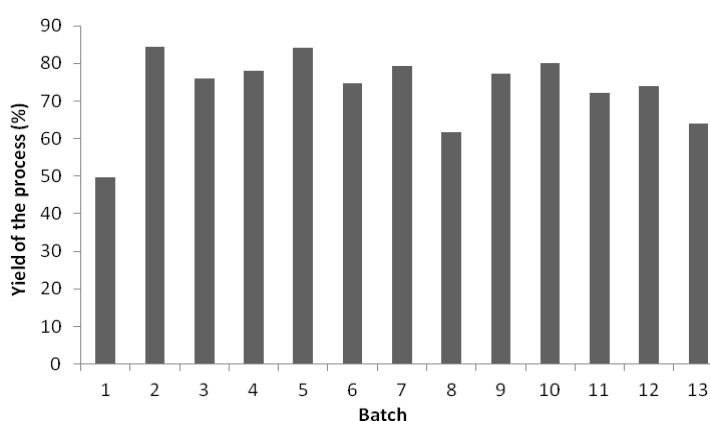


Figure 1. Yield of the different microencapsulation processes.

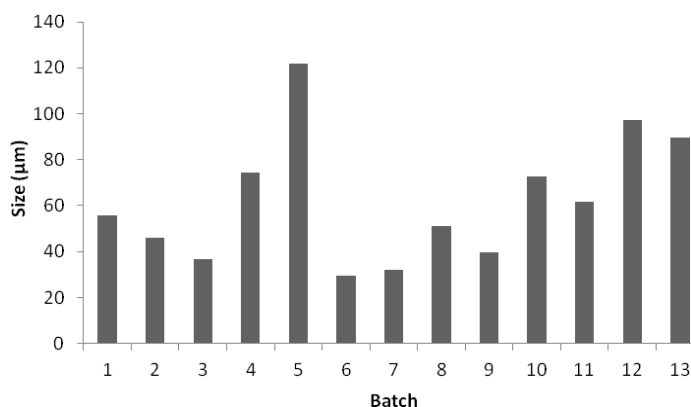


Figure 2. Average particle size, expressed as volume mean diameter (vmd) in μm

	Drug loading ($\mu\text{g OVA}/\text{mg Mp}$)	Encapsulation efficiency (%)
Batch 1	<3	<3
Batch 2	37.13	34.27
Batch 3	3.92	3.94
Batch 4	<3	<3
Batch 5	<3	<3
Batch 6	33.13	32.27
Batch 7	<3	<3
Batch 8	<3	<3
Batch 9	59.3	63.03
Batch 10	30.74	31.72
Batch 11	24.09	24.68
Batch 12	<3	<3
Batch 13	55.94	59.26

Table 2. Encapsulation efficiency obtained in the different batches produced.

3.1.2. Effect of the polymer

From protocol 2, the effect of the molecular weight and polarity of the polymer were analyzed. Batches 2, 3, 4 and 5 were prepared always using a poly lactide-co-glycolide copolymer but with different characteristics as it are reflected in table 3.

Polymer	Composition	Molecular Weight Range	Viscosity (dl/g)	Tg (°C)	End group
RG502	Poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50	7,000 - 17,000	0.16-0.24	42-46	alkyl ester
RG504	Poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50	38,000 – 54,000	0.45-0.60	46-50	ester
RG504H	Poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50	38,000 – 54,000	0.45-0.60	46-50	free carboxylic acid
RG756S	Poly(D,L-lactide-co-glycolide) 85:15	190,000 – 240,000	1.3-1.7	-----	alkyl ether

Table 3. Main characteristics of the polymers used.

RG504 (batch 2), RG504H (batch 3) and RG502 (batch 4) are PLGA 50:50 copolymers; whereas RG756S (batch 5) is a PLGA 75:25 copolymer. Besides, they show differences in the molecular weight so that $RG502 < RG504 = RG504H < RG756S$; and therefore in the viscosity, being $RG502 < RG504 = RG504H < RG756S$. Lastly, RG504 and RG504H differ on their hydrophilic degree, being the H series resomer the most hydrophilic due to the presence of more free carboxylic groups which make that it hydrates faster than non-H series polymer.

The characteristics of the polymer used did not significantly affect the microencapsulation yield, always higher than 75%.

Figure 3 shows that when the lowest molecular weight polymer was used (RG502), broken microparticles were obtained; whereas with the others polymers microparticles obtained were spherical. It is also appreciated in the figure that the higher the molecular weight of the polymer, the higher the microparticle size; and the same happened when the hydrophilic of the polymer was increased.

Other issue related with the molecular weight of the polymer is the setting up of pores in the surface of the microparticles that is observed when RG756S polymer was used

whereas microparticles elaborated with the other polymers showed a smooth surface free of pores. The presence of pores in the surface of the microparticles could lead to a faster release of the protein.

Le Visage et al (2001) obtained similar results with respect to the morphology of the microparticles when they studied the effect of the molecular weight of poly (methylidene malonate 2.1.2) on the characteristics of protein microparticles obtained by water-in oil-in water (W/O/W) solvent evaporation technique. The increase in the microparticle size and porosity were explained by the increase of the inherent viscosity of the polymer with higher molecular weight that leads to a more difficult dispersion of the organic phase into the external aqueous phase.

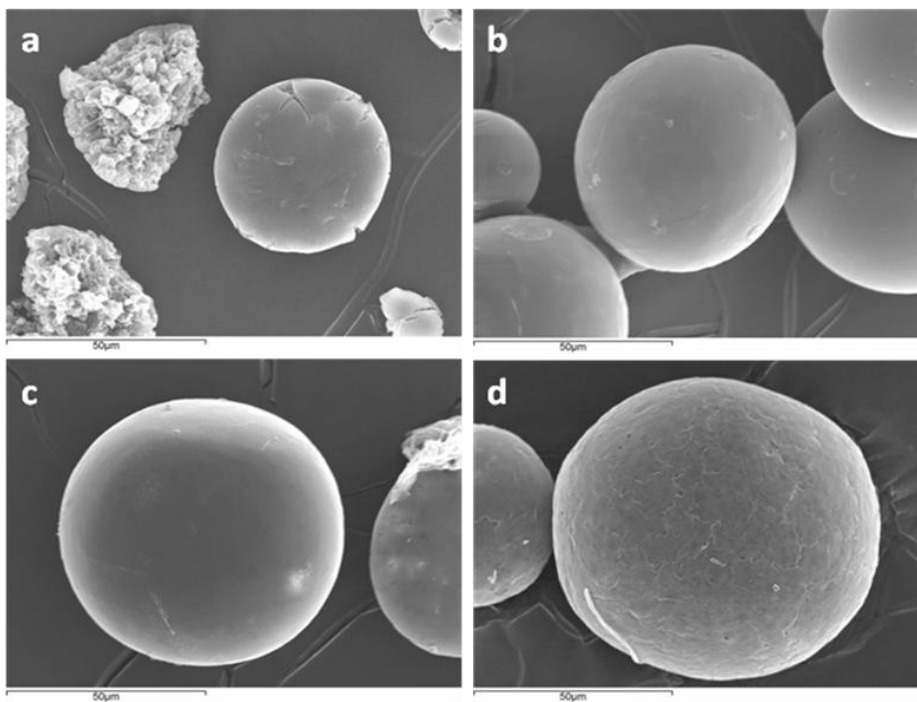


Figure 3. SEM images of polymeric microparticles obtained with different polymer (scale bar = 50 µm). Microparticles obtained with RG502 (a), RG504 (b), RG504H (c) and RG756S (d). Representative microphotographs of the four types of OVA polymeric microparticles are shown.

Besides, the characteristics of the polymer used highly influence the protein loading into microparticles and thus in the encapsulation efficiency; in such a way that the higher the hydrophilic of the polymer and the lower their molecular weight, the lower the

encapsulation efficiency. In terms of protein loading, this decreased from 37.13 μg OVA/mg of microparticles with RG504, to 3.92 μg OVA/ mg of microparticles when the hydrophilic of the polymer was increased (RG504H); and to less of 3 μg OVA/ mg microparticles when the RG502 polymer was used.

3.1.3. Effect of the concentration of PVA in the external aqueous phase

From batch 2, the concentration of the external aqueous phase was increased in order to increase the stability of the emulsion and improve the characteristics of the microparticles. The microparticles of batch 6 were obtained using 5% PVA. The microencapsulation yield was slightly higher than 75%. The microparticles were smaller than those of batch 2, with 2% PVA. This smaller size as well as a higher tendency to aggregate can also be seen by SEM (figure 4). In this picture, non spherical microparticles forming clusters are observed. When the concentration of stabilizing agent of the emulsion increases, the interfacial tension between the aqueous and the organic phases decreases, and the breakage of the internal phase in smaller droplets into the external phase is facilitated, thus obtaining smaller size microparticles, as it is stated in Cho et al (2000). Furthermore, the PVA also facilitate the fast extraction of the organic solvent to the external aqueous phase what leads to the deformation of the microparticles. Only a slight decrease in protein loading (33.13 μg OVA/mg microparticles) and encapsulation efficiency was observed; maybe because the diffusion of the protein to the external aqueous phase, facilitated by the higher concentration of PVA, is partially compensated by the faster solidification of the polymer due to the extraction of the solvent.

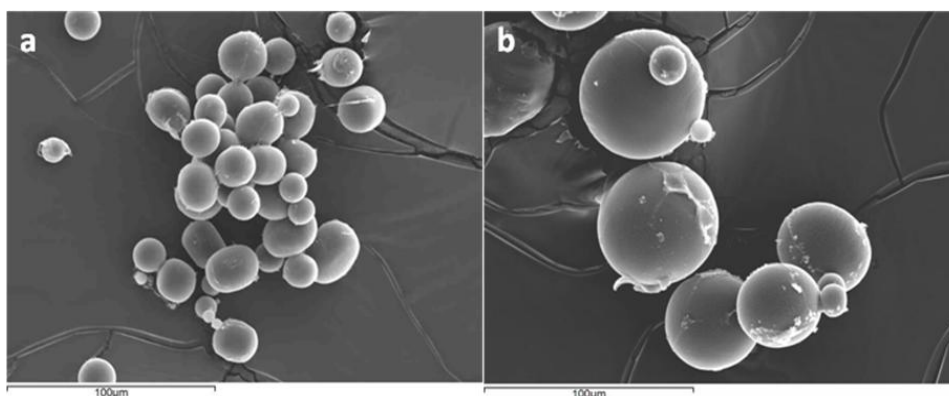


Figure 4. SEM images of OVA polymeric microparticles obtained with 5% PVA (a) and 2% PVA (b) (scale bar = 100 μm). Representative microphotographs of the two types of OVA polymeric microparticles are shown.

Both, the higher aggregation of the microparticles as well as the slightly lower protein loading were the reasons why batch 6 was discarded, in spite of the small size of the microparticles obtained.

3.1.4. Effect of the nature of the organic solvent

From batch 2, DCM, used as organic solvent, was substituted by ethyl acetate and batch 7 microparticles were obtained. Firstly, the dissolution of the polymer in this new solvent was more difficult. In spite of high microencapsulation yield was obtained, SEM images (figure 5) show that microparticles present high porosity, most are broken and free polymer is observed. All this justifies the low encapsulation efficiency and the protein loading lower than the quantification limit of the analytical method of the batch 7.

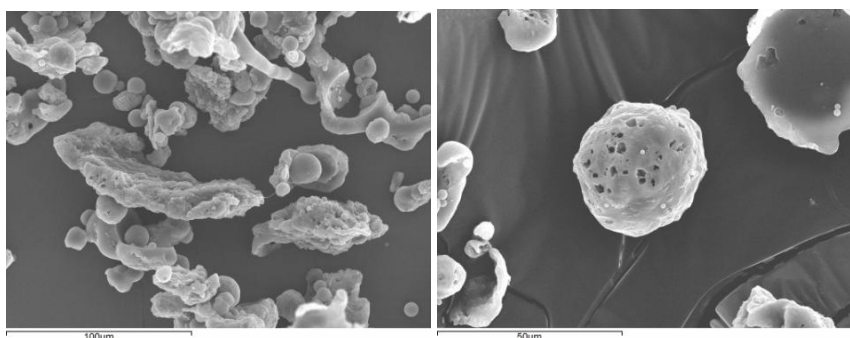


Figure 5. SEM images of OVA polymeric microparticles obtained with ethyl acetate (left scale bar = 100 μm and right scale bar = 50 μm).

Different researchers (Le Visage et al 2001, Cho et al 2000, Kim and Park 1999) employed ethyl acetate instead dichlorometane to elaborate protein microparticles using different polymers. The change of solvent is justified due to the environmental and human toxicity problems of the halogenated alkanes including methylene chloride. Using RG504 as polymer, Cho et al (2000) obtained microparticles with smaller size and higher protein loading when DCM was substituted by ethyl acetate. The water miscibility of ethyl acetate is higher than of DCM, and this is why the microparticles

elaborated with ethyl acetate show a more porous structure, due the tendency of the solvent to quickly diffuse to the external aqueous phase. These authors describe the high porosity of the microparticles obtained with ethyl acetate, but this high porosity did not affect drug loading. In our study, on the contrary, the high porosity of the microparticles could facilitate protein diffusion to the external aqueous phase, thus obtaining low protein loadings.

3.1.5. Effect of the composition of the inner aqueous phase

Different changes in the inner aqueous phase were made aiming increase of its viscosity or protein solubility and thus to avoid protein migration from the internal to the external aqueous phase. For this, PBS was used as solvent of the internal phase (batch 8) or PVA (batch 9), PEG 400 (batch 10) and PEG 4000 (batch 11) were added to the aqueous internal phase.

When PBS pH 7.4 was used as internal phase, the worst results were obtained, as the microencapsulation yield was the lowest (near 60%), and it was such a low protein loading that it could not be determined.

With the others batches microencapsulation yields higher than 70% were always obtained. The incorporation of PVA and PBS produced no changes in microparticles morphology, but when PEG was added (batches 10 and 11) more porous microparticles were obtained, mainly when PEG 400 was used (figure 6). Changes in microparticle size was also detected in such a way that batches elaborated by adding PEG in the internal phase present significantly larger mean diameter. With regard to the encapsulation efficiency, the higher values were obtained with batch 9, with 0.5% PVA as internal aqueous phase, being the difference with the other batches very significant. Indeed, drug loading of batches 9, 10 and 11 were 59.3; 30.7 and 24.1 $\mu\text{g OVA}/\text{mg}$ microparticles respectively.

The use of PEG to increase the viscosity of the internal aqueous phase and thus to avoid protein migration from the internal to the external phase has been extensively studied (Dorati et al 2005, 2008, Yeh et al 1995). PEG also limits the penetration of protein in the interfacial film of the primary w/o emulsion and consequently, it stabilizes the protein by reducing the contact with the organic phase (Pean et al 1999). Dorati et al (2005) found that PEG addition in the formulations leads to obtain larger microparticles,

as we have also observed in our study. This effect maybe due to water retention caused by PEG, which involves an increase in hydration of the polymer matrix. Dorati et al (2005) also describe as the simultaneous addition of PEG and NaCl avoids the pore formation due to the incorporation of PEG, obtaining microparticles with a smooth surface and compact internal structure (Dorati et al 2005). However, in our study porous microparticles were obtained when PEG was used in the internal aqueous phase in spite of the presence of NaCl in the external aqueous phase, and neither non improvement in protein loading was observed. However, the increase of the viscosity of the aqueous internal phase obtained with PVA was shown as an efficient tool to increase encapsulation efficiency without modifying microparticle morphology.

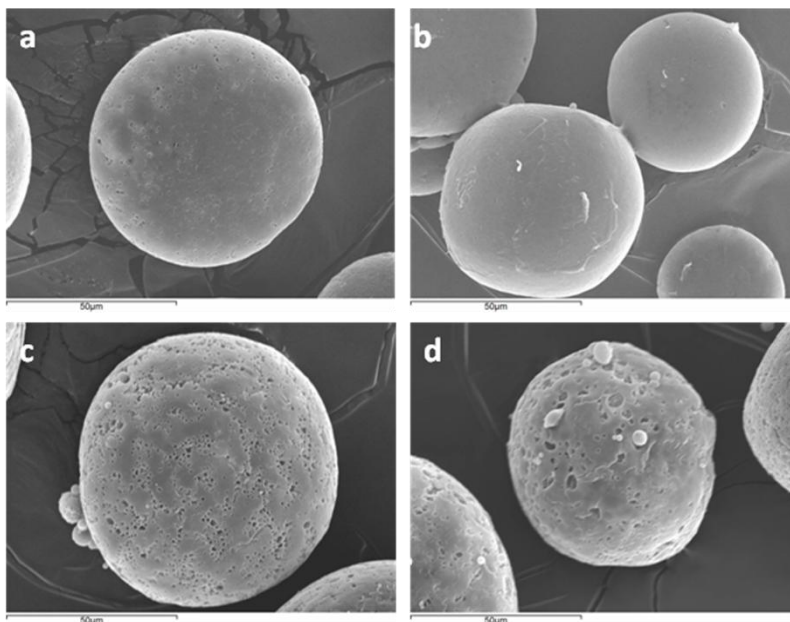


Figure 6. SEM images of OVA polymeric microparticles obtained by adding PEG in the formulation (scale bar = 50 μm). Microparticles obtained with (a) PEG 400 in the inner aqueous phase, (b) PEG 4000 in inner the aqueous phase, (c) PEG 4000 in the organic phase and (d) PEG 400 in the inner aqueous phase plus PEG 4000 in the organic phase. Representative microphotographs of the four types of OVA polymeric microparticles are shown.

3.1.6. Effect of PEG incorporation in the organic phase

The last modification introduced in the microencapsulation procedure was to add PEG in the organic phase in order to increase its viscosity and therefore to avoid the diffusion

of the protein from the internal to the external aqueous phase. Batch 12 was obtained. However, this modification did not lead to the expected results, since highly porous microparticles were obtained with an undetectable protein loading.

Finally, in batch 13 PEG was added both in the internal aqueous phase (PEG 400) as in the organic phase (PEG 4000). The microencapsulation yield was low and the microparticles showed a highly porous surface (figure 6). Beside, as happened in batches 10, 11 and 12, larger microparticles were obtained. But importantly, the encapsulation efficiency and the protein loading values were high (55.9 μg OVA/ mg microparticles), very next to those of batch 9.

Yeh et al (1995), and R. Dorati et al (2005, 2008) analyzed the effect of increasing the viscosity of the inner water and organic phase by adding PEG: blending of PEG 8000 with PLG results in a dramatic improvement of protein loading relative to poly (d,l-lactide-co-glicolide) microparticles (Yeh et al 1995). Therefore, it could be concluded that PEG improves protein loading in PLGA microparticles but only when it is added both in the internal aqueous phase as in the organic phase.

3.2. *In vitro* release assay

In vitro release assays were carried out with the two batches with the highest protein loading that were the batch 9, with PVA in the internal aqueous phase, and the batch 13, with PEG 400 in the internal aqueous phase plus PEG 4000 in the organic phase.

The results obtained are depicted in figure 7. With the batch 9, about 100% of microencapsulated OVA were released throughout 130 days. This release was fitted to a zero order kinetic from day 15 up to day 75 of the assay ($r^2 = 0.981$), with a constant release rate of 69.53 μg OVA/ day. From day 75, the release rate increased up to day 95 of the assay.

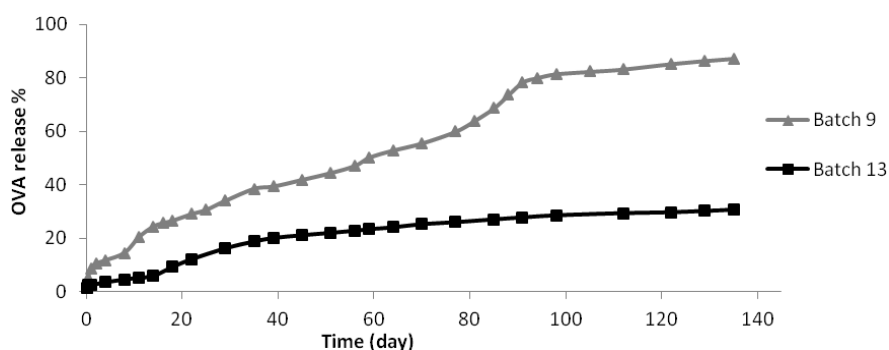


Figure 7. Release profile of OVA from polymeric microparticles obtained from batch 9 and batch 13. For the *in vitro* release studies, microspheres were incubated in PBS (pH 7.4) and maintained in a shaking incubator at 37 °C. At predetermined time intervals, supernatants were withdrawn and replaced. The concentration of OVA in the release medium was quantified by microBCA. Data correspond to the cumulative amount of protein released at the indicated time points, and are expressed as mean percentage of OVA released relative to the total amount of OVA in microspheres (n = 3).

Typically, the proteins are released from PLGA microspheres in three phases: an initial burst, a controlled release by diffusion, and a controlled release by erosion. The initial burst phase is consequence of a rapid release (within a few days) of the protein located at or near the surface of the microspheres (Dorati et al 2008). In the controlled release by diffusion phase, the protein diffuses through pores or channels of the microspheres, and in the controlled release by erosion phase; the protein is released as consequence of the gradual degradation of the polymer by hydrolysis (Cho et al 2000).

In the case of microparticles of batch 9, the initial burst phase was negligible, since the amount of OVA released was less than 10% within the two first days. Later the phase of constant release could correspond to the phase of controlled release by diffusion; and the next phase of faster release to the phase of controlled release by erosion.

Indeed, the degradation of the polymer throughout the protein release from batch 9 microspheres was analyzed by SEM and in figure 8 are presented the images obtained. Initially the microparticles showed a smooth- non porous surface. After 10 days in PBS the microparticles swelled, increasing their volume. Later some pores started to appear, which become more and more large and the surface of the microparticles turned irregular, maybe because short polymer chains were broken off. After 76 days holes

were clearly seen, as well as remainders polymer around the microparticles, and the microparticles were smaller and irregular. These changes coincide with the point in the release kinetic of OVA where the release turns faster. Finally, after 120 days the microparticles had lost totally their spherical shape due to the massive degradation of the polymer.

