



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

USO DE NANOMATERIALES EN TERAPIAS DIRIGIDAS

USE OF NANOMATERIALS IN TARGETED THERAPIES

Autor: Sara Toyos García

Director/es: Mónica López Fanarraga
Lorena García Hevia

ÍNDICE

Resumen - Abstract	2
1 Introducción	3
2 Nanomateriales	7
2.1 Áreas de aplicación en biomedicina	8
Nanodiagnóstico (<i>in vivo, in vitro</i>)	8
Nanoterapia – nanofármacos	10
Nanomedicina regenerativa	12
3 Terapias dirigidas con Nanomateriales	14
3.1 Estado del arte	14
3.3 Retos, barreras y recomendaciones	16
4 Nanoterapia y Cáncer.....	18
4.1 Fármacos clínicamente aprobados	19
4.2 Fármacos en desarrollo clínico	21
4.2.1 Estrategias de “drug-targeting”- “direccionamiento de fármacos”	21
Direccionamiento pasivo	21
Direccionamiento activo	26
4.2.2 Métodos y ligandos utilizados para la liberación controlada de fármacos.....	28
Anticuerpos monoclonales	29
Aptámeros.....	30
Moléculas proteicas y peptídicas.....	30
Moléculas pequeñas	31
4.2.3 Desarrollo clínico de nanopartículas dirigidas	32
BIND-014:.....	33
6 Conclusiones.....	37
7 Referencias	38

RESUMEN

En el ámbito de las ciencias farmacéuticas, la reciente disciplina de la nanotecnología ha venido a revolucionar la medicina moderna tal y como la conocemos. Durante las últimas décadas, hemos sido testigos de cómo la aplicación de nanomateriales en la medicina está proporcionando oportunidades significativas y nuevas perspectivas para tratamientos novedosos y eficaces en muchos trastornos, con gran potencial en el cuidado de la salud. El propósito de esta revisión no es otro que destacar los avances más recientes en lo que al desarrollo de nanopartículas de liberación controlada se refiere (especialmente en el contexto de la quimioterapia antitumoral), comenzando por el vasto impacto de la nanotecnología en la medicina y pasando por el desarrollo clínico de nanopartículas para dirigir activa o pasivamente la liberación controlada de fármacos de manera optimizada, novedosa y eficaz. Además, atenderemos brevemente a la evolución de BIND-014, el primer nanofármaco clínicamente probado para el tratamiento del cáncer, ocupándonos de sus propiedades farmacobiológicas y su enorme potencial en el terreno quimioterapéutico.

Palabras clave: nanomateriales, nanomedicina, nanotecnología, liberación controlada de fármacos, nanopartículas dirigidas.

ABSTRACT

In the field of pharmaceutical sciences, the recent discipline of nanotechnology has revolutionized modern medicine as we know it. Over the last decades, we have witnessed how the application of nanomaterials in medicine is providing significant opportunities and new perspectives for novel and effective treatments for many disorders, with great potential in health care. The main purpose of this review is to highlight the most recent advances in what the development of nanoparticles of controlled release refers (especially in the context of anti-tumor chemotherapy), beginning with the vast impact of nanotechnology in medicine and through the clinical development of nanoparticles to actively or passively target the controlled drug release in an optimized, novel and effective way. In addition, we will briefly address the evolution of BIND-014, the first clinically tested nanotherapeutic formulation for the treatment of many different tumors, minding its biopharmacological properties and enormous potential in regard to chemotherapy.

Keywords: nanomaterials, nanomedicine, nanotechnology, controlled drug delivery, targeted nanoparticles

1 INTRODUCCIÓN

La nanomedicina puede definirse como el diseño y desarrollo de terapias y/o agentes de diagnóstico en escala nanométrica (con tamaños desde 1 a 100 nm en, al menos, una de sus tres dimensiones), con la posibilidad, dada su capacidad de integrarse en los sistemas biológicos, de transportar y depositar una amplia variedad de entidades biomédicas, facilitando así el tratamiento, la prevención y el diagnóstico de muchas enfermedades (Figura 1) [1,2].



Figura 1 Aplicaciones biomédicas de agentes nanoterapéuticos

Tal y como a lo largo de esta revisión podremos ir comprobando, las características físicas de los nanotransportadores (tamaño, forma, superficie de carga, propiedades químicas intrínsecas) afectarán significativamente a los procesos de transporte biológico, incluyendo las barreras orgánicas externas (piel y mucosas), los compartimentos extracelulares (sangre y matriz extracelular), las membranas celulares y destinos a niveles celular y subcelular. Todos ellos se verán condicionados, asimismo, por la incorporación de ligandos activos para el reconocimiento de receptores biológicos específicos [3,4].

Por sus características únicas, entre las que se incluyen su gran superficie, sus particulares propiedades estructurales y su largo tiempo de circulación de sangre en comparación con otras moléculas pequeñas, las nanopartículas se han postulado, desde que fueron concebidas, como una alternativa sólida y atractivas en el ámbito de la medicina optimizada y la terapéutica personalizada. De entre las múltiples ventajas potenciales que estos productos de la ingeniería genética pueden ofrecernos podríamos destacar [5,6]:

- Su potencial para revertir las propiedades fisicoquímicas poco favorables de las moléculas bioactivas conocidas hacia perfiles biofarmacológicos más deseables.
- La mejora en la liberación terapéutica a través de barreras y compartimentos biológicos.
- La liberación controlada de agentes bioactivos.
- La eficacia terapéutica enormemente mejorada al optimizar la biodistribución.
- La innovadora capacidad de realizar funciones teranósticas, combinando imágenes multimodales, diagnóstico y terapia simultáneamente en nanoplataformas multifuncionales.

En los últimos años, se nos ha ofrecido la posibilidad de ser testigos del auge de múltiples y genuinas herramientas nanoterápicas desarrolladas a base de distintos componentes (desde metales hasta proteínas), incluyendo óxidos de carbono, sílice, óxidos metálicos, nanocristales, lípidos, polímeros, dendrímeros, puntos cuánticos y algún otro de más reciente investigación [7,8]. Ejemplo de estos últimos son los nanomateriales de carbono con estructura carbonatada (fullerenos