When the OVA release from microparticles of batch 13 was determined, totally different results were obtained, in such a way that after of the same time period of 130 days only 30% of microencapsulated OVA were released, in spite of these microparticles of this batch showed high porosity.

Indeed, as previously it has been established, the incorporation of PEG to microparticles gives rise to more porous structures. In addition, introducing PEG would increase the hydrophilicity of the polymeric carriers, and thus their degradation rate, and would decrease the acidity of degraded products. Hydrophilic PEG segments could also enhance the diffusivity of water inside the polymeric matrix and consequentially the diffusivity of the drug molecules in the surrounding medium. This should contribute to get more linear protein release from microparticles and to reduce the burst effect. However, in spite of all these hypothesis, OVA release from batch 13 was significantly slower than from batch 9.

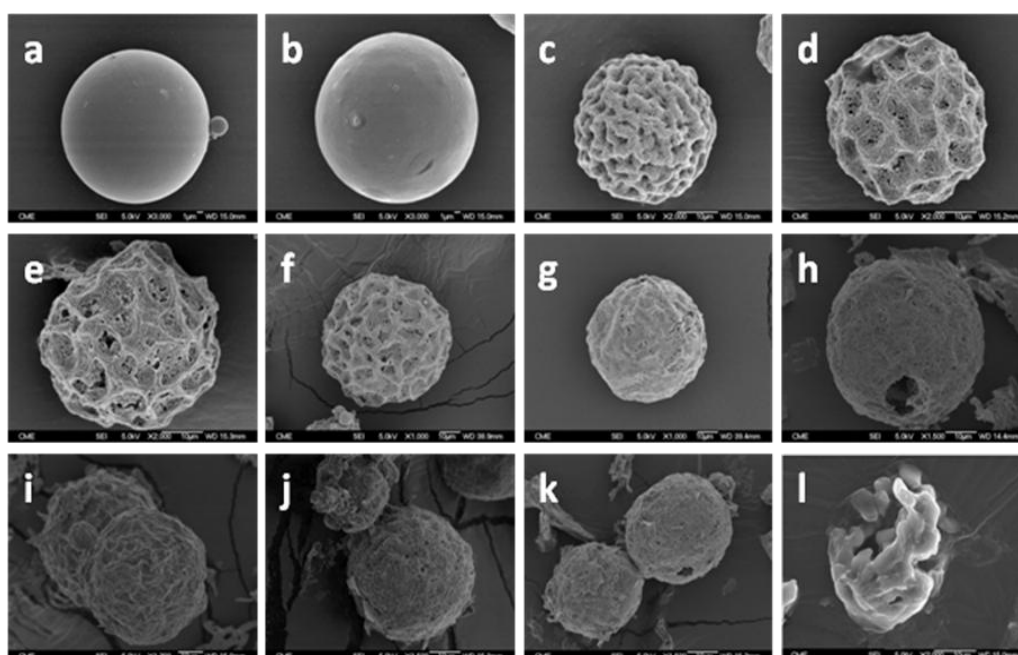


Figure 8. SEM images of OVA polymeric microparticles throughout the vitro release studies: time 0(a), 10 days (b), 20 days (c), 30 days (d), 40 days (e), 54 days (f), 64 days (g), 76 days (h), 86 days (i), 96 days (j), 106 days (k) and 120 days (l) (scale bar = 10 μm).

3.3. Cell proliferation assay

OVA polymeric microparticles were studied in terms of cell viability to determine the effect of the microencapsulation procedure on the stability of the protein, comparing these effects with those obtained with free OVA. Plasmatic proteins such as albumin are the main energy and nutrition source for tumor growth. Indeed, some references describe the stimulating effect on cell proliferation of high doses of BSA and OVA, and even a protective effect against cell apoptosis (Gallego-Sandín et al 2005). This effect was used in this work to determine the biological stability of OVA after microencapsulation. The microencapsulation procedure comprises the use of organic solvents as well as high shear forces during agitation steps that could lead to the lost of protein activity that cannot be detected by the methods of quantitative analysis.

The assay was performed throughout three days. A single administration of OVA polymeric microparticles were compared with daily administrations of free OVA in solution. An OVA concentration 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was selected to evaluate its effect on cell proliferation. The amount of OVA microparticles to daily release the same amount of OVA (35 μg) was calculated from the results of the release study.

As it is shown in Figure 9, both free and microencapsulated OVA produced a rise in cellular viability of about 50% after 1 day of exposure. When the assay was extended up to 3 days this rise in cellular viability was less significant. Unloaded microparticles did not affect cellular viability. These results allowed us to conclude that the integrity and stability of OVA was not affected by the microencapsulation process developed and optimized.

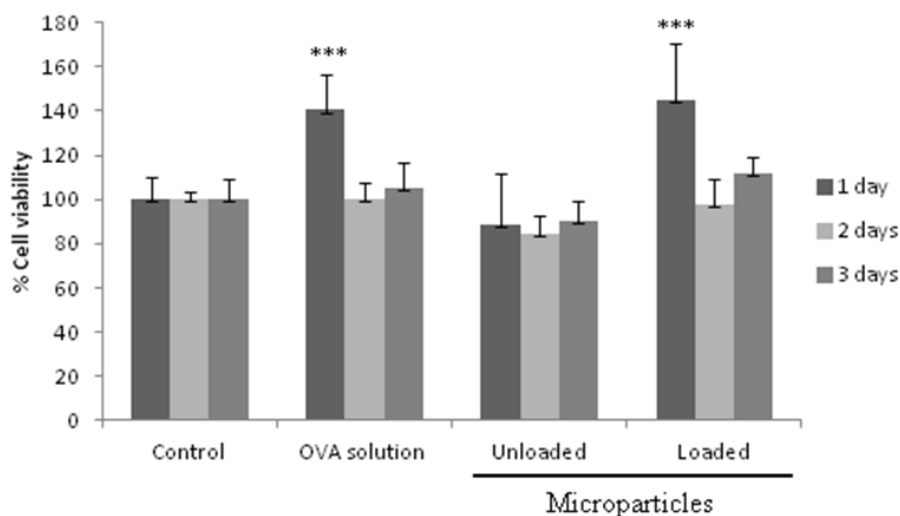


Figure 9. Proliferation assay of OVA solution, unloaded and OVA microparticles from 1 to 3 days. OVA solution and loaded microparticles increased significantly cell proliferation after 1 day of exposure. Unloaded polymeric microparticles were not affect the cell viability in the period tested. Data correspond to the means \pm S.E.M. for 3–6 wells for three different batches of cells. *** $P < 0.05$ with respect to control and unloaded microparticles cell viability (ANOVA).

4. Conclusions

The water-in oil-in water (W/O/W) solvent evaporation technique has been commonly used to microencapsulate proteins. But this technique presents three important limitations: the low loading capacity; the burst effect during release; and the protein inactivation during microencapsulation, mainly by denaturalization and formation of aggregates. In our study has analyzed the different strategies to improve the loading, the release kinetic and the stability of microencapsulated proteins.

The incorporation of sodium chloride (NaCl) in the external aqueous phase resulted in a highly significant increase in the process yield and in the encapsulation efficiency, without changes in microparticles morphology. Different copolymers of poly lactide-co-glycolide 50:50 (RG502, RG504 and RG504H) and 85:15 (RG756S) were used, observing that when the lowest molecular weight polymer was used (RG502) broken microparticles were obtained and when RG756S (the highest molecular weight) was

used microparticles showed pores on its surface. Furthermore, the characteristics of the polymer used highly influence the protein loading into microparticles; in such a way that the higher the hydrophilic of the polymer and the lower their molecular weight the lower the encapsulation efficiency, thus obtaining the microparticles with increased drug loading when RG504 was used.

The increase of the concentration of PVA in the external aqueous phase led to microparticles with smaller size, a higher tendency to aggregate and lower drug loading and encapsulation efficiency. Dichloromethane was substituted by ethyl acetate as solvent of the organic phase, but high porosity and broken microparticles were obtained, showing undetectable protein loading.

But the most interesting strategy studied to increase protein loading was the use of viscosity agents in the inner aqueous phase and in organic phase. PVA, PEG 400 and PEG 4000 were used. When PEG was added to the inner aqueous phase, microparticles with higher size and more pores were obtained. When PVA 0.5% was used no change in the size and morphology of the microparticles was detected but drug loading and encapsulation efficiency significantly increased. These microparticles released the protein in a sustained way over a period of 130 days. Finally, when PEG was added both in the inner aqueous phase (PEG 400) as in the organic phase (PEG 4000), microparticles with a high protein loading were obtained. However, only 30% of the protein was released from these microparticles after 130 days in an *in vitro* assay.

Last, the activity of the microencapsulated protein was demonstrated by an assay of cell proliferation.

In conclusion, a procedure to elaborate OVA microparticles with adequate size for parenteral administration and high protein loading was optimized. This microencapsulation procedure did not affect the biological stability of the microencapsulated protein. This protein was released from microparticles in a sustained way during 130 days.

5. Acknowledgments

We want to thank the Counseling of Education of the Community of Madrid and the European Social Fund through the Regional Plan of Scientific Research and

Technological Innovation. This work was partially funded by the Research Group GR35/10 Santander-UCM, Group: Parenteral administration of drugs.

6. References

Bodmeier, D., Kissel, T., Traechslin, E., 1992. Factors influencing the release of peptides and proteins from biodegradable parenteral depot systems. *J. Control. Release.* 21, 129-137.

Chen, J.L., Chiang, C.H., Yeh, M.K., 2002. The mechanism of PLA microparticle formation by water-in-oil-in-water solvent evaporation method. *J. Microencapsulation.* 19(3), 333-346.

Chen, J.L., Chiang, C.H., Yeh, M.K., 2004. The mechanism of surface-etched protein-loaded PLGA microparticle formation: the effects of salt (NaCl) on the solidification process. *J. Microencapsulation.* 21(8), 877-888.

Cho, S.W., Song, S.I., Choi, Y.W., 2000. Effects of solvent selection and fabrication method on the characteristics of biodegradable Poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing ovalbumin. *Arch. Pharm Res.* 23(4), 385-390.

Diaz-Prieto, N., Herrera-Peco, I., De Diego, A.M., Ruiz-Nuno, A., Gallego-Sandín, S., Lopez, M.G., Garcia, A.G., Cano-Abad, M.F., 2008. Bcl-2 mitigates Ca²⁺ entry and mitochondrial Ca²⁺ overload through downregulation of L-type Ca²⁺ channels in PC12 cells. *Cell Calcium.* 44, 339–352.

Dorati, R., Genta, I., Montanari, L., Cilirzo, F., Buttafava, A., Faucitano, A., Conti, B., 2005. The effect of γ -irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin. *J. Control Release.* 107, 78-90.

Dorati, R., Genta, I., Tomasi, C., Modena, T., Colonna, C., Pavanetto, F., et al, 2008. Polyethylenglycol-co-poly-D,L-lactide copolymer based microspheres: Preparation, characterization and delivery of a model protein. *J. Microencapsulation.* 25(5), 330–338.

Gallego-Sandín, S., Novalbos, J., Rosado, A., Cano-Abad, M.F., Arias, E., Abad-Santos, F., García, A.G., 2005. Albumin prevents mitochondrial depolarization and

apoptosis elicited by endoplasmic reticulum calcium depletion of neuroblastoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 520, 1–11.

Jiang, G., Thanoo, B.C., De Luca, P.P., 2002. Effect of osmotic pressure in the solvent extraction phase on BSA release profile from PLGA microspheres. *Pharm. Dev. Tech.* 7(4), 391–399.

Kim, H.K., Park, T.G., 1999. Microencapsulation of Human Growth Hormone within Biodegradable Polyester Microspheres: protein aggregation stability and incomplete release mechanism. *Biotechnol. Bioeng.* 65(6), 659-666.

Le Visage, C., Quaglia, F., Dreux, M., Ounnar, S., Breton, P., Bru, N., Couvreur, P., Fattal, E., 2001. Novel microparticulate system made of poly(methylidene malonate 2.1.2). *Biomaterials.* 22, 2229-2238.

Morlock, M., Knoll, H., Winter, G., Kissel, T., 1997. Microencapsulation of rh-erythropoietin, using biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide): protein stability and the effects of stabilizing excipients. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43, 1796-1800.

Ogawa, Y., Yamamoto, M., Okada, H., Yashiki, T., Shimamoto, T., 1988. A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsule of copoly(lactic/glycolic acid). *Chem. Pharm. Bull.* 36, 1095-1103.

Pean, J.M., Boury, F., Venier-Julienne, M.C., Menei, P., Proust, J.E., Benoit, J.P., 1999. Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres? *Pharm. Res.* 16(8), 1294– 1299.

Uchida, T., Yoshida, K., Ninomiya, A., Goto, S., 1995. Optimization of preparative conditions for polylactide (PLA) microspheres containing ovalbumin. *Chem. Pharm. Bull.* 43, 1569-1573

Van de Weert, M., Hennink, W.E., Jiskoot, W., 2000. Protein instability in Poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharm. Res.* 17, 1159–1167.

Yeh, M.K., Jenkins, P.G., Davis, S.S., Coombes, A.G., 1995. Improving the delivery capacity of microparticle systems using blends of poly(DL-lactide co-glycolide) and poly(ethyleneglycol). *J. Control Release.* 37, 1-9.

Yeh, M.K., Chen, J.L., Chiang, C.H., Chang, Z.Y., 2007. The preparation of sustained release erythropoietin microparticle. *J. Microencapsulation*. 24(1), 82-93.

4 | Discusión

El cáncer es la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados, después de las enfermedades cardiovasculares. A nivel mundial, se prevé que la mortalidad por cáncer aumente llegándose a alcanzar en el 2030 los 11,5 millones de defunciones, debido en parte al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población. Para intentar frenar esta tendencia se sigue investigando en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y de nuevas moléculas con actividad antitumoral. Como queda recogido en el trabajo (P1), paralelamente, se ha desarrollado una intensa actividad investigadora para el desarrollo de sistemas y estrategias que permitan optimizar la eficacia de moléculas antitumorales ya conocidas. Las tres principales líneas de investigación son: 1) reducir su toxicidad sistémica, 2) mejorar las pautas de administración y 3) evitar la aparición de resistencias [1]. Los sistemas de liberación prolongada de fármacos y los sistemas de vectorización nos permiten actuar sobre estos tres puntos.

1. Reducir la toxicidad sistémica

La quimioterapia implica, principalmente, el uso de fármacos citotóxicos para matar las células tumorales, pero la diferencia de estas células con el tejido no tumoral es relativamente pequeña, lo que origina manifestaciones tóxicas por exposición directa de las células no tumorales al fármaco. Estas manifestaciones tóxicas son más intensas cuando el agente antitumoral se administra por vía oral en una forma farmacéutica convencional, o por vía parenteral en bolo ya que se obtienen concentraciones plasmáticas a lo largo del tiempo con perfiles característicos en diente de sierra. Con el fin de reducir esta toxicidad muchos antitumorales se administran en perfusión durante 1-2 horas. El desarrollo de sistemas de liberación prolongada de agentes antitumorales para una administración parenteral (subcutánea o intramuscular) permitiría obtener niveles plasmáticos constantes del fármaco, evitándose los perfiles en diente de sierra y por lo tanto reduciéndose la toxicidad.

Por otro lado, es evidente que si el fármaco pudiera ser dirigido de forma selectiva al tumor se lograría una mayor eficacia con un menor acceso del fármaco a los tejidos sanos, dando lugar a menos efectos secundarios y así la terapia antitumoral podría mejorar sustancialmente [2].

En los tumores sólidos, la red vascular es diferente a la del tejido normal; desde hace muchos años se sabe que existe una hiperpermeabilidad de la vasculatura a macromoléculas que se conoce como Efecto de Permeabilidad Aumentada

y de Retención (Enhanced Permeability and Retention effect: EPR) [3]. Los capilares sanguíneos que irrigan el tejido tumoral presentan fenestraciones o poros con un diámetro que oscila entre los 100 y 1200 nm, lo que les hace permeables a las macromoléculas, mientras que los capilares fenestrados localizados en tejidos sanos (páncreas, hígado, bazo, tubo digestivo . . .) presentan poros con un diámetro de 80 a 100 nm y por lo tanto únicamente permeables a moléculas sensiblemente menores [4].

El incremento de la localización de macromoléculas en el tejido tumoral no puede explicarse únicamente por un aumento de la permeabilidad del sistema vascular, sino que también se debe a una reducción del aclaramiento en el tumor de moléculas con peso molecular superior a los 40 kDa [5]. Mientras que las moléculas más pequeñas se eliminan rápidamente desde el intersticio del tumor, las moléculas grandes son retenidas, mostrando así altas concentraciones intratumorales incluso después de 100 h de su administración subcutánea [5]. Esta retención de las macromoléculas en el tejido tumoral es causada principalmente por la disminución del drenaje linfático.

En conclusión, es la combinación de una permeabilidad aumentada y una mayor retención, por lo que se produce una acumulación de macromoléculas en tumores sólidos. Y por ello resulta eficaz la utilización de macromoléculas y nanopartículas como vectores para localizar de forma selectiva moléculas antitumorales a nivel de una masa tumoral.

2. Mejorar las pautas de administración

Los sistemas de liberación prolongada proporcionan niveles eficaces del fármaco durante un periodo prolongado de tiempo tras una única administración. En el caso de las micropartículas este periodo suele oscilar entre 15 días y 4 meses; mientras que con los implantes se pueden conseguir distanciar las administraciones hasta más de un año. Este aumento en el intervalo de dosificación repercute en la calidad de vida del paciente.

Los sistemas de vectorización también pueden resultar una forma eficaz de mejorar las pautas de dosificación de agentes antitumorales. Por ejemplo, muchos agentes antitumorales presentan una elevada lipofilia que hace difícil su formulación en formas farmacéuticas convencionales a dosis terapéuticas [6,7]; pero pueden ser vehiculizados mediante su formulación en nanoemulsiones o micelas estabilizadas con tensioactivos [7], o incorporándolos en micro o na-

nopartículas poliméricas o lipídicas. Estos transportadores permiten no sólo vehiculizar el fármaco en formas farmacéuticas líquidas, haciendo posible su distribución por el organismo, sino que también protegen y evitan su degradación durante esta distribución (función especialmente importante en el caso de moléculas de naturaleza peptídica), e incluso pueden prolongar su liberación desde el transportador lo que permite mantener concentraciones eficaces en el tumor durante un prolongado periodo de tiempo.

3. Evitar la resistencia a los fármacos

Los sistemas de vectorización de fármacos pueden disminuir las resistencias debido a que favorecen la entrada del fármaco en la célula tumoral. Una vez alcanzado el medio extracelular, el sistema de vectorización penetra en la célula, generalmente, por endocitosis y sin emplear proteínas transportadoras, por lo que una disminución en la expresión de estas proteínas no afectaría a la entrada del fármaco.

Otra forma de evitar la aparición de resistencias puede ser mediante la combinación de agentes antitumorales. La poliquimioterapia se usa rutinariamente en clínica ya que mejora el perfil terapéutico de los antitumorales administrados por separado. Los sistemas de liberación prolongada y los sistemas de vectorización se utilizan comúnmente para la administración de un único agente antineoplásico; pero recientemente se están desarrollando sistemas que vehiculizan de forma simultánea dos fármacos. Lo que se pretende con estos sistemas es maximizar el efecto terapéutico y evitar los mecanismos de resistencia [8]. En efecto, la administración de una combinación de agentes antitumorales que muestran actividades citotóxicas diferentes (actúan sobre distintos niveles del ciclo celular, dianas diferentes . . .) puede mejorar el índice terapéutico, ya sea por un aumento en la eficacia, por una disminución en las resistencias o por una eficacia comparable pero con una toxicidad reducida.

En este contexto se encuadra el presente trabajo de investigación cuyo objetivo general es desarrollar micropartículas biodegradables que contengan dexametasona fosfato disodio (dex) como estrategia para aumentar la eficacia de los esquemas de poliquimioterapia en los que se utiliza este glucocorticoide (GC).

La dex se introduce en los esquemas de tratamiento de diversos tipos de cáncer fundamentalmente para reducir los efectos secundarios de los quimioterápicos. Sin embargo, recientemente se ha observado que la dex también regula la supervivencia,

el crecimiento y la diferenciación celular por ser inductor de la expresión genética mostrando actividad proapoptótica [9]. Aunque el mecanismo molecular por el que los GC median la apoptosis no está totalmente dilucidado, resulta muy interesante en poliquimioterapia ya que contribuye a un mayor efecto del tratamiento antitumoral.

La apoptosis o muerte celular programada es una de las dianas que está ofreciendo más oportunidades en los últimos años para el tratamiento de los tumores.

La apoptosis es un modo específico de muerte, que se caracteriza por cambios morfológicos tales como condensación de la cromatina, la fragmentación del núcleo, la retracción citoplasmática y la emisión de 'cuerpos apoptóticos', manteniendo aparentemente intactos los orgánulos celulares [10,11]. De hecho, la apoptosis regula un mecanismo de muerte celular que implica la participación activa de la célula afectada en la ejecución de su propio programa de muerte. Los eventos morfológicos y bioquímicos de la apoptosis se conocen desde hace mucho tiempo, y, en algunos aspectos, difieren de aquellos que llevan a la necrosis [12]. La apoptosis se produce en condiciones fisiológicas como un mecanismo regulador del crecimiento de tejidos, en equilibrio con la proliferación celular [13]. La apoptosis se ha convertido en un foco de interés en oncología debido a que su desregulación podría ayudar a explicar la patogénesis de algunos tumores malignos [14].

En el trabajo (P2) se recoge una revisión de las más recientes investigaciones en tratamiento antitumoral basadas en el desarrollo de moléculas que actúan sobre el mecanismo de la apoptosis, analizándose la posibilidad de aparición de resistencias y el balance de su aplicación clínica.

Partiendo de estos antecedentes, el objetivo general de esta memoria se desglosa, como ya se ha indicado, en dos:

1. Desarrollar micropartículas biodegradables de dex como sistemas capaces de proporcionar un efecto inhibitor de la proliferación celular prolongado en el tiempo tras una única administración por vía parenteral (subcutánea o intramuscular).
2. Evaluar el efecto que diferentes materiales transportadores utilizados en la elaboración de micropartículas biodegradables pueden tener sobre la inhibición de la proliferación celular inducida por dex.

4.1. Búsqueda y puesta a punto de un modelo celular que permita evaluar el efecto inhibitor de la proliferación celular de dex

El trabajo experimental comienza con la búsqueda de un modelo celular que nos permita evaluar el efecto de dex sobre la proliferación celular. A pesar de que la dex ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de ciertos tipos de neoplasias hematológicas así como en osteosarcoma, hepatoma, glioma y tumor mamario [15], reduciendo la proliferación de las células tumorales debido a su actividad proapoptótica, este efecto es tejido específico [16], lo cual hace que no pueda aplicarse de forma generalizada a los esquemas de poliquimioterapia, sin que se haya dilucidado actualmente cual es el motivo exacto de dicha resistencia.

Esta especificidad nos llevó a realizar una búsqueda del modelo celular más adecuado con el que trabajar. Inicialmente se realizaron ensayos en líneas celulares U373 de glioblastoma humano, empleando dex en solución en concentraciones comprendidas entre 1 y 100 μM con un periodo de incubación de 24 h. Tras dicha exposición se evaluó la viabilidad celular y la apoptosis producida por dex mediante ensayos de función mitocondrial mediante (3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2, 5-difenil) bromuro (MTT) y estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo (FACS).

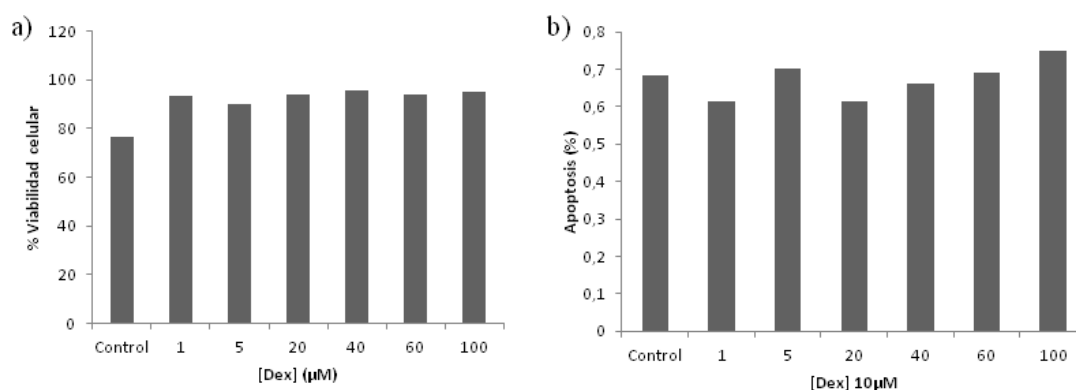


Figura 1: a) Curva concentración-respuesta del efecto citotóxico de dex en solución, medido como porcentaje de la viabilidad celular, en células expuestas durante 24 h. b) Curva concentración-respuesta para la inducción de la apoptosis de dex en solución, expresada como porcentaje de apoptosis, en células expuestas durante 24 h. En ambos casos se utilizan células U373 de glioblastoma humano.

Como puede observarse en la figura 1, la exposición a dex no disminuye la viabilidad celular con respecto a las células control ni produce un aumento en la apoptosis de las células U373. Por ese motivo se repitieron los ensayos empleando otras líneas celulares: PC3 de próstata y células PC12 transformadas de astrocitoma, pero, estas líneas tampoco mostraron ser sensibles a los tratamientos con dex.

Finalmente, como queda detallado en el trabajo (P4), se probaron las células PC12 sin transformar. Esta línea celular procede de feocromocitoma de médula adrenal de rata pero, a diferencia de las células PC12 transformadas utilizadas anteriormente, no han sido tratadas con factor de crecimiento nervioso (NGF) o ácido retinoico para diferenciarlas a un modelo neuronal. Con esta línea celular se realizaron ensayos de dex en solución en concentraciones desde 3 a 1000 μM durante periodos de incubación de 1, 2 y 3 días. Las células PC12 sin transformar sí que se mostraron sensibles a la dex, y con estas pruebas se pudieron establecer las curvas dosis respuesta y tiempo respuesta (figura 2).

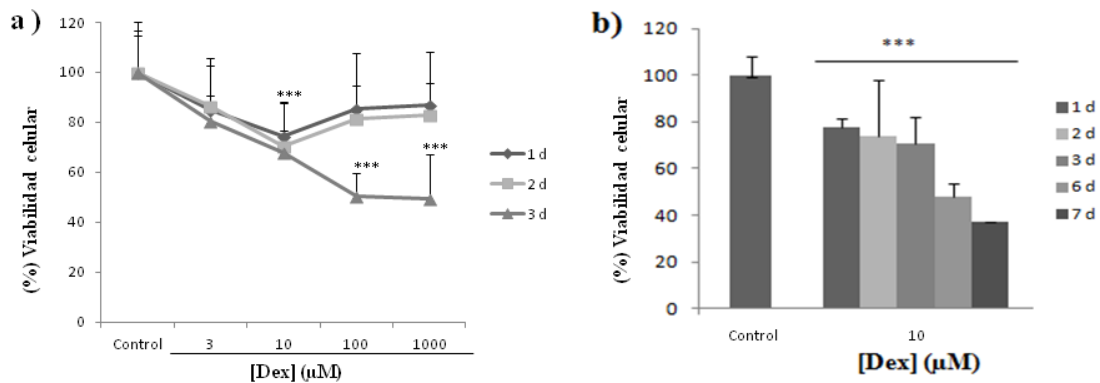


Figura 2: Curvas de concentración y tiempo respuesta para el efecto citotóxico de dex sobre células PC12 sin transformar. A) muestra el efecto citotóxico de concentraciones crecientes de dex, medido como porcentaje de viabilidad celular, en células expuestas durante 1, 2 y 3 días a dex en solución. B) muestra el efecto citotóxico de una concentración de 10 μM de dex, medido como porcentaje de viabilidad celular, en células expuestas de 1 a 7 días. Los datos se corresponden a la media \pm desviación estándar de 6-12 pocillos de cuatro lotes de células diferentes. *** $p < 0,05$ con respecto a la viabilidad celular control (ANOVA).

Como muestra la figura 2, una concentración de 10 μM de dex en solución induce una muerte celular aproximadamente del 30 % después de un periodo de incubación de 3 días, siendo este efecto estadísticamente significativo frente al control desde el primer día de exposición. A los 3 días de tratamiento con 100 y 1000 μM , la

muerte celular inducida es mayor, cercana al 50 %. Sin embargo, se establece la concentración de 10 μM como la más apropiada para evaluar la citotoxicidad de dex en esta línea celular, debido a que la muerte celular alcanzada con las dosis más altas puede resultar una citotoxicidad excesiva para periodos de incubación más prolongados.

Una vez establecida la concentración de 10 μM como la concentración de trabajo, los ensayos de proliferación celular se llevaron a cabo con tiempos de exposición más largos, durante los cuales se observó una correlación tiempo-respuesta (figura 2 b). La dex en solución se administró cada 2 días con medio fresco durante todo el ensayo. El ensayo se prolongó hasta los 7 días de incubación. También se evaluó el efecto apoptótico de la dex en solución en esta línea celular. Inicialmente se hicieron ensayos a tiempos cortos (3-5h) no observándose una inducción de la apoptosis por lo que dichos tiempos se ampliaron hasta 24-48 horas observándose entonces un incremento estadístico en la proporción de células apoptóticas frente al control tras 48 horas de exposición (figura 3).

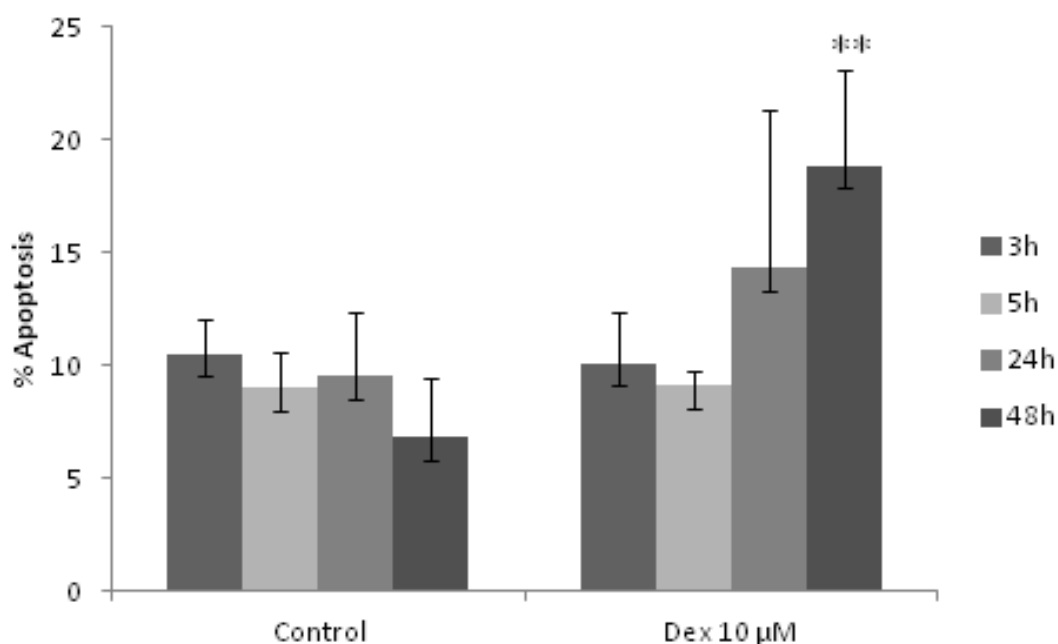


Figura 3: Efecto apoptótico de dex en solución 10 μM . Los resultados expresados como porcentaje de apoptosis, son las medias \pm desviación estándar de 6 experimentos de al menos 6 cultivos diferentes. En cada experimento las medidas fueron tomadas por duplicado. ** $p < 0,05$ con respecto a control.

Estos resultados demuestran el efecto citotóxico de la dex ($10\ \mu\text{M}$) en células PC12. Referencias bibliográficas que usaron $1\text{-}5\ \mu\text{M}$ como concentraciones de dexametasona [17-19], mostraron una inducción génica que provocó un incremento en la secreción de calcio y una inducción de la síntesis de catecolaminas y del almacenamiento de proteínas, sin embargo en los casos descritos no se producía un efecto citotóxico ni una inducción de la apoptosis. Al emplear dosis superiores, de $10\ \mu\text{M}$, estos efectos sí que se observan de forma significativa tras 48 h de tratamiento.

Además, los análisis mediante citometría de flujo muestran que la dex en solución induce una parada del ciclo celular en la fase G2, que prácticamente llega a desaparecer, como queda recogido en la figura 13, donde también se recogen los resultados obtenidos a partir de micropartículas poliméricas, que se comentarán posteriormente.

4.2. Desarrollo de micropartículas poliméricas de dex

Para el desarrollo de las micropartículas poliméricas se partió de un protocolo de microencapsulación inicial sobre el cual se fueron introduciendo diversas modificaciones teniendo en cuenta los puntos críticos del método de elaboración empleado. El protocolo inicial está basado en el método de evaporación-extracción del solvente mediante emulsión O/A. En la figura 4 se describen de forma esquemática las diferentes etapas. Se prepara una fase orgánica formada por 500 mg de polímero láctico-co-glicólico 50:50 y 0,5 ml de una solución de dex en metanol (100 mg/ml) todo disuelto en un solvente orgánico. Esta fase orgánica es emulsificada por agitación vigorosa en una fase acuosa formada por alcohol polivinílico (PVA) y cloruro sódico (NaCl). Una vez formada la emulsión, se mantiene en agitación durante 2,5h a 500 rpm hasta lograr la completa evaporación del solvente orgánico. Finalmente las micropartículas son recolectadas por filtración, se liofilizan y se almacenan a $4\ ^\circ\text{C}$.

En la tabla 1 están recogidas las modificaciones introducidas en este protocolo inicial. Las micropartículas obtenidas se caracterizan en cuanto a morfología, tamaño, carga de principio activo, compatibilidad entre excipientes, disposición del fármaco en las micropartículas y cinética de cesión *in vitro*. Se busca que las micropartículas

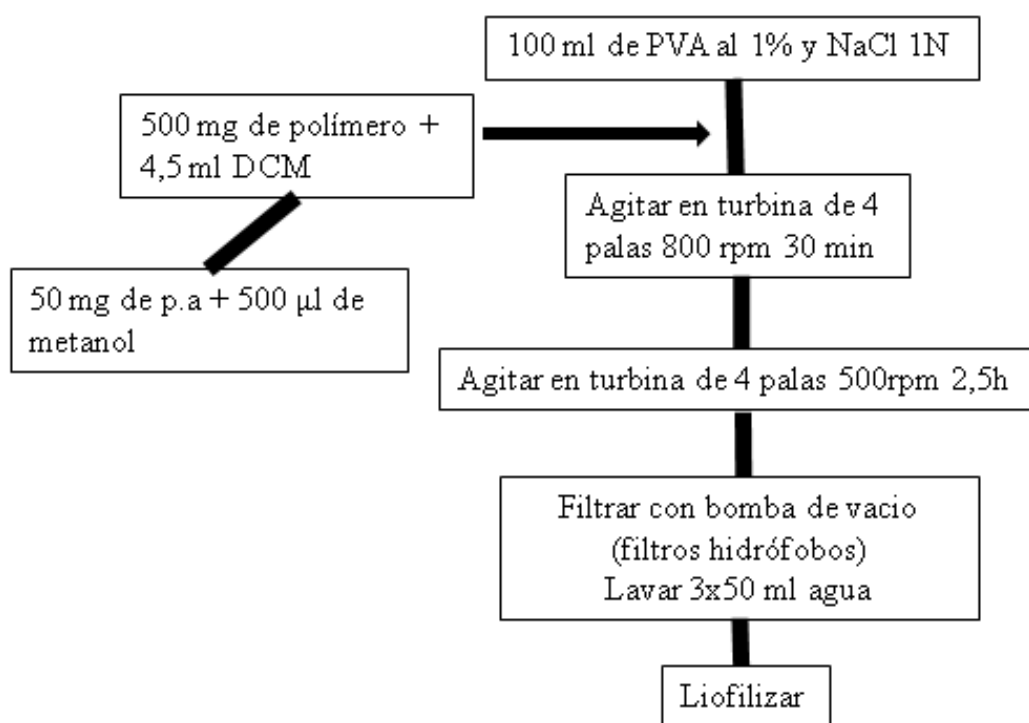


Figura 4: Representación esquemática del protocolo inicial de microencapsulación para la obtención de micropartículas poliméricas utilizando el método de evaporación-extracción del solvente mediante emulsión O/A.

obtenidas presenten una morfología regular, con un tamaño inferior a $100 \mu\text{M}$ para permitir su correcta administración por vía parenteral mediante inyección con una aguja convencional y una baja dispersión de tamaños. Estas micropartículas deben tener una alta carga de principio activo y permitir una liberación controlada de dex.

	Fase orgánica		Volumen	Fase acuosa	Velocidad de agitación
	Solvente orgánico	Polimero		Composición	
Protocolo 1	4,5 ml DCM	RG502	100 ml	1 % PVA, 1 N NaCl	800rpm
Protocolo 2	3 ml DCM	RG502	100 ml	1 % PVA, 1 N NaCl	800rpm
Protocolo 3	3 ml Cloroformo	RG502	100 ml	1 % PVA, 1 N NaCl	800rpm
Protocolo 4	3 ml DCM	RG502	50 ml	1 % PVA, 1 N NaCl	800rpm
Protocolo 5	3 ml DCM	RG502	100 ml	0,5 % PVA, 0,5 N NaCl	800rpm
Protocolo 6	3 ml DCM	RG502	100 ml	0,25 % PVA, 0,25 N NaCl	1200rpm
Protocolo 7	3 ml DCM	RG504H	100 ml	0,25 % PVA, 0,25 N NaCl	1200rpm

Tabla 1: Condiciones experimentales evaluadas en la optimización del procedimiento de elaboración de las micropartículas poliméricas.

Para la cuantificación de dex microencapsulada, así como para la determinación de la dex liberada en los posteriores ensayos de cesión *in vitro* se puso a punto un método analítico por HPLC. Para la validación de este método se diseñó un protocolo de validación que contempla el procedimiento de preparación de las muestras de validación, el procedimiento experimental para determinar la selectividad, linealidad, exactitud, precisión y límite de cuantificación; y la evaluación estadística de los resultados. Este protocolo de validación del método analítico está detallado en el trabajo (P3), dicho protocolo fue diseñado de acuerdo con la USP y las directrices de la ICH pero adaptándolo a las necesidades del método analítico en función de su uso: por un lado se pretende cuantificar el contenido de dex en las micropartículas (ensayo:contenido) y por otro lado se pretende cuantificar el fármaco liberado desde las micropartículas (ensayo:disolución).

La especificidad, linealidad, proporcionalidad, precisión y exactitud fue determinada para la dex en el rango de 10 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el procedimiento analítico del ensayo:contenido y de 0,25 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el procedimiento analítico del ensayo:disolución usando para ello muestras artificiales y muestras reales. Los procedimientos analíticos propuestos fueron adecuados salvo por la falta de proporcionalidad del procedimiento analítico del ensayo:disolución.

Los resultados obtenidos en la optimización del protocolo de microencapsulación están recogidos en el trabajo (P4).

El procedimiento de microencapsulación desarrollado fue reproducible, obteniéndose rendimientos del proceso en los diferentes protocolos próximos al 82 %, excepto en el protocolo 3, donde el rendimiento fue más bajo (tabla 2). Las micropartículas obtenidas en la mayoría de los casos fueron esféricas, sin agregar, sin poros y uniformes, con una superficie lisa sin huecos ni deformaciones (figura 5).

En la optimización del procedimiento de microencapsulación, inicialmente el diclorometano fue seleccionado como solvente orgánico. El volumen de dicho solvente fue ajustado (protocolos 1 y 2) para mejorar la extracción del solvente durante la formación de las micropartículas. La extracción-evaporación del solvente provoca la precipitación del polímero encapsulando el fármaco. Además, cuanto más rápido se evapora el solvente, más rápida se produce la precipitación del polímero, lo que conlleva a una mayor carga de principio activo en las micropartículas [20]. Sin embargo, en nuestros ensayos la reducción del volumen del solvente no supuso una mejora en la carga de las micropartículas, ni produjo ninguna alteración morfológica en las

mismas (figura 5).

El diclorometano fue sustituido por cloroformo en el protocolo 3. Numerosos autores describen que el uso de solventes orgánicos con una buena miscibilidad con el agua mejora la carga de las micropartículas [21-23]. En nuestro estudio este cambio dio lugar a micropartículas con una superficie más irregular (figura 5), incrementándose la agregación y disminuyendo la carga en las micropartículas.

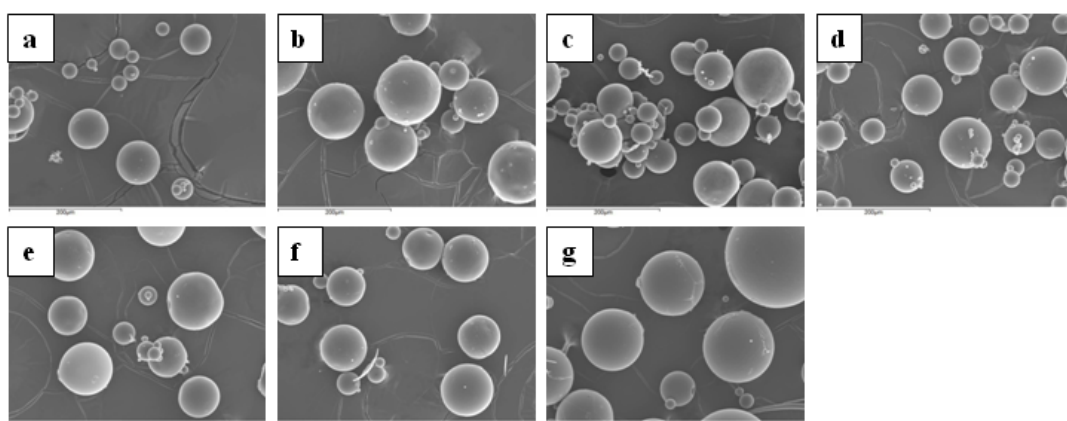


Figura 5: Imágenes de microscopía electrónica de micropartículas poliméricas obtenidas bajo diferentes condiciones experimentales (escala de la barra = 200 μm). Micropartículas obtenidas en el protocolo 1 (a); protocolo 2 (b); protocolo 3 (c); protocolo 4 (d); protocolo 5 (e); protocolo 6 (f); and protocolo 7 (g).

Con el fin de aumentar la carga de dex en las micropartículas, se redujo el volumen de la fase acuosa (protocolos 2 y 4), para limitar la difusión del fármaco a la fase acuosa externa. Sin embargo, la mejora obtenida en la carga no fue significativa.

La disminución de la concentración de PVA en la fase acuosa externa (desde el 1% de PVA en el protocolo 2 al 0,5% de PVA en el protocolo 5) provocó un incremento en la carga de las micropartículas pero también en su tamaño. En efecto, el PVA es un tensioactivo que estabiliza la emulsión, reduciendo la tensión superficial entre la fase acuosa y orgánica y facilitando la dispersión de la fase orgánica interna en gotículas más pequeñas [21]. Por otro lado, una mayor concentración de PVA favorece la difusión de dex a la fase acuosa, lo que provoca un descenso de la carga y de la eficacia de encapsulación. Por ello, para incrementar la carga de las micropartículas, manteniendo su tamaño por debajo de los 100 μm , fue necesario reducir la concentración de PVA hasta el 0,25% pero de forma paralela se aumento la velocidad de agitación durante la formación de la emulsión (protocolo 6).

Finalmente, el protocolo 7 es el mismo que el protocolo 6 pero las características del polímero fueron ligeramente diferentes. En ambos casos se usaron copolímeros poli láctico-glicólico 50:50 pero con diferente peso molecular y viscosidad inherente (RG504H >RG502). Además, el copolímero RG504H contiene más restos carboxílicos que les dan una mayor hidrofilia y que son responsables de que estos polímeros de la serie H presenten una degradación más rápida *in vitro*. Cuando se utilizó el copolímero RG504H se observó un importante aumento en el tamaño de las micropartículas, excediendo los 100 μm , probablemente debido a una peor difusión del polímero en la solución acuosa externa de PVA por su mayor viscosidad inherente [23]. Además, la carga de dex en las micropartículas se redujo, quizás debido tanto a un mayor tiempo de contacto entre la dex y la fase externa acuosa, como a la mayor porosidad de las micropartículas (como se describe en la bibliografía), aunque en las imágenes de microscopía electrónica estas modificaciones en la superficie de las micropartículas (figura 5) no se observen [24].

	Rendimiento (%)	Diámetro medio en volumen	Carga (mg DEX / 100 mg MPs)	Eficacia de encapsulación (%)
Protocolo 1	90,06	66,06 \pm 32,04	2,98 \pm 0,20	30,62 \pm 2,11
Protocolo 2	92,12	73,31 \pm 30,89	2,89 \pm 0,18	29,79 \pm 1,91
Protocolo 3	63,23	83,59 \pm 48,95	1,53 \pm 0,10	15,48 \pm 1,05
Protocolo 4	81,88	81,34 \pm 37,41	3,25 \pm 0,24	33,48 \pm 2,51
Protocolo 5	95,68	92,81 \pm 41,55	5,79 \pm 0,29	61,51 \pm 3,18
Protocolo 6	97,08	59,69 \pm 22,35	7,30 \pm 0,26	78,84 \pm 2,86
Protocolo 7	93,05	135,26 \pm 52,53	4,63 \pm 0,29	48,19 \pm 3,09

Tabla 2: Características de las micropartículas obtenidas en los diferentes protocolos de la tabla 1.

Mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) se estudió la disposición de dex en las micropartículas y la compatibilidad entre el principio activo y el material polimérico. Los termogramas obtenidos por DSC de dex pura, del polímero RG502, de las mezclas físicas de RG502:dex y de las micropartículas obtenidas mediante el protocolo 6 se muestra en la figura 6. El termograma de dex pura muestra dos picos próximos a 100 °C, los cuales corresponden a las moléculas de agua ligadas y de agua libre respectivamente. También se observó un pico exotérmico agudo y grande a 228,05 °C, el cual se corresponde con el punto de fusión de dex con una entalpía de fusión de $\Delta H_m = -77,8$ J/g. El polímero RG502 mostró un pico endotérmico a 46,17 °C con un calor de fusión de 4,32 J/g, lo que está de acuerdo con los datos publicados por Boehringer Ingelheim. Los termogramas de las mezclas físicas a proporciones

reales mostraron dos picos, los cuales corresponden al polímero RG502 y a la dex, indicando que no existen interacciones químicas entre ambos componentes. En el termograma correspondiente a las micropartículas el punto de fusión de la dex no fue detectado, lo que indicó que el fármaco estaba disuelto o molecularmente disperso en la matriz polimérica.

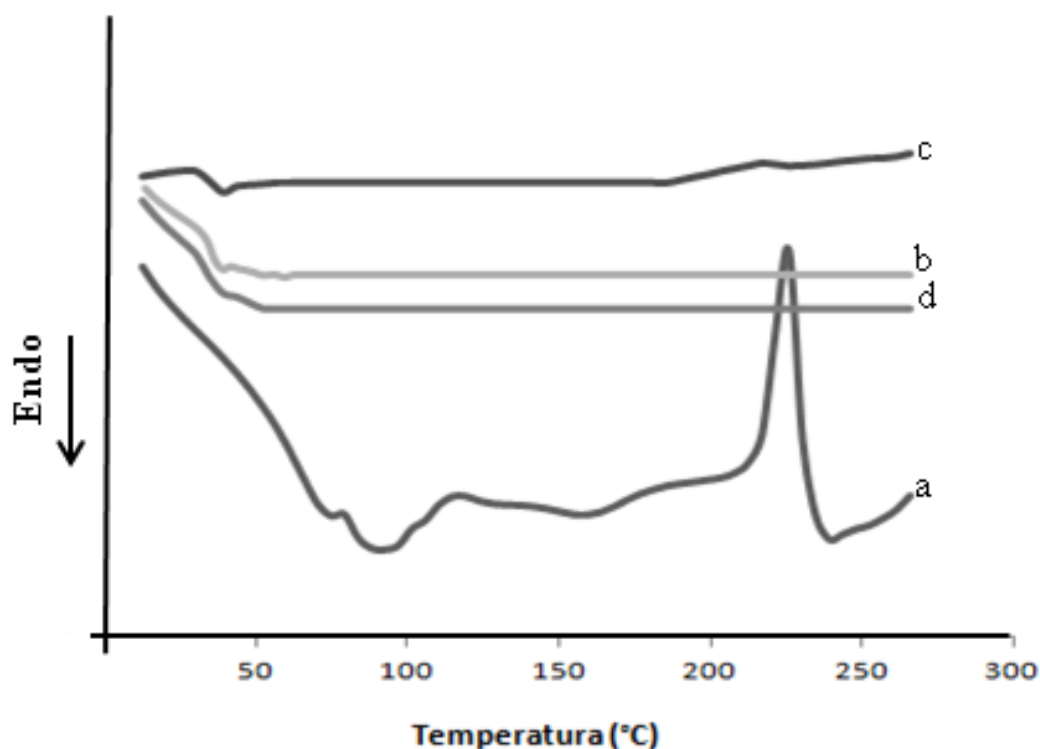


Figura 6: Termogramas obtenidos por DSC al calentar desde 20 °C a 280 °C a 10 °C/min muestras de dex pura (a), polímero RG502 (b), mezcla física (c) y micropartículas del protocolo 6 (d).

En conclusión, a partir del estudio de las diferentes variables descritas se ha optimizado el protocolo de microencapsulación de dex hasta obtener las micropartículas del protocolo 6, con un tamaño medio de $59,69 \mu\text{m} \pm 22,35 \mu\text{m}$; superficie lisa y regular sin poros ni huecos, y con una carga en dex de $7,30 \pm 0,26 \text{ mg de Dex} / 100 \text{ mg de micropartículas}$ (eficacia de encapsulación aproximada del 79 %). Además, se descartaron posibles incompatibilidades de los componentes de dichas micropartículas mediante el análisis de sus termogramas obtenidos por DSC. Este estudio también permitió determinar que el fármaco se encuentra disuelto o molecularmente disperso en el interior de las micropartículas.

Con estas micropartículas se realizó un estudio de cesión *in vitro*, obteniéndose los resultados de la figura 7. Debido al bajo peso molecular de la dex y a la hidrólisis de los poliésteres alifáticos de los polímeros como el poli láctico-co-glicólico en medio acuoso, la liberación del fármaco a partir de las micropartículas puede producirse por dos mecanismos: la difusión de la dex a través de la matriz polimérica, y la erosión de las micropartículas. Como se observa en la figura, en la cesión de la dex desde las micropartículas se diferencian varias etapas. Se detecta un pequeño efecto burst en las primeras 24 h, que supone una liberación de menos del 10 % del fármaco. Después, se observa una fase de liberación rápida, que probablemente sea consecuencia, en gran medida, de la difusión de la dex desde las capas externas de la micropartículas, y con una baja contribución de la erosión de las mismas. En esta etapa se alcanzó una liberación del fármaco del 70 % en 14 días. Finalmente, se produce una liberación lenta de la dex que se debe principalmente a la degradación de las micropartículas, de manera que después de 28 días se liberó el 81 % del fármaco. La máxima cantidad de fármaco liberado se alcanza tras 90 días con un total de 92 % de dex liberada.

Con el fin de intentar reducir la pendiente de la fase rápida de liberación, y conseguir una velocidad de liberación más homogénea durante toda la cesión, se elaboraron micropartículas mediante el protocolo 6 pero incorporando vitamina E y polietilenglicol (PEG) 6000 en la fase orgánica. Otros trabajos realizados por nuestro equipo de investigación nos mostraron que la incorporación de vitamina E a micropartículas de tetrahidrocannabinol resultó eficaz para mejorar la cinética de liberación de la molécula activa [25]. La incorporación de vitamina E permitiría, además de mejorar la cinética de cesión, aumentar la estabilidad de dex frente a la oxidación. Como se puede ver en la tabla 3 la incorporación de la vitamina E no afectó de forma significativa a la carga de las micropartículas obteniendo por tanto valores altos de eficacia de encapsulación. Si hay que destacar que la incorporación de PEG 6000 provocó un aumento en la viscosidad de la fase interna orgánica, lo cual disminuye la difusión del fármaco a la fase acuosa y por tanto aumentó significativamente la carga y la eficacia de encapsulación.

La incorporación de vitamina E y de PEG en la formulación también provocó cambios en la morfología de las micropartículas (figura 8), de forma que la vitamina E dio lugar a micropartículas más porosas, aumentando dicha porosidad al aumentar la proporción de vitamina E en la formulación. Sin embargo la incorporación del PEG 6000 hizo que las micropartículas obtenidas tuvieran menos poros.

Con las micropartículas obtenidas en estos lotes se evaluó la cesión *in vitro* de

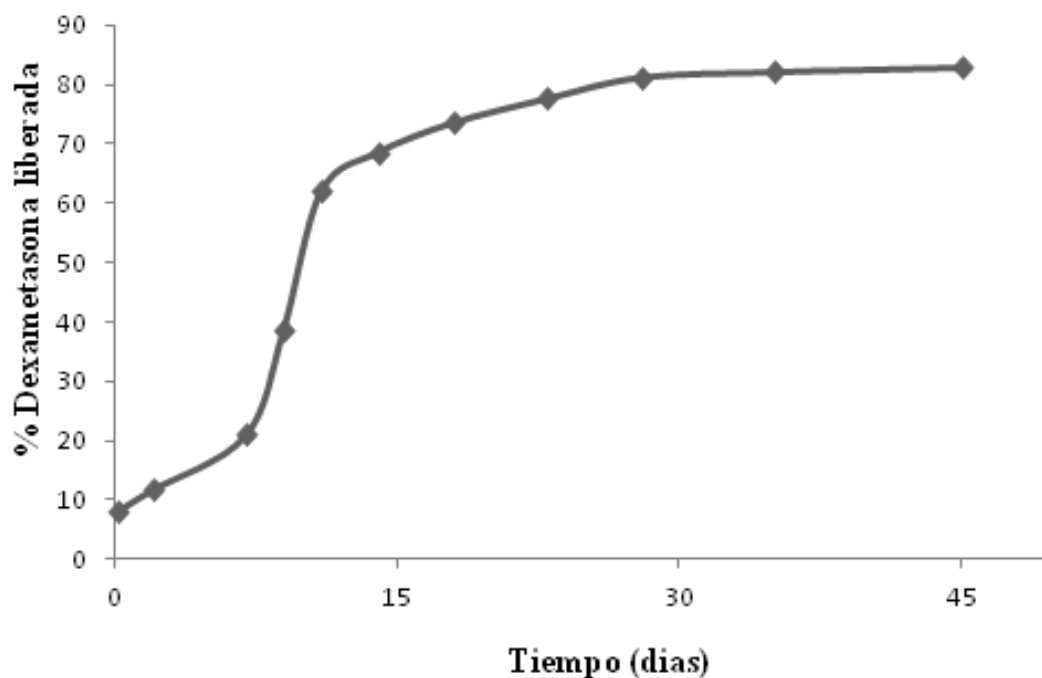


Figura 7: Cinética de liberación de dex desde las micropartículas obtenidas con el protocolo 6. Para los estudios de cesión in vitro, las micropartículas fueron incubadas en PBS pH 7,4 en agitación a 37 °C. A intervalos de tiempo predeterminados, el sobrenadante fue retirado y reemplazado con PBS atemperado. La concentración de dex en el medio de cesión se cuantificó por HPLC. Los datos corresponden a la cantidad acumulada de fármaco liberado en el periodo de tiempo indicado, y expresado como el porcentaje medio con respecto a la cantidad total de dex en las micropartículas (n = 3).

Lote	Aditivo en la fase orgánica	Carga Eficacia de (mg DEX/ 100 mg MPs)	encapsulación (%)
6		7,30±0,26	78,84±2,86
8	0,5 % vit E	7,11±0,29	76,60±2,89
9	1 % vit E	6,67±0,27	65,55±2,67
10	2 % vit E	7,21±0,26	77,71±2,60
11	5 % vit E	6,76±0,29	72,50±2,91
12	1 % vit E + 1 % PEG 6000	8,25±0,3	89,97±3,05

Tabla 3: Efecto de la incorporación de vitamina E y PEG 6000 en la fase orgánica sobre la carga y eficacia de encapsulación de las micropartículas poliméricas obtenidas.

dex comparándola con el lote sin vitamina E (figura 9).

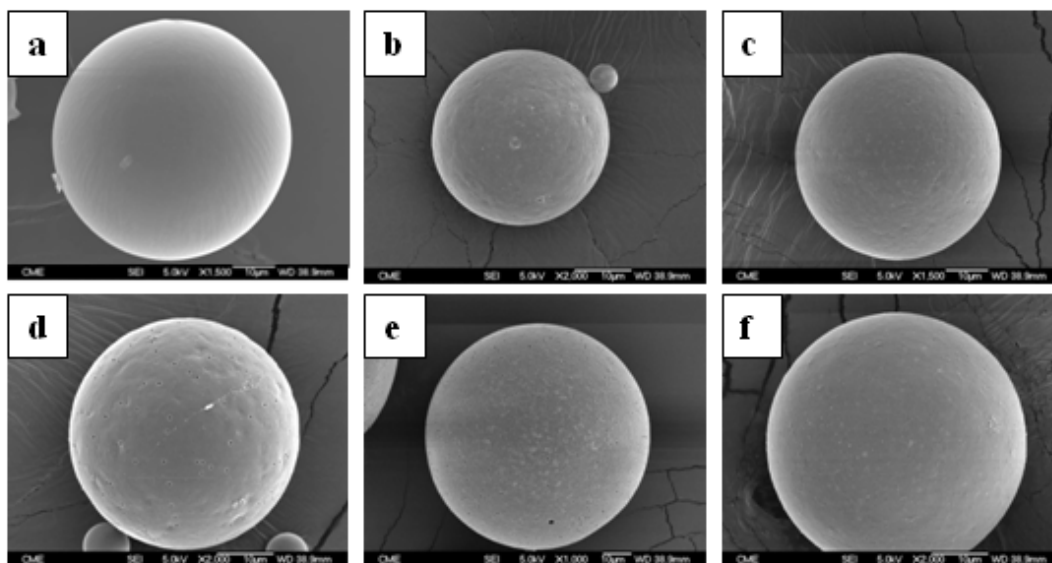


Figura 8: Imágenes por microscopía electrónica de las micropartículas poliméricas elaboradas con distinta proporción de vitamina E (escala de la barra = 10 μm). Micropartículas obtenidas en lote 6 sin vitamina E (a); lote 8 con 0,5% vitamina E (b); lote 9 con 1% vitamina E (c); lote 10 con 2% vitamina E (d); lote 11 con 5% vitamina E (e); lote 12 con 1% vitamina E y 1% PEG 6000 (f).

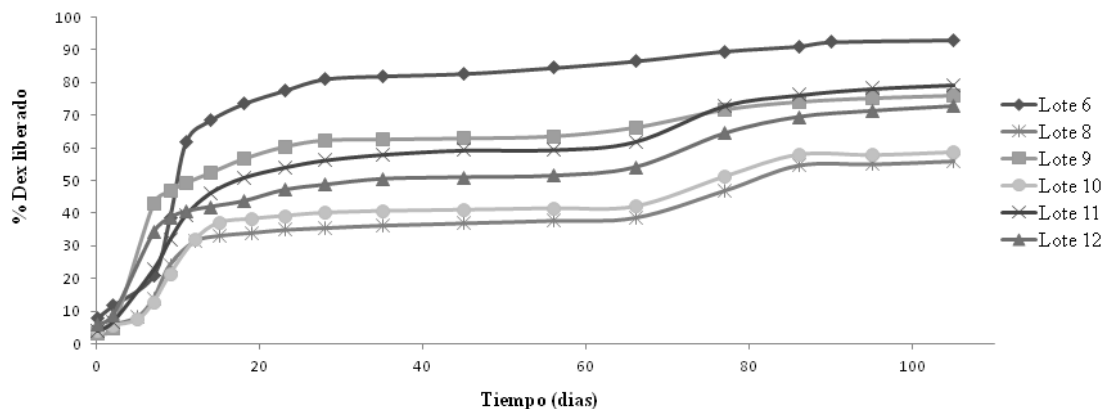


Figura 9: Perfil de cesión de dex desde las micropartículas poliméricas de los lotes 6, 8-12. Para los estudios in vitro las micropartículas fueron incubadas en PBS pH 7,4 con agitación a 37 °C. A intervalos de tiempo predeterminados el sobrenadante fue retirado y reemplazado por PBS atemperado. La concentración de dex en el medio de cesión fue determinada por HPLC. Los datos corresponden al porcentaje acumulado de fármaco liberado al periodo de tiempo indicado, respecto al total de fármaco microencapsulado ($n = 3$).

Llama la atención que al incorporar vitamina E en la formulación el porcentaje de dex liberada desde los 15 hasta los 105 días del ensayo es siempre significativamente inferior al obtenido a partir del lote 6. Además, después de 105 días de ensayo el porcentaje total de dex liberada estuvo muy por debajo del 100 %. Mientras que con el lote 6, sin vitamina E, se alcanza más de un 90 % de fármaco liberado en 105 días, con los lotes elaborados con vitamina E, esta cesión no supera el 75 %, con un valor del 56 % en el caso del lote 8, elaborado con un 0,5 % de vitamina E. La incorporación del PEG no modificó de forma significativa estos resultados (75 % de fármaco liberado en 105 días).

Paralelamente se realizó un estudio de estabilidad de dex en PBS a 37 °C, para lo que se preparó una solución estándar de dex en PBS y otra en la que se añadió un 1 % de vitamina E. Estas soluciones se envasaron en ampollas de vidrio y se mantuvieron en un baño termostático a 37 °C, simulando las condiciones del ensayo de cesión. A intervalos de tiempo se extrajeron ampollas y se determinó el contenido en dex por HPLC. Como queda recogido en la figura 10 la dex disuelta en PBS sin vitamina E se degrada de forma progresiva en las condiciones del estudio, aumentando la velocidad de degradación al ir aumentando el tiempo de almacenamiento de manera que a los 28 días el porcentaje de dex degradado es del 3 % y a los 100 días del 37 %. En cuanto a la dex disuelta en PBS con vitamina E, no se detecta degradación hasta el día 28 del ensayo momento en el cual se observa una intensa degradación alcanzándose el 35 % de fármaco degradado a los 40 días del ensayo, y manteniéndose esta valor hasta el final del estudio.

Estos resultados resultaron sorprendentes ya que suponíamos un efecto protector frente a la oxidación de dex por parte de la vitamina E, utilizada habitualmente como antioxidante. Sin embargo, podrían justificar los resultados del ensayo de cesión, de manera que el bajo porcentaje de dex detectado en el medio de cesión en los lotes elaborados con vitamina E sería debido a la degradación del fármaco en presencia de esta vitamina a partir de los 28 días del ensayo, cuando la mayor parte de dex permanece dentro de las micropartículas en contacto con la vitamina E.

Con las micropartículas del lote 6, sin vitamina E, se realizaron los ensayos de proliferación celular y apoptosis en células PC12. A partir de los ensayos previos con dex en solución, en los cuales se fijó como la concentración de trabajo 10 μM , se calcula la cantidad de micropartículas necesarias para que se produzca una liberación diaria de dex equivalente a dicha concentración. Con ello se realizó inicialmente el ensayo de proliferación celular. Dicho ensayo no podía prolongarse más de 6 días de

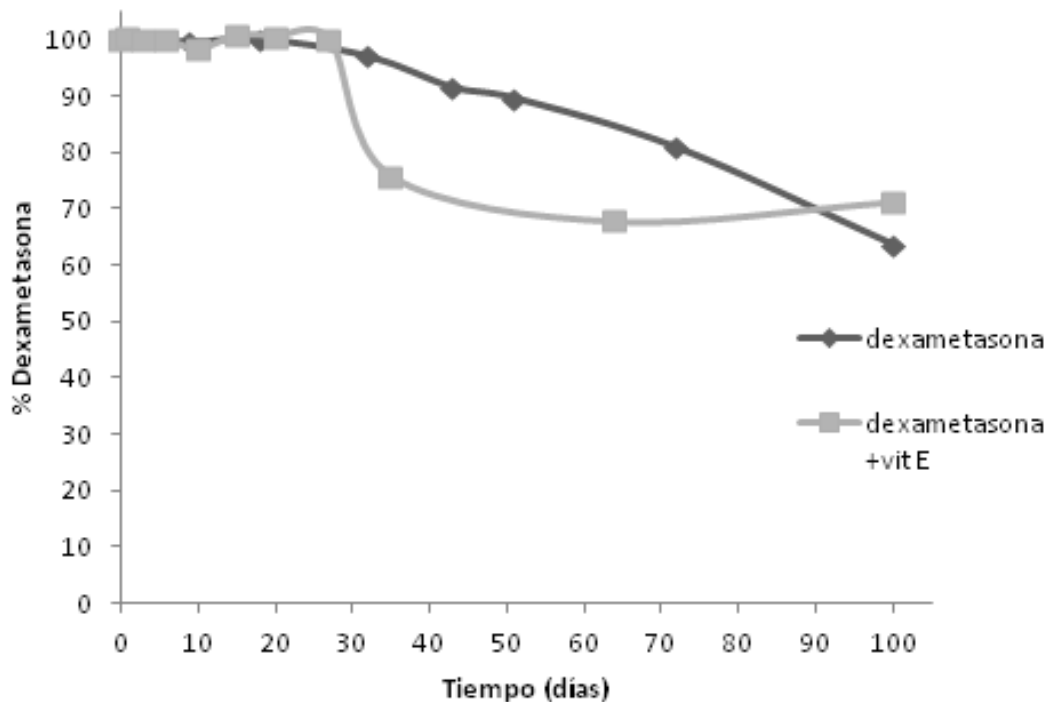


Figura 10: Degradación de dex disuelta en PBS con y sin vitamina E. Las soluciones se envasaron en ampollas de vidrio de 2 ml, y se mantuvieron a 37 °C. Los datos se expresan como porcentaje de dex remanente a cada tiempo de muestreo.

incubación debido al crecimiento de las células en los pocillos control que hacían que estos pudieran llegar a saturarse y las células entraran en una fase de senescencia o muerte celular que podía llevarnos a unos resultados erróneos. Por ello paralelamente se realizó un ensayo de cesión *in vitro* que permitió la incorporación de las micropartículas a los cultivos celulares cuando estas alcanzaban diferentes periodos de liberación de dex; de manera que a los cultivos celulares se fueron incorporando micropartículas extraídas del ensayo de cesión a diferentes tiempos, evaluándose su capacidad de ceder dex durante un periodo de incubación de seis días. Este método nos permitió determinar la efectividad de las micropartículas hasta los 26 días de cesión de dex de las mismas (figura 11).

La citotoxicidad de las micropartículas no cargadas se evaluó de forma paralela a las micropartículas cargadas, no mostrando citotoxicidad en los diferentes tiempos ensayados. Sin embargo, el equivalente a una única administración de micropartículas cargadas produjo el mismo efecto citotóxico que la administración cada 48h de dex en solución mostrando diferencias significativas con respecto a la viabilidad

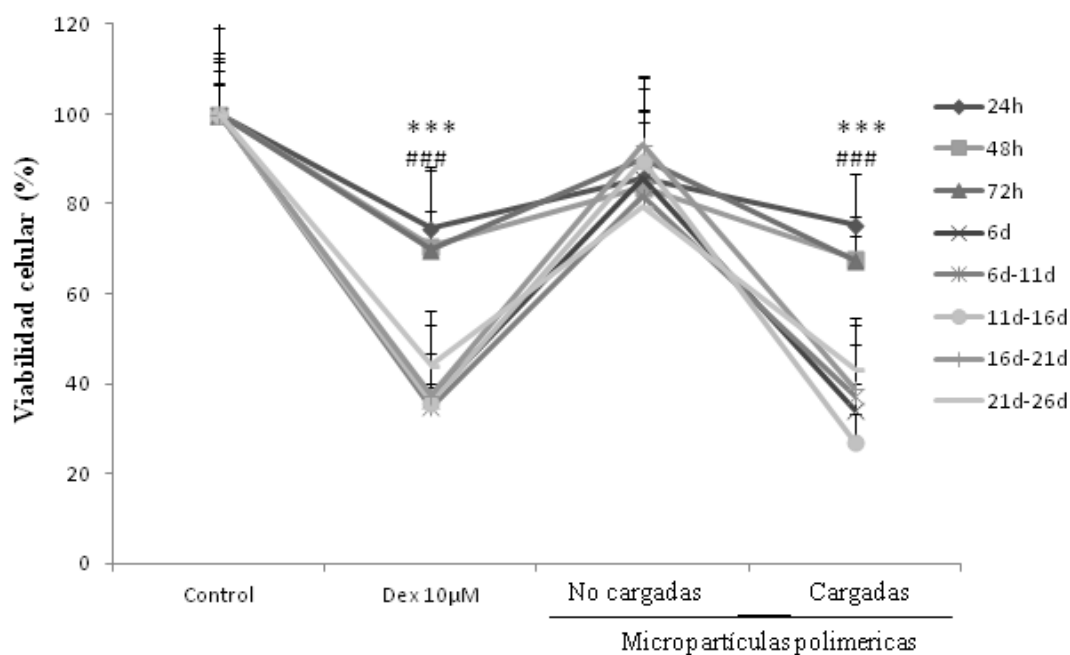


Figura 11: Estudio de citotoxicidad de dex $10 \mu\text{M}$ en solución, micropartículas poliméricas no cargadas y micropartículas poliméricas cargadas después de ceder in vitro dex durante 1 - 26 días. La dex en solución y la liberada desde las micropartículas produjeron una citotoxicidad estadísticamente significativa en todo el periodo estudiado. Las micropartículas no cargadas no produjeron citotoxicidad. Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar de 6 - 12 pocillos de 4 lotes diferentes de células. *** $p < 0,05$ con respecto a la viabilidad celular control. ### $p < 0,05$ con respecto a las micropartículas no cargadas.

control desde el día 1 del ensayo y con las micropartículas no cargadas desde el día 3 de ensayo. Estos resultados pueden corroborarse mediante imágenes tomadas con microscopía óptica en las que se observa como el número de células se reduce significativamente cuando son tratadas con las micropartículas cargadas con respecto a los pocillos control o con respecto a las micropartículas no cargadas (figura 12). En estas fotografías también puede apreciarse cómo al ir avanzando el ensayo de cesión las micropartículas en contacto con las células están cada vez más deformadas, como consecuencia de la progresiva degradación del polímero.

Al realizar los ensayos de inducción apoptótica se observó como el tratamiento de las células tanto con dex en solución como con las micropartículas cargadas provocó la parada del ciclo celular llegando a desaparecer la fase G2 tras 1 día de tratamiento (figura 13). Sin embargo este efecto no se manifiesta con las micropartículas no

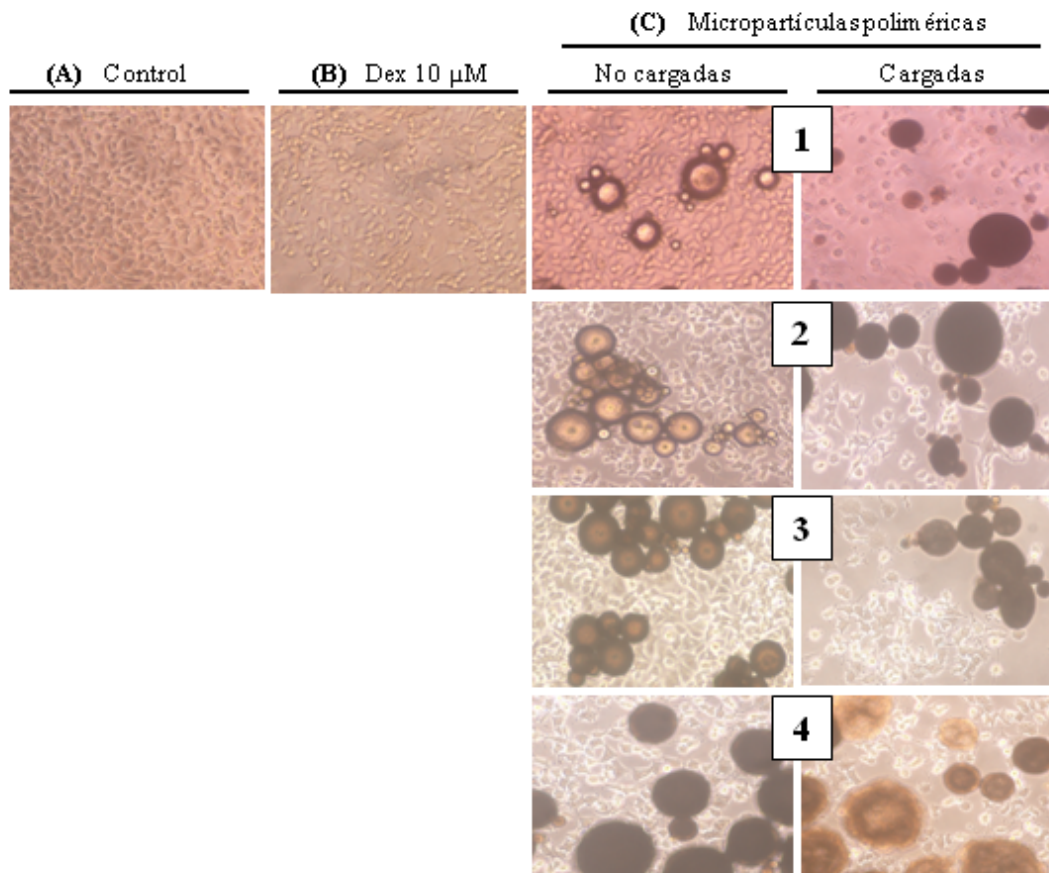


Figura 12: Morfología de las células PC12 después del tratamiento con micropartículas poliméricas. (A) Microfotografía de células control, (B) Células tratadas con dex en solución durante 1 día, (C) Panel izquierdo: células tratadas con micropartículas no cargadas; panel derecho: células tratadas con micropartículas cargadas, a diferentes tiempos de cesión: 1 día (1), 6 días (2), 16 días (3) y 26 días (4).

cargadas. Como ya se ha indicado, el efecto proapoptótico de la dex ha sido descrito en la bibliografía, donde se recoge que los GCs tienen la capacidad de detener el ciclo celular en células de osteosarcoma, hepatoma, glioma y células de tumor de mama, y son capaces, como consecuencia, de desencadenar la muerte celular [15]. Sin embargo, en otros estudios se hace referencia a una disminución de la transición G1 a la fase S, en el caso de células tumorales de tiroide [15], y una parada en el ciclo celular entre G0 y G1 en líneas celulares T de leucemia linfoblástica aguda [26].

En los ensayos de citometría de flujo desarrollados se detectó que tras 2 días de tratamiento se produjo un incremento en la proporción de células apoptóticas estadísticamente significativo respecto al control, alcanzándose un 15,8 % y 19,9 %

de células apoptóticas respectivamente.

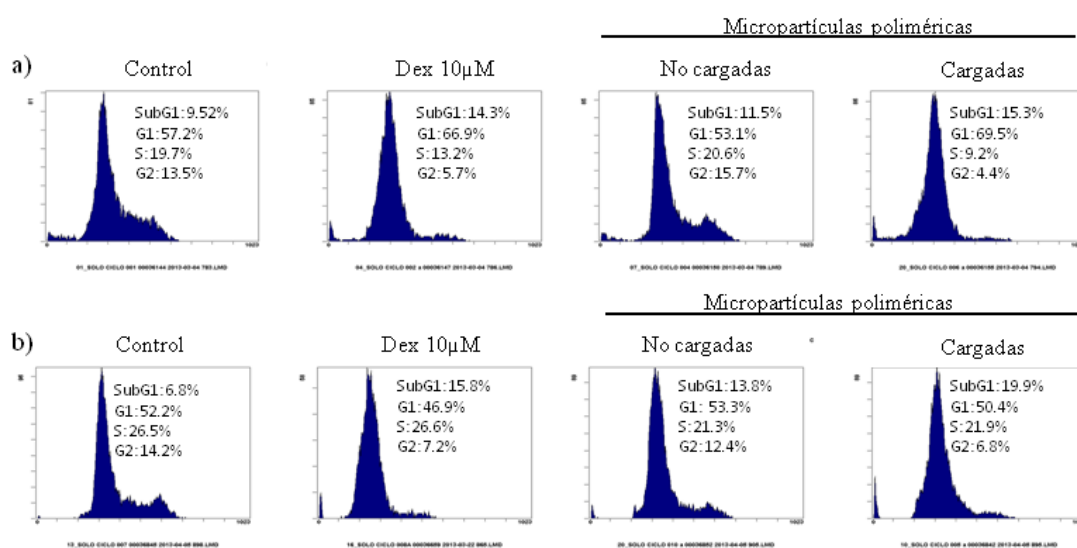


Figura 13: Determinación de apoptosis tras el tratamiento con dex en solución y con micropartículas poliméricas. La figura muestra los ciclos celulares obtenidos mediante citometría de flujo en las células control y en las tratadas con dex en solución (10 μ M), micropartículas poliméricas no cargadas y micropartículas poliméricas cargadas durante 1 día (a) y 2 días (b). Los datos son las medias \pm desviación estándar de 6 experimentos de al menos 6 cultivos diferentes. Cada medida y cada experimento se llevo a cabo por duplicado.

4.3. Desarrollo de micropartículas lipídicas de dex

Para la elaboración de las micropartículas lipídicas de dex se partió de un protocolo inicial basado en el método de atomización (spray drying). Dicho protocolo se basa en la formación de una solución acuosa de ovoalbúmina y lactosa y otra solución etanólica con dex y Lipoid (fosfolípidos de huevo con un 80 % de fosfatidilcolina). Ambas soluciones se mezclan (30/70 v/v) manteniendo dicha mezcla en agitación moderada mientras se atomiza en el spray dryer. El total de sólidos empleados fue de 2 g/l, de los cuales la dex suponía el 10 % y el resto los excipientes. Las micropartículas obtenidas se almacenaron entre 4-8 $^{\circ}$ C. En la figura 14 se describen de forma esquemática las diferentes etapas del proceso.

Para optimizar el proceso, se estudió el efecto de utilizar diferentes proporciones de Lipoid y de la incorporación de distintos tipos de azúcares en las características

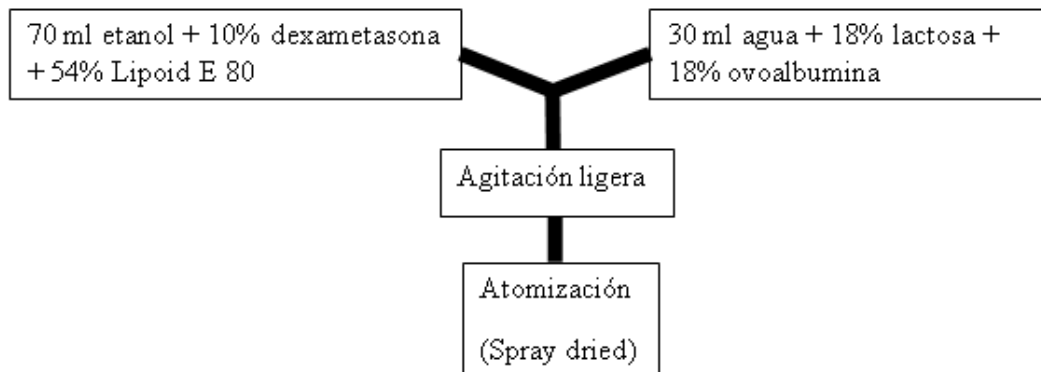


Figura 14: Esquema del protocolo inicial de elaboración de micropartículas lipídicas por atomización.

de las micropartículas obtenidas. Para realizar estas modificaciones en la formulación se mantuvo un total de excipientes del 90 % del total de sólidos, y la misma proporción de ovoalbúmina y de azúcar (tabla 4). Las micropartículas obtenidas se caracterizaron en cuanto a morfología, tamaño, carga de principio activo, compatibilidad entre excipientes, disposición del fármaco en las micropartículas y cinética de cesión *in vitro*. Se busca que las micropartículas obtenidas presenten una morfología regular, con un tamaño superior a $10 \mu\text{M}$ con el fin de evitar que puedan ser fagocitadas de los macrófagos. Estas micropartículas, además, deben tener una alta carga de principio activo y permitir una liberación controlada la dex.

Lote	% Lipoid	Azúcar	Diámetro medio en volumen	Carga (mg Dex / 100 mg MPs)	Eficacia de encapsulación (%)
1	40	Lactosa	$29,8 \pm 10,8$	$8,13 \pm 0,22$	$79,63 \pm 2,21$
2	60	Lactosa	$27,93 \pm 9,71$	$9,5 \pm 0,41$	$94,32 \pm 4,11$
3	70	Lactosa	$19,48 \pm 7,82$	$8,74 \pm 0,21$	$86,27 \pm 2,06$
4	80	Lactosa	$30,42 \pm 18,81$	$9,21 \pm 0,37$	$91,34 \pm 3,69$
5	70	Manitol	$23,15 \pm 11,22$	$9,06 \pm 0,20$	$87,79 \pm 1,96$
6	70	Trealosa	$25,36 \pm 19,26$	$9,23 \pm 0,49$	$89,61 \pm 3,79$

Tabla 4: Características de los distintos lotes de micropartículas lipídicas. Porcentajes de Lipoid expresados con respecto al total de excipientes.

Los resultados obtenidos en la optimización del protocolo de microencapsulación están recogidos en el trabajo (P4).

Con un 40 %, 60 % y 70 % de Lipoid (lotes 1, 2 y 3) se obtuvo directamente un producto pulverulento de flujo libre pero cuando se incrementó la proporción

de Lipoid al 80 % la fluidez del producto obtenido disminuyó significativamente, quedándose fuertemente adherido al ciclón y a las paredes del recipiente recolector del equipo. El tamaño de las micropartículas obtenidas en los lotes 1, 2 y 3 fue determinado por difracción laser, obteniéndose diámetros medios que oscilaron entre 18 y 31 μm , con una distribución unimodal (figura 15e). Estos resultados no se corresponden con las imágenes obtenidas por microscopia electrónica (figura 15a, b, c, d), en donde se observó una intensa agregación en todos los casos, aunque en la mayoría de los lotes, las micropartículas no había perdido su forma esférica y podía distinguirse la morfología individual de las mismas. Este alto estado de agregación observado en las imágenes de microscopia electrónica podría deberse al proceso de obtención de las imágenes, por el cual las muestras fueron sometidas a altas temperaturas y como consecuencia el Lipoid podría haberse fundido parcialmente favoreciendo la formación de agregados.

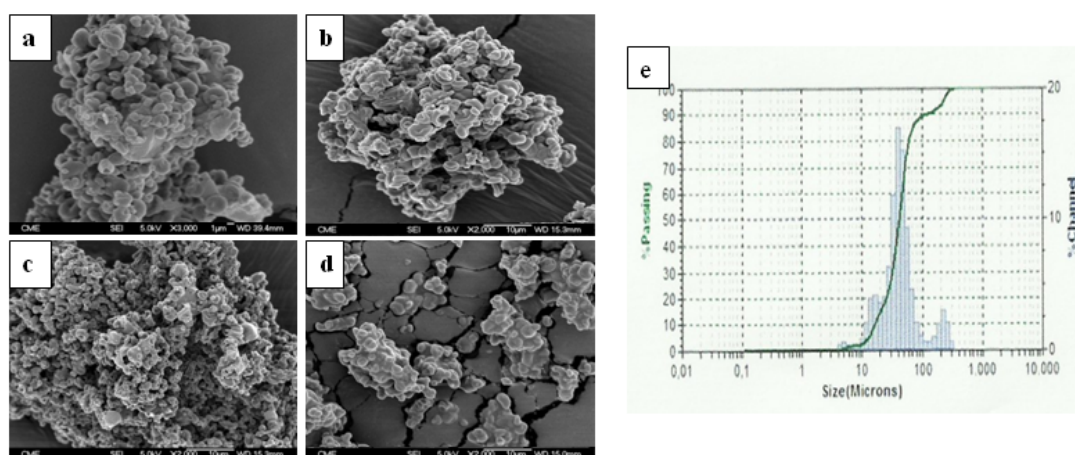


Figura 15: Imágenes de microscopia electrónica de micropartículas lipídicas elaboradas con distintas proporciones de Lipoid: a) 40 % Lipoid, b) 60 % Lipoid, c) 70 % Lipoid y d) 80 % Lipoid. La figura 15 e) muestra la distribución de tamaños de las micropartículas del lote 5.

El rendimiento del proceso de microencapsulación fue aproximadamente del 40 % para todos los lotes, salvo para el lote 4, donde dicho rendimiento disminuyó significativamente debido al alto estado de agregación de las micropartículas. Los bajos rendimientos son una importante desventaja de esta técnica de elaboración. Sin embargo, una de las principales ventajas, que compensa este bajo rendimiento es la alta eficacia de encapsulación (tabla 4), obteniendo una carga de fármaco aproximada de 9 mg de dex / 100 mg de micropartículas en todos los lotes.

Para reducir la sensibilidad de las micropartículas lipídicas a la temperatura, debido al bajo punto de fusión del Lipoid, y además, para incrementar su estabilidad física, se modificó la naturaleza del azúcar utilizado en la microencapsulación (lactosa, manitol y trealosa en los lotes 4, 5 y 6, respectivamente). En todos los lotes, las micropartículas obtenidas mantenían su morfología y forma individual, pero mostraron diferentes estados de agregación. El lote elaborado con trealosa fue el que menos agregación mostró, obteniendo un producto fácilmente manejable.

El análisis del tamaño de las micropartículas (tabla 4), concluyó que éste no se vio afectado por la proporción de Lipoid ni por la naturaleza del azúcar empleado. Las micropartículas lipídicas mostraron un tamaño inferior a las poliméricas pero superior a $10 \mu\text{m}$.

Como puede verse en la figura 16b y 16c, los perfiles de liberación de dex a partir de las micropartículas lipídicas fueron significativamente diferentes de los obtenidos con las micropartículas poliméricas, ya que la cesión de dex fue mucho más rápida, alcanzando el 100 % del fármaco liberado tras 24 h de ensayo. La figura 16b muestra las diferentes cinéticas que se obtuvieron a partir de los lotes con diferente proporción de Lipoid. Estos perfiles mostraron que una mayor proporción de Lipoid provoca un mejor control de la liberación del fármaco. Todo el fármaco fue liberado de forma inmediata desde las micropartículas elaboradas con un 40 % y 60 % de Lipoid, pero, sin embargo, en las micropartículas con un 70 % de Lipoid, el 70 % del fármaco fue liberado de forma inmediata durante la primera hora, alcanzando el 100 % de dex liberada en 24 h. Comparando los diferentes lotes de micropartículas con un 70 % de Lipoid elaborados con distintos tipos de azúcares (figura 16c), no se detectaron diferencias en las cinéticas de cesión, siendo el Lipoid el único componente que afecta a la liberación de la dex.

Como conclusión de todos estos ensayos, se seleccionó el lote 6, con un 70 % de Lipoid y con trealosa para los estudios posteriores.

El análisis por DSC de las micropartículas lipídicas fue complejo debido al alto número de excipientes que fueron usados en su elaboración. Primero se analizaron los termogramas de todos los excipientes puros y a continuación se analizaron las mezclas físicas (1:1) de todos los componentes, lo que permitió descartar incompatibilidades químicas entre los componentes. Los termogramas de los componentes puros, así como de las micropartículas del lote 6 se muestran en la figura 17. El termograma del Lipoid puro (figura 17.d) muestra un único evento térmico a $38,5$

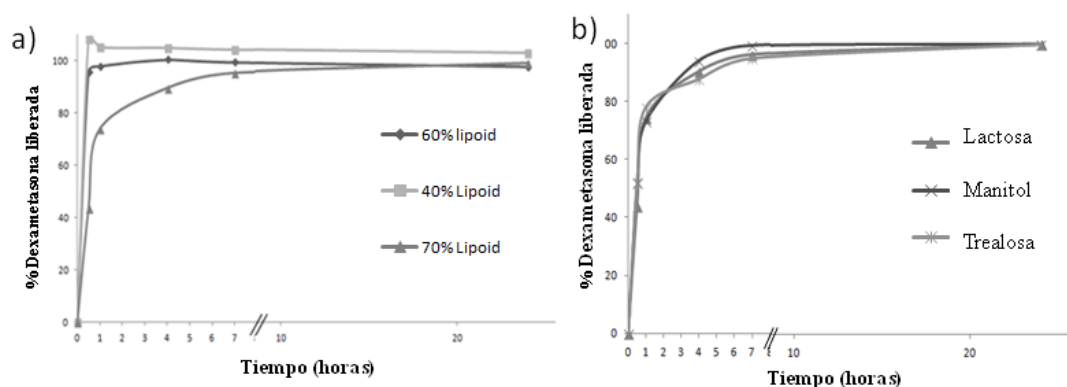


Figura 16: a) Perfiles de liberación de dex desde las micropartículas lipídicas elaboradas con diferentes proporciones de Lipoid. b) Perfiles de liberación de dex desde las micropartículas lipídicas obtenidas con distintos tipos de azúcares. Para los estudios de cesión *in vitro*, las micropartículas fueron incubadas en PBS pH 7,4 en agitación a 37 °C. A intervalos de tiempo predeterminados, el sobrenadante fue retirado y reemplazado con PBS fresco. La concentración de dex en el medio de cesión fue cuantificada por HPLC. Los datos corresponden a la cantidad acumulada de fármaco liberado en el periodo de tiempo indicado, expresada como porcentaje con respecto a la cantidad total de dex en las micropartículas ($n = 3$).

°C con una entalpia (ΔH) de 18,99 J/g, lo cual podría corresponder a la temperatura de fusión de las cadenas alifáticas. Esta temperatura de fusión justifica los resultados obtenidos en las fotografías de micropesografía electrónica anteriormente comentados. En el termograma de las micropartículas, fue difícil caracterizar los picos individuales de cada componente, debido a la baja concentración de los mismos y a la superposición de diferentes picos a una misma temperatura. Sin embargo, la ausencia del pico característico de la dex indica que el fármaco se encuentra disuelto o molecularmente disperso en la matriz lipídica.

El efecto citotóxico de dex incorporada en micropartículas lipídicas se comparó con el producido por dex en solución 10 μM . Como se ha indicado, en los ensayos *in vitro* las micropartículas lipídicas liberaron el 100 % del fármaco microencapsulado en 24 horas. Este dato junto con la carga de las micropartículas se usaron para determinar la cantidad de micropartículas que corresponden a 10 μM de dex. Esta cantidad de micropartículas se utilizó, en una única administración, en el ensayo de proliferación celular que se prolongó durante 3 días, mientras que la dex en solución se incorporó al medio de cultivo celular cada 48 h.

Como muestra la figura 18, las micropartículas lipídicas no cargadas no se mos-

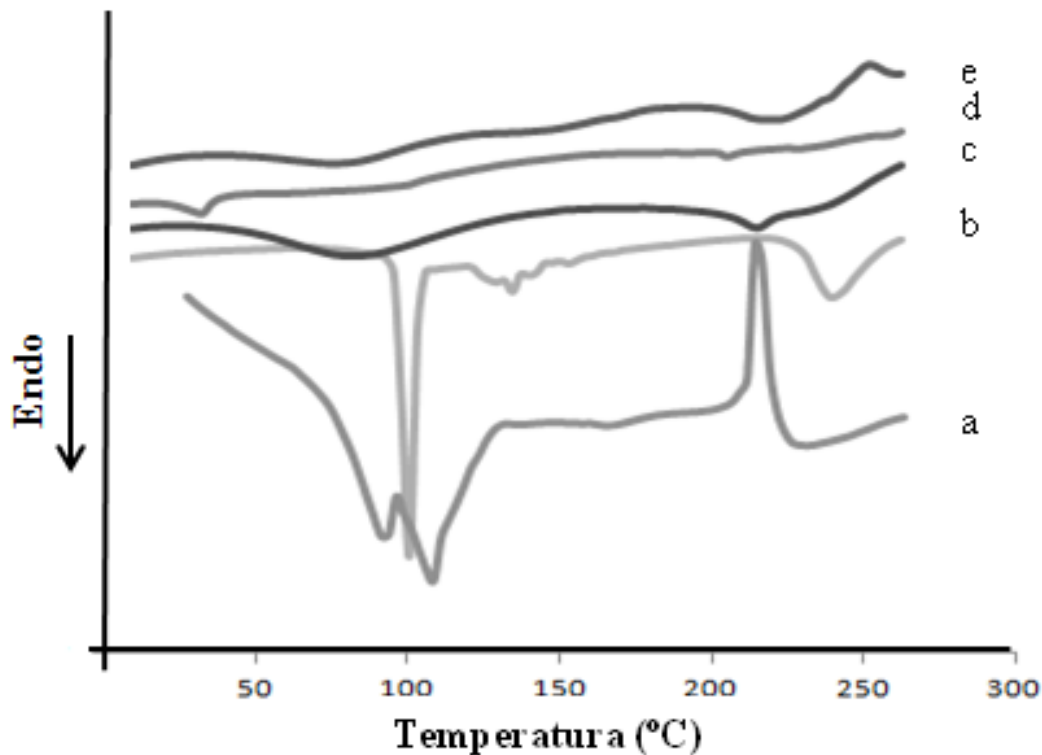


Figura 17: Termogramas obtenidos por DSC, mediante el calentamiento de las muestras a 5 °C/min. dex pura (a), trealosa (b), ovoalbúmina (c), Lipoid (d) y micropartículas del lote 6 (e).

traron citotóxicas, ya que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad celular tras el tratamiento con dichas micropartículas y el control, durante todo el periodo de incubación. Por otro lado, la muerte celular observada tras un día de tratamiento tanto con dex en solución como con las micropartículas cargadas fue estadísticamente significativa con respecto a las células control; y la citotoxicidad producida por ambos tratamientos tras 3 días de ensayo también mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células tratadas con micropartículas no cargadas. También se observa en la figura 18 que las micropartículas lipídicas cargadas con dex presentaron el mismo efecto citotóxico que la dex en disolución, de manera que la incorporación de dex en el transportador lipídico no afectó a su actividad antiproliferativa. A pesar de que el fármaco se libera de las micropartículas en un día, después de tres días de incubación se obtuvieron los mismos resultados con la administración única de las micropartículas lipídicas cargadas que con la dex en solución administrada cada 48 h.

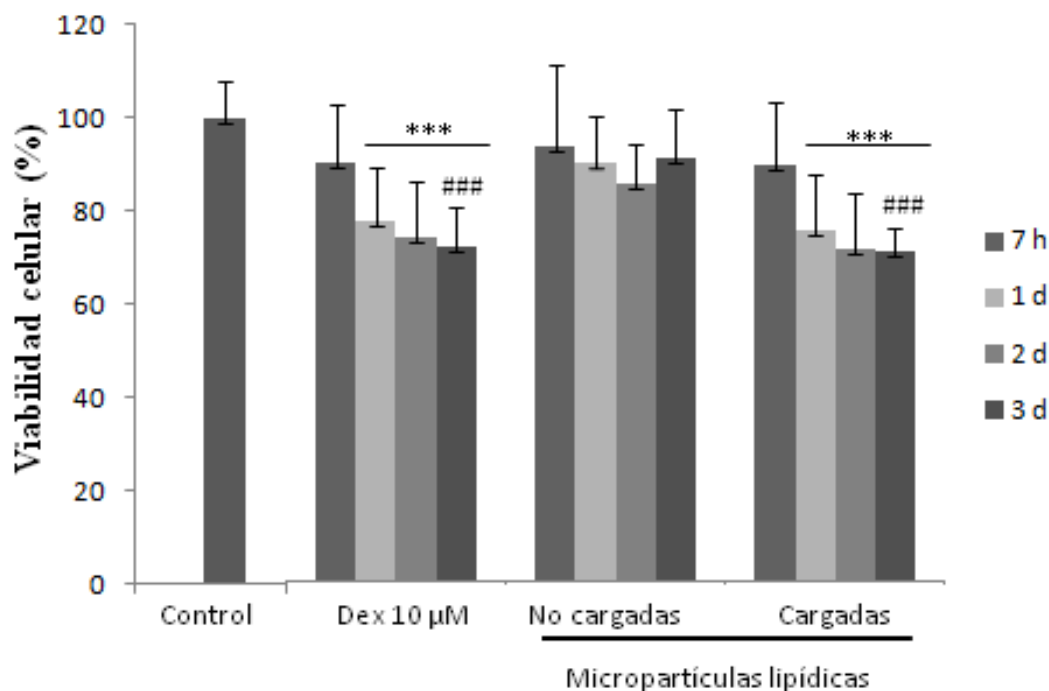


Figura 18: Curva tiempo-respuesta del efecto citotóxico de las micropartículas lipídicas. La figura muestra el efecto citotóxico de dex en solución $10 \mu\text{M}$, micropartículas lipídicas no cargadas y micropartículas lipídicas cargadas, medido como porcentaje de la viabilidad celular, en células expuestas durante 7 horas, 1, 2 y 3 días. Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar de 6 - 12 pocillos de cuatro lotes diferentes de células. *** $p < 0,05$ con respecto al control. ### $p < 0,05$ con respecto a las micropartículas no cargadas.

Durante el ensayo de citotoxicidad se observó la morfología celular utilizando un microscopio óptico. Las células control mostraron la morfología clásica poligonal de las células PC12. Esta morfología también se observó en las células tratadas con dex en solución. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con micropartículas lipídicas (cargadas o no cargadas) perdieron su morfología clásica (Figura 19).

Esta alteración de la morfología celular se cree debida a una interacción física entre las micropartículas lipídicas y las células; que podría estar facilitada por el constituyente fosfolipídico de las micropartículas lipídicas (Lipoid). Para confirmarlo, el ensayo se repitió usando un sistema que permite separar las células de las micropartículas, pero compartiendo el mismo medio y, además, que permite que la dex liberada desde las micropartículas afecte a las células. Este nuevo ensayo fue llevado a cabo durante 3 días de tratamiento, observando que las células no mos-

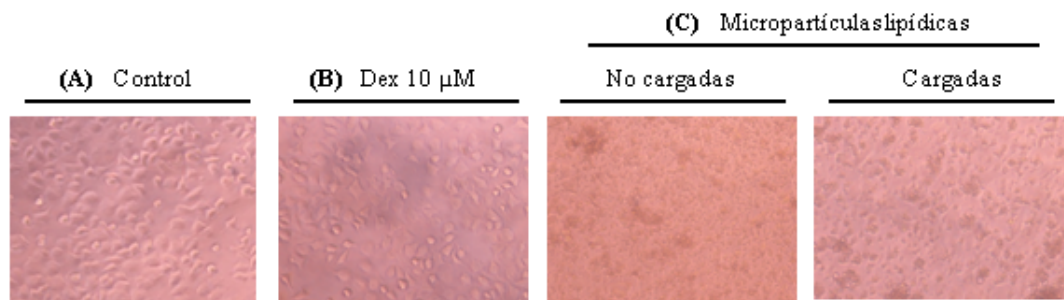


Figura 19: Morfología de las células PC12 tras 3 días de tratamiento con dex en solución, micropartículas lipídicas no cargadas y micropartículas lipídicas cargadas.

traron ninguna alteración morfológica después de este periodo. Al mismo tiempo, la viabilidad celular no mostró diferencias con respecto a los datos mostrados en la figura 17, confirmando que la citotoxicidad no fue causada por una interacción física directa entre las microcápsulas lipídicas y las células.

A partir de los resultados de la figura 13, se estableció un tiempo de 48 h como el tiempo óptimo de estudio de la inducción de la apoptosis para la dex en solución y las micropartículas poliméricas cargadas. Por esta razón se usó el mismo periodo de incubación para los análisis con las micropartículas lipídicas. Los análisis FACS se muestran en la figura 20 para el control, dex en solución, las micropartículas lipídicas no cargadas y las micropartículas lipídicas cargadas, respectivamente. Las micropartículas lipídicas no cargadas no produjeron un incremento en la apoptosis. Sin embargo, en las células tratadas con dex en solución y con micropartículas lipídicas cargadas se observó la desaparición de la mayoría de la fase G2. La apoptosis inducida por la dex en solución y las micropartículas lipídicas cargada fue estadísticamente significativa frente al control pero aún más interesante fue que las micropartículas lipídicas cargadas produjeron una apoptosis aproximadamente un 17,9 %, mayor (estadísticamente significativo) que la obtenida con dex en solución. Estos resultados podrían justificarse por la liberación de los fosfolípidos desde las micropartículas, los cuales podrían modificar la permeabilidad celular, facilitando la internalización de dex en la célula o su interacción a nivel mitocondrial. La alteración de la mitocondria se ha relacionado con la apoptosis producida por los GCs, aunque el mecanismo no está muy claro. La dex induce cambios en las propiedades de la membrana mitocondrial que junto con la disminución de expresión de transportadores mitocondriales de sustratos y proteínas puede conducir a la represión de la actividad respiratoria mitocondrial, y los bajos niveles de ATP contribuirían a la

apoptosis inducida por GCs [26].

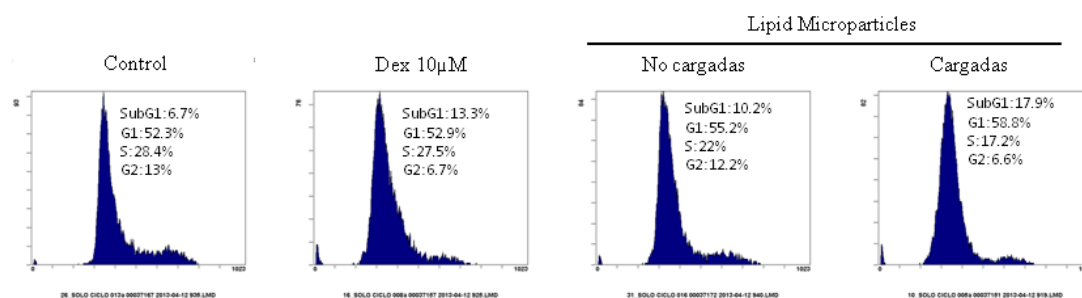


Figura 20: Inducción apoptótica producida por dex. Resultados obtenidos por citometría de flujo de células control, células tratadas con dex en solución 10 μ M, células tratadas con micropartículas cargadas y células tratadas con micropartículas no cargadas tras 2 días de ensayo.

Con la hipótesis de que los fosfolípidos presentes en las micropartículas lipídicas son los responsables de favorecer la internalización de dex en la célula y potenciar su efecto apoptótico, se procedió a evaluar el efecto de las micropartículas lipídicas cargadas en células PC3 y U373. En los estudios previamente descritos con dex en solución, estas células fueron resistentes, es decir, que no fue detectado ningún efecto citotóxico cuando las células PC3 y U373 fueron tratadas con diferentes concentraciones de dex en solución. El mecanismo en que se basa el desarrollo de la resistencia a GCs es complejo y no está totalmente aclarado. Los datos actualmente disponibles sugieren que no hay un mecanismo principal responsable de dicha resistencia, sino varios que actúan solos o en combinación. Por ejemplo, la resistencia a los GCs puede ocurrir si isoformas inactivas del receptor de GCs están presentes de forma mayoritaria o si miembros de la familia de transportadores ABC están sobreexpresados, o si los mecanismos de apoptosis están inhibidos. Un alto número de artículos indican que la activación de mTOR (diana de la rapamicina en mamíferos) desencadena mecanismos que contribuyen a la resistencia por GCs en enfermedades hematológicas, por lo que se ha investigado el empleo de un inhibidor selectivo de mTOR para sensibilizar a células resistentes al tratamiento con dex [27].

Cuando se trataron las células resistentes a dex PC3 y U373 se obtuvieron los resultados recogidos en la figura 21. Como muestra la figura 21.a, las micropartículas lipídicas cargadas inducen citotoxicidad estadísticamente significativa en las células PC3, mientras que con dex en solución y con las micropartículas lipídicas no cargadas no se detectó citotoxicidad tras 48 h de incubación. Por el contrario,

en las células U373 de glioblastoma humano (figura 21.b), el efecto citotóxico de las micropartículas lipídicas cargadas no fue significativo respecto al control. Con estas células llamó la atención el aumento de la viabilidad celular observada cuando fueron tratadas con micropartículas lipídicas no cargadas. Esto nos hizo pensar que quizás algún componente de las micropartículas lipídicas pudiera tener un efecto estimulante de la proliferación celular que pudiera contrarrestar, en parte, el efecto de dex potenciado por los fosfolípidos.

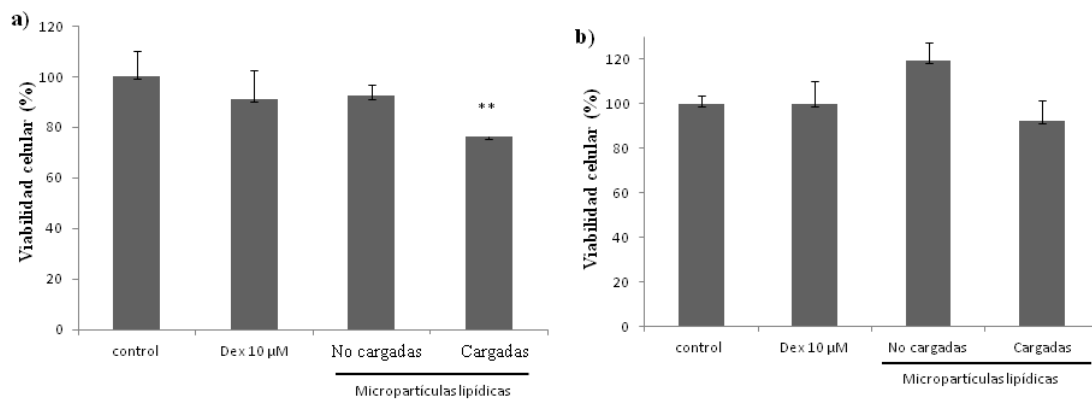


Figura 21: Efecto citotóxico de micropartículas lipídicas en células PC3 (a) y U373 (b). La figura muestra el efecto citotóxico de dex en solución ($10 \mu\text{M}$), micropartículas lipídicas no cargadas y micropartículas lipídicas cargadas tras 48 h de incubación. Los datos se expresan como porcentaje de la viabilidad celular.

En efecto, uno de los componentes de las micropartículas lipídicas es la ovoalbúmina. Dadas las referencias encontradas en la bibliografía sobre el efecto de la albúmina y de la ovoalbúmina sobre la proliferación celular se decidió elaborar micropartículas de ovoalbúmina, libres de fosfolípidos y determinar este efecto sobre la proliferación celular.

4.4. Desarrollo de micropartículas poliméricas de ovoalbúmina

Las proteínas plasmáticas como la albúmina son la principal fuente de energía y nutrientes para el crecimiento de las células tumorales [28,29]. El transporte de la albúmina desde la sangre al intersticio tumoral está mediado, como está descrito en el trabajo (P1), por la glicoproteína de 60 kDa, gp60, también llamada albondin,

que se encuentra localizada en la superficie del endotelio vascular y que parece ser responsable de la transcitosis de la albúmina al favorecer su unión a la caveolina y la posterior formación de caveolas que transportan la proteína al espacio intersticial. Mediante este mecanismo se produce una mayor localización de la albúmina a nivel de los tejidos tumorales, y por ello se ha utilizado en los últimos años para desarrollar diferentes complejos fármaco-albúmina con el fin de vectorizar agentes antitumorales a nivel de las masas tumorales. Una vez en el intersticio tumoral el complejo fármaco-albúmina se une a la proteína SPARC (proteína secretada ácida y rica en cisteína), y es rápidamente internalizada en la célula tumoral. Esta proteína SPARC se encuentra sobreexpresada en diferentes tipos de tumores como el de mama, próstata, esófago, gástrico, colorrectal, hígado, pulmón, riñón, vejiga, garganta, tiroides, melanoma y diferentes tumores cerebrales, y se asocia con un mal pronóstico.

Esta utilización de la albúmina como vector de fármacos antitumorales resulta paradójica si se tiene en cuenta que, por otro lado, se ha demostrado que la albúmina sérica protege contra la muerte celular provocados por diferentes agentes citotóxicos, aunque existen puntos de vista contradictorios sobre el mecanismo de protección. Moran et al. [30] muestran en cultivos que la albúmina protege contra la apoptosis espontánea de las células de leucemia linfática crónica; Taberner et al. [31] muestran que previene la apoptosis y promueve la supervivencia neuronal, y Matsui et al. [32] y Belayev et al. [33] muestran que la albúmina causa neuroprotección en accidente cerebrovascular isquémico agudo. Al igual que la albúmina, Gallego-Sandin et al. [34] han observado que la ovoalbúmina protege a células de neuroblastoma contra la apoptosis, proporcionando neuroprotección a partir de una concentración de 30 mg/ml, una concentración aproximadamente 10 veces mayor que la albumina. Aunque el mecanismo de los efectos citoprotectores de la albúmina no está claro, se ha demostrado que la albumina es capaz de unirse a radicales libres previniendo su acumulación en las células, demostrando ser un antioxidante más eficaz que la vitamina E. Esta propiedad antioxidante de la albumina podría explicar su efecto citoprotector [34].

Para la elaboración de micropartículas de ovoalbúminas libres de fosfolípidos se utiliza el ácido poli láctico-co-glicólico, y la técnica de evaporación del solvente basada en la formación de una emulsión doble (A/O/A) [35]. Sin embargo, esta técnica presenta tres importantes limitaciones para microencapsular proteínas: baja capacidad de carga, intenso efecto burst durante la liberación de la proteína, e

inactivación de la proteína durante el proceso de microencapsulación, principalmente por desnaturalización y formación de agregados.

En el trabajo P5 se recogen las diferentes estrategias de formulación utilizadas para optimizar un protocolo de obtención de micropartículas cargadas con ovoalbúmina en cuanto a carga y liberación de la misma.

Se partió de un protocolo de microencapsulación inicial [36] (figura 22) en el que se forma una primera emulsión A/O con 1 ml de una solución acuosa de ovoalbúmina (30 mg/ml) y 5 ml de diclorometano (DCM) que contienen 300 mg de polímero láctico-co-glicólico. Después de su homogeneización (8000 rpm por 2 min), la emulsión resultante se añade a 1000 rpm sobre 30 ml de solución acuosa con un 5% p/v de alcohol polivinílico (PVA). La doble emulsión obtenida (A/O/A) se somete a agitación magnética durante 18h a temperatura ambiente para extraer el DCM. Finalmente, las micropartículas fueron recolectadas por centrifugación a 2000 rpm durante 5 min, resuspendidas con agua y nuevamente centrifugadas. Este proceso se repitió 3 veces para eliminar posibles restos de PVA. Por último, las micropartículas fueron liofilizadas y se almacenaron a 4-8 °C.

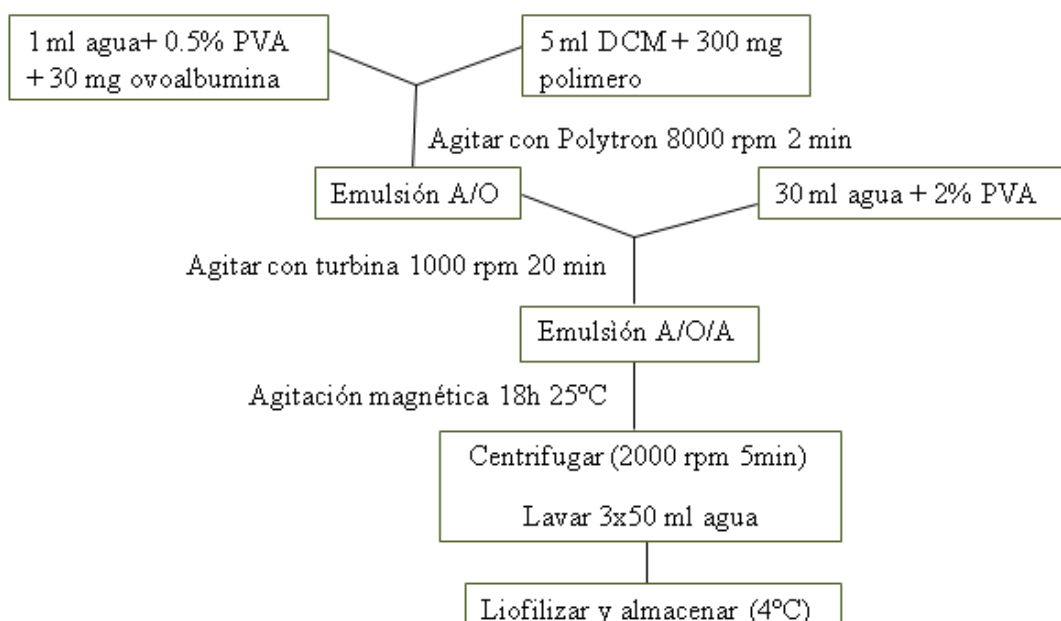


Figura 22: Esquema del protocolo inicial de elaboración de micropartículas poliméricas de ovoalbúmina mediante evaporación del solvente a partir de una doble emulsión A/O/A.

Para la optimización de este protocolo se analizó el efecto de la incorporación de

NaCl en la fase externa acuosa, el efecto de la naturaleza del polímero, el efecto de la concentración de PVA en la fase externa acuosa, el efecto de la modificación del solvente orgánico y el efecto de incorporar agentes viscosizantes en la fase interna acuosa y/o en la fase orgánica. Estas modificaciones realizadas sobre el protocolo inicial aparecen recogidas en la tabla 5.

Lote	Polímero	Solvente fase orgánica	Fase externa acuosa	Solvente fase interna acuosa
1	RG504	DCM	2 % PVA	1 ml Agua
2	RG504	DCM	2 % PVA 5 % NaCl	1 ml Agua
3	RG504H	DCM	2 % PVA 5 % NaCl	1 ml Agua
4	RG502	DCM	2 % PVA 5 % NaCl	1 ml Agua
5	RG756S	DCM	2 % PVA 5 % NaCl	1 ml Agua
6	RG504	DCM	5 % PVA 5 % NaCl	1 ml Agua
7	RG504	Acetato de etilo	2 % PVA 5 % NaCl	1 ml Agua
8	RG504	DCM	2 % PVA 5 % NaCl	1 ml PBS pH 7,4
9	RG504	DCM	2 % PVA 5 % NaCl	1 ml Agua 0,5 % PVA
10	RG504	DCM	2 % PVA 5 % NaCl	1 ml Agua+500 μ l PEG 400
11	RG504	DCM	2 % PVA 5 % NaCl	1 ml Agua+100 mg PEG 4000
12	RG504	DCM+100 mg PEG 4000	2 % PVA 5 % NaCl	1 ml Agua
13	RG504	DCM+100 mg PEG 4000	2 % PVA 5 % NaCl	1 ml Agua+500 μ l PEG 400

Tabla 5: Condiciones experimentales evaluadas en la optimización de micropartículas poliméricas de ovoalbúmina.

El contenido en OVA de las micropartículas se determinó mediante un ensayo de determinación de proteínas con ácido bicinconínico (BCA). Una vez rotas las micropartículas con hidróxido sódico durante 24 h en un baño termostático a 37 °C, la solución se neutraliza con ácido clorhídrico y se centrifuga. El sobrenadante se analiza espectrofotométricamente a 562 nm para determinar la concentración de ovoalbúmina. La cantidad de proteína se determinó a partir de una curva de calibrado en un intervalo de 25-250 μ g/ml ($r = 0,998$). La cantidad de ovoalbúmina liberada desde las micropartículas al medio de cesión también fue determinada usando un ensayo de determinación de proteínas con ácido bicinconínico, en este caso microBCA, utilizando una curva de calibrado en un intervalo de 0,5-20 μ g/ml ($r = 0,996$).

Usando el protocolo inicial (lote 1), se obtuvieron micropartículas de ovoalbúmina con un diámetro medio de $55,9 \pm 19,12 \mu$ m; pero el rendimiento del proceso fue inferior al 50 % y la cantidad de proteína microencapsulada fue menor que el límite de cuantificación del método analítico. Los valores del rendimiento del proceso de

elaboración de todos los lotes que fueron obtenidos se representan en la figura 23, los valores de tamaño de las micropartículas se recogen en la figura 24, y los valores de carga y eficacia de encapsulación se resumen en la tabla 6.

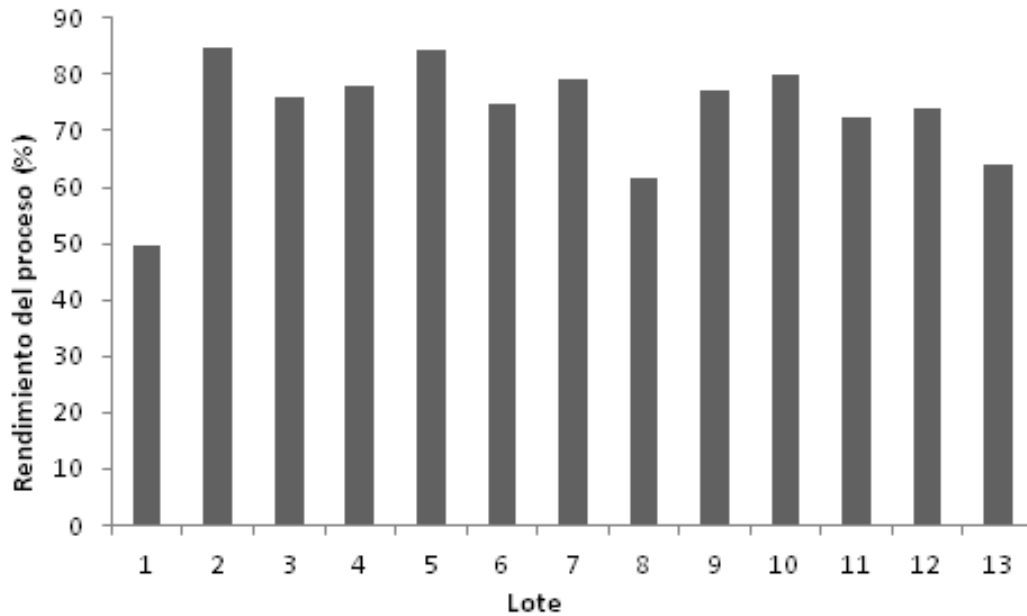


Figura 23: Rendimientos obtenidos en los diferentes procesos de microencapsulación.

Lote	Carga (μg OVA/mg Mp)	Eficacia de encapsulación (%)
1	<3	<3
2	37,13	34,27
3	3,92	3,94
4	<3	<3
5	<3	<3
6	33,13	32,27
7	<3	<3
8	<3	<3
9	59,3	63,03
10	30,74	31,72
11	24,09	24,68
12	<3	<3
13	55,94	59,26

Tabla 6: Valores de carga y eficacia de encapsulación que fueron obtenidos en los diferentes lotes elaborados.

La incorporación de NaCl en la fase externa acuosa produjo un incremento sig-

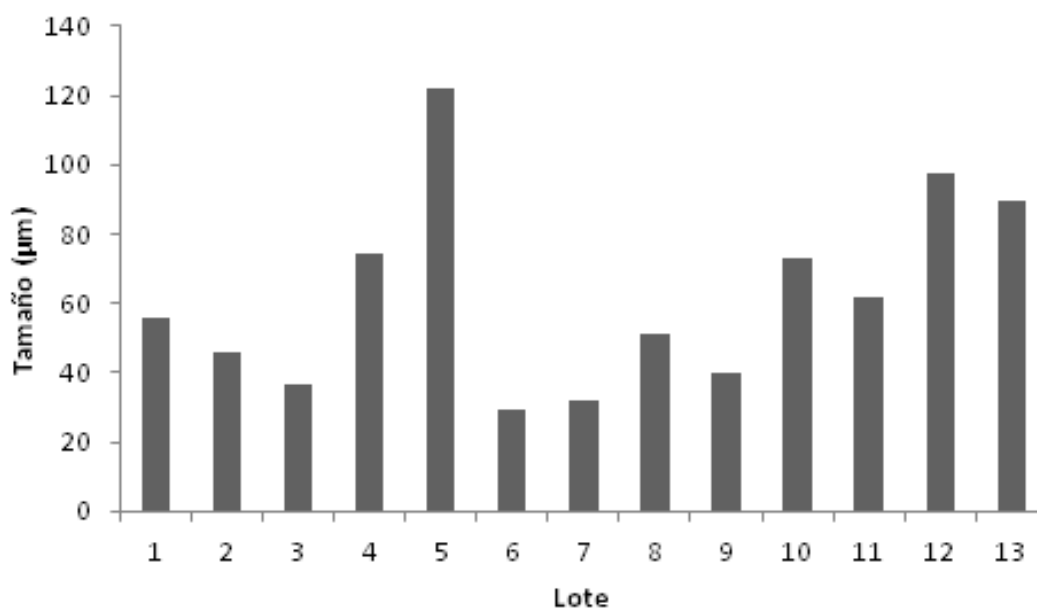


Figura 24: Tamaño medio de las micropartículas, expresado como el diámetro medio en volumen (vmd) en μm .

nificativo del rendimiento del proceso y de la eficacia de encapsulación, sin afectar a la morfología de las micropartículas [37-39]. Se utilizaron diferentes copolímeros de poli láctico-co-glicólico 50:50 (RG502, RG504 y RG504H) y 85:15 (RG756S), observándose que con el polímero de menor peso molecular (RG502) se obtuvieron micropartículas rotas y que con el resómero RG756S (el polímero de mayor peso molecular) se obtuvieron micropartículas con poros en su superficie [40]. Además, el polímero empleado influyó significativamente en la carga de las micropartículas, de forma que cuanto mayor fue la hidrofilia del polímero y menor su peso molecular, la eficacia de encapsulación obtenida fue menor, de manera que con el resómero RG504 se obtuvieron micropartículas con una alta carga.

El incremento en la concentración de PVA en la fase externa acuosa dio lugar a micropartículas con menor tamaño, mayor tendencia a la agregación y baja carga [41]. Cuando el diclorometano fue sustituido por acetato de etilo como solvente [40,41] de la fase orgánica se obtuvieron micropartículas con una alta porosidad, rotas y con niveles de carga de la ovoalbúmina indetectables.

Sin embargo, la estrategia más interesante estudiada para incrementar la carga en las micropartículas fue la incorporación de agentes viscosizantes en la fase interna

acuosa y en la fase orgánica [38,39,42]. Se utilizaron PVA, PEG 400 y PEG 4000. Cuando se añadió PEG a la fase interna acuosa, se obtuvieron micropartículas de mayor tamaño y más porosas. Sin embargo, cuando se usó PVA 0,5% no se observaron cambios en el tamaño ni en la morfología de las micropartículas pero sí hubo un significativo incremento de la carga y eficacia de encapsulación. Estas micropartículas liberaron la proteína *in vitro* de forma sostenida durante un periodo de 130 días (figura 25). Finalmente, cuando se añadió PEG en la fase interna acuosa (PEG 400) y en la fase orgánica (PEG 4000), también se obtuvieron micropartículas con una alta carga, pero, sin embargo, sólo el 30% de la proteína fue liberada *in vitro* desde las micropartículas después de 130 días.

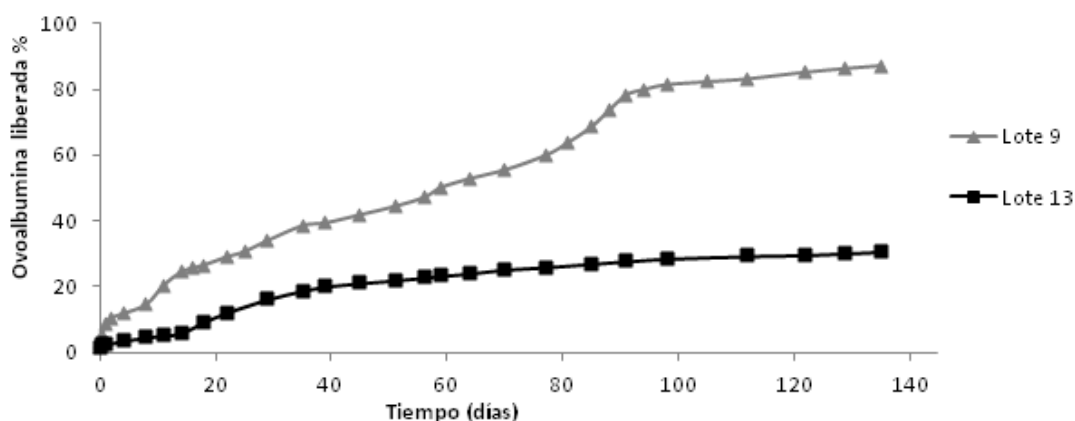


Figura 25: Perfiles de liberación de la ovoalbúmina desde las micropartículas poliméricas obtenidas en el lote 9 y en el lote 13. Para los ensayos *in vitro*, las micropartículas fueron incubadas en PBS (pH 7,4) y mantenidas en agitación a 37 °C. A periodos de tiempo predeterminados, el sobrenadante se retira y se reemplaza por PBS atemperado. La concentración de la ovoalbúmina en el medio de cesión fue cuantificada por microBCA. Los datos corresponden a la cantidad de proteína liberada acumulada al periodo de tiempo ensayado y expresada como porcentaje medio con respecto al total de ovoalbúmina en las micropartículas ($n = 3$).

Las micropartículas poliméricas de ovoalbúmina del lote 9 se utilizaron para determinar el efecto sobre la viabilidad celular de la ovoalbúmina. La microencapsulación es un proceso muy agresivo para las proteínas, ya que entran en contacto con disolventes orgánicos y son sometidas a altas fuerzas de cizalla durante las etapas de agitación, lo que podría conducir a una pérdida de actividad de la proteína que no podría ser detectada por los métodos de análisis cuantitativo.

El ensayo de viabilidad celular se llevó a cabo durante 3 días. Se comparó el

efecto de una única administración de micropartículas de ovoalbúmina con la administración diaria de ovoalbúmina en solución a una concentración de $35 \mu\text{g}/\text{mL}$. La cantidad de micropartículas que liberaban dicha cantidad diaria de ovoalbúmina ($35 \mu\text{g}$) se calculó a partir de los resultados del ensayo de cesión, y fue la que se utilizó en el ensayo de viabilidad celular.

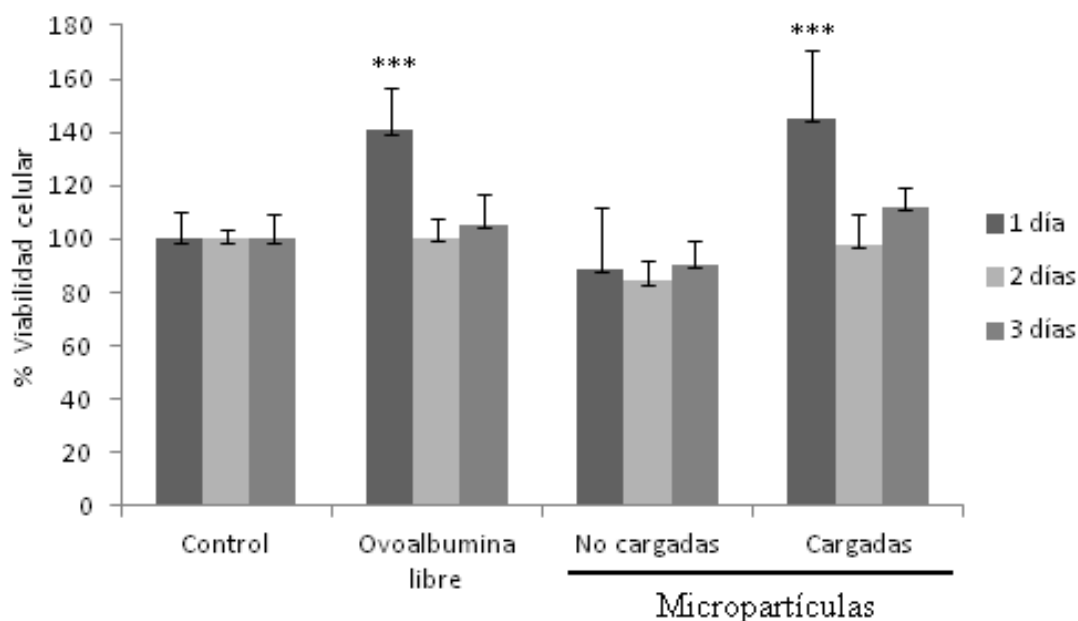


Figura 26: Ensayo de proliferación celular de la ovoalbúmina en solución y de micropartículas poliméricas no cargadas y cargadas durante 1, 2 y 3 días. La ovoalbúmina en solución y las micropartículas cargadas incrementaron significativamente la proliferación celular tras 1 día de exposición. Las micropartículas poliméricas no cargadas no afectaron a la viabilidad celular en el periodo de tiempo ensayado. Los datos corresponden a las medias \pm desviación estándar de 3-6 pocillos de 3 lotes diferentes de células. *** $P < 0,05$ con respecto a la viabilidad celular control y de las micropartículas no cargadas (ANOVA).

Como muestra la figura 26, tanto la ovoalbúmina en solución como la liberada a partir de las micropartículas produjo un aumento de la viabilidad celular próximo a un 50% después de un día de exposición. Al alargar el ensayo a 3 días este incremento en la viabilidad celular fue menos significativo. Estos resultados mostraron que, en efecto, la ovoalbúmina presenta un efecto estimulante de la proliferación celular, pero que se manifiesta de manera especialmente significativa durante el primer día de incubación, y que la administración continua de ovoalbúmina no mantiene esta intensa estimulación de la proliferación celular. Además, el ensayo sirvió para verificar que la integridad y estabilidad de la proteína no estuvo afectada por el

procedimiento de microencapsulación desarrollado y optimizado.

También se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular con albúmina sérica bovina (BSA) en solución para comparar su efecto citoprotector con el de la ovoalbúmina, ya que como se indicaba anteriormente, Gallego-Sandin et [34] al observaron que la BSA era unas 10 veces más potente que la ovoalbúmina en células de neuroblastoma. Para ello, se realizó el ensayo con células PC12 incubadas durante 1 y 2 días con distintas concentraciones de BSA. Sin embargo, como muestra la figura 27, fue necesaria una concentración de BSA 7 veces mayor que la empleada con la ovoalbúmina para obtener el mismo efecto sobre la viabilidad celular en estas células.

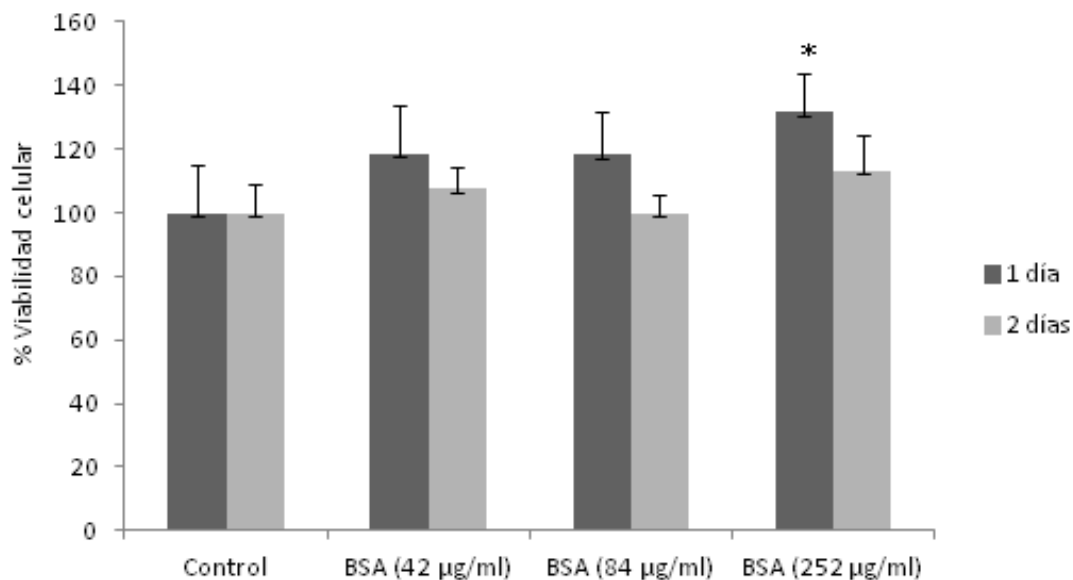


Figura 27: Ensayo de proliferación celular de BSA en solución durante 1-2 días. BSA en solución incremento significativamente la proliferación celular tras un día de exposición con una concentración de 252 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los datos corresponden a las medias \pm desviación estándar de 3-6 pocillos de 3 lotes diferentes de células. * $P < 0,05$ con respecto a la viabilidad celular control (ANOVA).

Todos estos resultados nos llevan a plantear la continuación de esta interesante línea de investigación con: el desarrollo de micropartículas lipídicas de dex libres de albúmina, el estudio en profundidad del mecanismo por el cual inducen apoptosis en diferentes líneas celulares y su capacidad de revertir la resistencia de algunas líneas celulares a este GC.

Bibliografía

- [1] Agarwal R, Linch M, Kaye SB (2006) Novel therapeutic agents in ovarian cancer. *Eur J Surg Onco* 32:875-886
- [2] Martin C. Garnett (2001) Targeted drug conjugates: principles and progress. *Adv Drug Deliv Rev* 53:171-216
- [3] 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
- [4] Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP et al (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 95:4607-4612
- [5] Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohalm J, Ulbrich K, Akaike T et al (1998) Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *J. Cancer Res.* 89:307-314
- [6] Kipp JE (2004) The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm* 284:109-22
- [7] Rabinow BE (2004) Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 3:785-96
- [8] Broxterman HJ, Georgopapadakou NH (2005) Anticancer therapeutics: “addictive” targets, multi-targeted drugs, new drug combinations, *Drug Resist Updat* 8:183-197.
- [9] Hong D, Chen HX, Yu HQ, Wang C, Deng HT, Lian QQ, Ge RS (2011) Quantitative proteomic analysis of dexamethasone-induced effects on osteoblast differentiation, proliferation, and apoptosis in MC3T3-E1 cells using SILAC. *Osteoporos. Int.* 22:2175-2186.
- [10] Arends MJ, Wyllie AH (1991) Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology. *Int Rev exp Pathol.* 32:223-254.
- [11] Wyllie AH (1992) Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metast Rev.* 11:95-103.

[12] Gershenson LE, Rote RJ (1992) Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* 6:2450-2455.

[13] Parchment RE (1993) The implications of a unified theory of programmed cell death, polyamines, oxyradicals, and histogenesis in the embryo. *Int J Dev Biol.* 37:75-83.

[14] Sachs L, Lotem J (1993) Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. *Blood.* 82:15-21.

[15] Chung YJ, Lee JI, Chong S, Seok JW, Park SJ, Jang HW et al (2011) Anti-proliferative effect and action mechanism of dexamethasone in human medullary thyroid cancer cell line, *Endocr. Res.* 36(4):149-157.

[16] Higgins SC, Pilkington GJ (2010) The in vitro effects of tricyclic drugs and dexamethasone on cellular respiration of malignant glioma, *Anticancer Res.* 30:391-398.

[17] Elhamdani A, Brown ME, Artalejo CR, Palfrey HC (2000) Enhancement of the Dense-Core Vesicle Secretory Cycle by Glucocorticoid Differentiation of PC12 Cells: Characteristics of Rapid Exocytosis and Endocytosis. *J. Neurosci.* 20(7):2495-2503.

[18] Green KN, Taylor SC, Smith IF, Peers C (2001) Differential coupling of voltage-gated Ca²⁺ channels to catecholamine from separate PC12 cell batches, *Neurosci. Lett.* 301:13-16.

[19] Van Der Laan S, Sarabdjitsingh RA, Van Batenburg MS, Lachize SB, Li H, Dijkmans TF, Vreugdenhil E, Ron de Kloet E, Meijer OC (2008) Chromatin immunoprecipitation scanning identifies glucocorticoid receptor binding regions in the proximal promoter of a ubiquitously expressed glucocorticoid target gene in brain, *J. of Neurochem.* 106:2515-2523.

[20] Chen JL, Chiang CH, Yeh MK (2004) The mechanism of surface-indented protein-loaded PLGA microparticle formation: the effects of salt (NaCl) on the solidification process. *J. Microencapsul.* 21(8):877-888.

[21] Cho SW, Song SI, Choi YW (2000) Effects of solvent selection and fabrication method on the characteristics of biodegradable Poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing ovalbumin. *Arch. Pharm Res.* 23(4):385-390

[22] Kim HK, Park TG (1999) Microencapsulation of Human Growth Hormo-

ne within Biodegradable Polyester Microspheres: protein aggregation stability and incomplete release mechanism. *Biotechnol. Bioeng.* 65(6):659-666.

[23] Le Visage C, Quaglia F, Dreux M, Ounnar S, Breton P, Bru N, Couvreur P, Fattal E (2001) Novel microparticulate system made of poly(methylidene malonate 2.1.2). *Biomaterials.* 22:2229-2238.

[24] Jaraswekin S, Prakongpan S, Bodmeier R (2007) Effect of poly(lactide-co-glycolide) molecular weight on the release of dexamethasone sodium phosphate from microparticles. *J. Microencapsul.* 24(2):117-128.

[25] Hernan Perez de la Ossa D, Gil-Alegre ME, Ligresti A, Aberturas MR, Molpeceres J, Torres AI, Di Marzo V (2013) Preparation and characterization of Delta(9)-tetrahydrocannabinol-loaded biodegradable polymeric microparticles and their antitumoral efficacy on cancer cell lines. *J. Drug target.* 21(8):710-8.

[26] Eberhart K, Rainer J, Bindreither D, Ritter I, Gnaiger E, Kofler R, Oefner PJ, Renner K (2011) Glucocorticoid-induced alterations in mitochondrial membrane properties and respiration in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Biochim. Biophys. Acta.* 1807:719-725.

[27] Anderson DJ, Michelson AM (1989) Role of glucocorticoids in the chromaffin-neuron developmental decision. *Int. J. Dev. Neurosci.* 12:83-94.

[28] Elsadek B, Kratz F (2012) Impact of albumin on drug delivery-New applications on the horizon. *J Control Release.* 157:4-28

[29] Stehle G, Sinn H, Wunder A, Schrenk HH, Stewart JC, Hartung G, Maier-Borst W et al (1997) Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself-implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 26:77-100

[30] Moran EC, Kamiguti AS, Cawley JC, Pettit AR (2002) Cytoprotective antioxidant activity of serum albumin and autocrine catalase in chronic lymphocytic leukaemia. *Brit. J. Haematol.* 116:316-328

[31] Taberner A, Granda B, Medina A, Sánchez-Abarca LI, Lavado E, Medina JM (2002) Albumin promotes neuronal survival by increasing the synthesis and release of glutamate. *J. Neurochem.* 81(4):881-891.

[32] Matsui T, Sinyama H, Asano T, Muizelaar JP, Rosenwasser RH (1993) Beneficial effect of prolonged administration of albumin on ischemic cerebral edema and

infarction after occlusion of middle cerebral artery in rats. *Neurosurgery*. 33(2):293-300.

[33] Belayev L, Liu Y, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD (2001) Human Albumin Therapy of Acute Ischemic Stroke. Marked neuroprotective efficacy at moderate doses and with a broad therapeutic window. *Stroke*. 32:553-560

[34] Gallego-Sandín S, Novalbos J, Rosado A, Cano-Abad MF, Arias E, Abad-Santos F, García AG (2005) Albumin prevents mitochondrial depolarization and apoptosis elicited by endoplasmic reticulum calcium depletion of neuroblastoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 520:1-11.

[35] Bodmeier D, Kissel T, Traechslin E (1992) Factors influencing the release of peptides and proteins from biodegradable parenteral depot systems. *J. Control. Release*. 21:129-137.

[36] Ogawa Y, Yamamoto M, Okada H, Yashiki T, Shimamoto T (1988) A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsule of copoly(lactide-co-glycolic acid). *Chem. Pharm. Bull.* 36:1095-1103.

[37] Chen JL, Chiang CH, Yeh MK (2002) The mechanism of PLA microparticle formation by water-in-oil-in-water solvent evaporation method. *J. Microencapsulation*. 19(3):333-346.

[38] Dorati R, Genta I, Montanari L, Cilurzo F, Buttafava A, Faucitano A, Conti B, (2005) The effect of gamma-irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin. *J. Control Release*. 107, 78-90.

[39] Dorati R, Genta I, Tomasi C, Modena T, Colonna C, Pavanetto F et al (2008) Poly(ethylene glycol-co-poly-D,L-lactide) copolymer based microspheres: Preparation, characterization and delivery of a model protein. *J. Microencapsulation*. 25(5):330-338.

[40] Le Visage C, Quaglia F, Dreux M, Ounnar S, Breton P, Bru N, Couvreur P, Fattal E (2001) Novel microparticulate system made of poly(methylidene malonate 2.1.2). *Biomaterials*. 22:2229-2238.

[41] Cho SW, Song SI, Choi YW (2000) Effects of solvent selection and fabrication method on the characteristics of biodegradable Poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing ovalbumin. *Arch. Pharm Res.* 23(4):385-390.

[42] Yeh MK, Jenkins PG, Davis SS, Coombes AG (1995) Improving the delivery

capacity of microparticle systems using blends of poly(DL-lactide co-glycolide) and poly(ethyleneglycol). *J. Control Release.* 37:1-9.

5 | Conclusiones

1. Se ha diseñado un protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos en micropartículas de administración parenteral conforme a las directrices ICH y de la USP, pero adaptado al uso previsto de estos métodos: la cuantificación del contenido en fármaco en las micropartículas (ensayo de contenido); y la cuantificación del fármaco liberado a partir de las micropartículas (ensayo de liberación in vitro).

En este protocolo se definen las características de las muestras reales y artificiales utilizadas para evaluar la selectividad, linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud y límite de cuantificación del método analítico y el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos.

2. Se ha puesto a punto y validado, de acuerdo al protocolo previamente diseñado, un método analítico por HPLC para la cuantificación de dexametasona fosfato disodio formulada en micropartículas de ácido poli láctico-co-glicólico para administración parenteral. El método analítico propuesto resultó válido para la cuantificación del fármaco incorporado en las micropartículas al demostrarse su selectividad, linealidad, proporcionalidad, precisión y exactitud en un intervalo de 10 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El método analítico propuesto también resultó válido para la cuantificación del fármaco liberado de las micropartículas en ensayos in vitro al demostrarse su selectividad, linealidad, precisión y exactitud en un intervalo de 0,25 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, quedando validado el límite inferior del intervalo como el límite de cuantificación del método.
3. Se ha desarrollado y optimizado un protocolo de elaboración de micropartículas poliméricas de dexametasona fosfato disodio mediante la técnica de evaporación-extracción del solvente en emulsiones O/A, utilizando ácido poli láctico-co-glicólico 50:50 como transportador. Las micropartículas obtenidas presentan un tamaño medio de 59,69 μm ; superficie lisa y regular, sin poros ni fisuras, una carga en dexametasona fosfato disodio de 7,30 mg / 100 mg de micropartículas y una eficacia de encapsulación aproximada del 79 %. Mediante Calorimetría Diferencial de Barrido se verificó la compatibilidad entre los constituyentes de la formulación.
4. Estas micropartículas poliméricas permitieron una liberación prolongada de dexametasona fosfato disodio in vitro durante más de un mes sin efecto burst significativo. La incorporación de vitamina E a la formulación enlenteció significativamente la liberación del fármaco.

5. Una única administración de micropartículas poliméricas cargadas produjo el mismo efecto citotóxico sobre células PC12 durante 26 días que la administración cada 48h de dexametasona fosfato disodio en solución, mientras que las micropartículas no cargadas no mostraron citotoxicidad alguna. Además, tras 2 días de tratamiento de las células PC12 con dexametasona fosfato disodio en solución y con micropartículas poliméricas cargadas se detectó una inducción de la apoptosis del 15,8 % y 19,9 % respectivamente, con la detención del ciclo celular en la fase G2.
6. Los resultados obtenidos con las micropartículas poliméricas de dexametasona fosfato disodio desarrolladas nos animan a continuar los estudios in vivo con el fin de proponerlas como una alternativa a los actuales sistemas de administración de dexametasona en poliquimioterapia. En efecto, estas micropartículas permitirían prolongar los niveles plasmáticos de dexametasona evitando las fluctuaciones características de las formulaciones convencionales, mejorando la eficacia del tratamiento, disminuyendo los efectos secundarios asociados al uso de glucocorticoides y mejorando el cumplimiento por parte del paciente.
7. Se ha desarrollado y optimizado un protocolo de elaboración de micropartículas lipídicas de dexametasona fosfato disodio mediante la técnica de spray drying utilizando una mezcla de fosfolípidos, ovoalbúmina y trealosa como transportador. Las micropartículas obtenidas presentan un aspecto pulverulento, con flujo libre, un tamaño medio tamaño medio de 25,36 μm , una carga en dexametasona fosfato disodio de 9,23 mg / 100 mg de micropartículas, y una eficacia de encapsulación aproximada del 90 %. Mediante Calorimetría Diferencial de Barrido se verificó la compatibilidad entre los constituyentes de la formulación. Estas micropartículas liberaron el 100 % de fármaco encapsulado en 24 h, siendo el porcentaje el fosfolípidos el único factor de la formulación de modificó la velocidad de liberación.
8. Las micropartículas lipídicas cargadas con dexametasona fosfato disodio indujeron sobre células PC12 una apoptosis aproximadamente un 7,7 % mayor que la dexametasona fosfato disodio en solución; mientras que las micropartículas lipídicas no cargadas no fueron citotóxicas. Este efecto puede ser debido a los fosfolípidos liberados desde las micropartículas, que podrían modificar la permeabilidad de la membrana celular o mitocondrial facilitando de este modo la internalización del fármaco en la célula o su actuación a nivel de mitocondria. Esta hipótesis estaría respaldada por los resultados obtenidos con la línea ce-

lular PC3, resistente a glucocorticoides, en la que las micropartículas lipídicas cargadas mostraron efectos citotóxicos y no la dexametasona fosfato disodio en solución.

9. Se ha desarrollado y optimizado un protocolo de elaboración de micropartículas de ovoalbúmina libres de fosfolípidos mediante la técnica de evaporación-extracción del solvente en emulsiones A/O/A utilizando ácido poli láctico-co-glicólico 50:50 como transportador. Las micropartículas obtenidas presentan un tamaño medio de 42,28 μm ; superficie lisa y regular, sin poros, con una carga en ovoalbumina de 59,3 μg / 100 mg de micropartículas y una eficacia de encapsulación aproximada del 63 %. Estas micropartículas de ovoalbúmina, al igual que la ovoalbúmina en solución mostraron un claro efecto inductor de la proliferación sobre células PC12, principalmente a cortos periodos de incubación.
10. Los resultados obtenidos con las micropartícula lipídicas y con las micropartículas de ovoalbúmina desarrolladas nos permiten plantear el desarrollo y evaluación de micropartículas lipídicas de dexametasona fosfato disodio sin ovoalbúmina en su composición, como una posible estrategia para revertir la resistencia a glucocorticoides, causa del fracaso en algunos pacientes y en algunos tipos de cáncer de la poliquimioterapia con glucocorticoides.

Resume

Glucocorticoids (GCs) and dexamethasone play a central role in the treatment of lymphoid malignancies, particularly acute lymphoblastic leukaemia (ALL). Preclinical studies have shown that GCs also affect cell differentiation, proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells, hepatoma cells, mammary tumor cells, glioma cells, melanoma cells and thyroid cancer cells. The proliferation and apoptotic effects of GCs are cell type-specific as well as time and concentration dependent. In spite of the high effectiveness of dexamethasone treatment in ALL, mainly in children, GC resistance occurs in 10-30 % of untreated patients, being more frequent in T-lineage than B-precursor acute lymphoblastic leukaemia. Furthermore, systemic administration of high doses of dexamethasone are required for inducing tumor cell apoptosis but causes severe side effects such as osteoporosis, Cushing's syndrome or an increased risk of infections. Even though most combined chemotherapy protocols currently used in clinics include dexamethasone at high doses, recent clinical investigations on the efficacy of dexamethasone in refractory multiple myeloma have shown synergic effects of low doses of this GC combined with pomalidomide or lenalidomide.

The aim of this work is to improve chemotherapy protocols with dexamethasone by developing biodegradable microparticles as controlled delivery systems of the drug. This general objective is divided in two specific ones:

1. Developing of biodegradable microparticles of dexamethasone as systems capable to inhibit cell proliferation along the time after a unique parenteral administration (subcutaneous or intramuscular). These microparticles not only could avoid dexamethasone degradation by protecting it from light and oxygenous, but also could improve the dosage of dexamethasone, reducing the number of administrations and improving patient compliance. But more importantly, microparticles could also improve treatment effectiveness and reduce GC side effects by providing a suitable pharmacokinetic drug release profile.
2. Evaluating the effect that the different carrier materials used in the elaboration of the microparticles could have on the inhibition of cell proliferation inducted by dexamethasone. It starts from the hypothesis that the lipid carriers, at difference of polymeric carriers, could increase the effect of dexamethasone favoring its internalization into the tumor cell.

Thus, two types of microparticles, by using polymeric or lipid carriers, for parenteral administration of dexamethasone have been developed and their effect on cell proliferation and apoptosis has been evaluated.

Initially, a validation protocol of analytical procedures for the quantification of drug substances formulated in polymeric systems for parenteral administration was designed. This protocol comprises the analysis of both drug entrapped into polymeric microparticles (assay: content test) and drug released from microparticles (assay:dissolution test). Next, a HPLC analytical procedure for the quantitation of dexamethasone phosphate disodium formulated in poly lactide-co-glycolide microparticles for parenteral administration was developed and validated using the validation protocol previously designed.

Two types of microparticles of dexamethasone were developed using different types of carriers: a synthetic lactic-glycolic copolymer was used to develop polymeric microparticles, and a mix of egg phospholipids with 80 % phosphatidylcholine, ovalbumin and threolose were used to obtain lipid microparticles. Optimization of the microencapsulation procedures was carried out in both cases to achieve an optimal size for parenteral administration, high encapsulation efficiency and, therefore, high drug loading of the systems. Moreover, incompatibilities between drug and excipients were discarded in the optimized formulations.

The *in vitro* release kinetics of dexamethasone from polymeric microparticles showed an efficient dexamethasone release control, allowing a prolonged release for more than one month without showing a significant burst effect. Unloaded polymeric microparticles were not cytotoxic to PC12 cells, but after a single administration of loaded microparticles, the cellular death rate for 26 days was similar to that obtained with the dexamethasone solution administered for 48 h. Dexamethasone solution and loaded polymeric microparticles induced apoptosis around 15.8 % and 19.9 %, respectively, after 2 days of incubation; and cell cycle arrest at G2 phase was detected. These results allow us to propose loaded polymeric microparticles as an alternative to the current dexamethasone administration systems in combined chemotherapy. Loaded polymeric microparticles developed in this work would provide prolonged drug plasmatic levels avoiding the pharmacokinetic peak trough fluctuations characteristic of conventional formulations, improving treatment effectiveness, decreasing GC side effects and improving patient compliance.

With respect to lipid microparticles, dexamethasone release was faster, reaching 100 % of drug released within 24 h. Dexamethasone lipid microparticles showed comparable results in terms of proliferation inhibition of PC12 cells to dexamethasone solution administered every 48 h in assays up to 3 days; however, there was a statistically significant increase in apoptosis induction compared with the dexa-

methasone solution. This effect could be due to the phospholipids released from the lipid microparticles, which could modify cell membrane permeability, thus, facilitating dexamethasone internalization into the cell. This hypothesis is supported by the results obtained on GC resistant PC3 cells, where dexamethasone lipid microparticles showed significant antiproliferative effects in contrast to the dexamethasone solution.

On the other hand, phospholipids-free ovalbumin microparticles were developed by the solvent evaporation technique in water-in oil-in water (W/O/W) emulsions using poly-lactic-co-glycolic 50:50 as carrier. These ovalbumin microparticles, as ovalbumin in solution, showed a clear inducing effect of PC12 cell proliferation, mainly at short periods of incubation. These results allow us to propose lipid microparticles of dexamethasone free of ovalbumin as a possible tool to revert cell resistance to GCs.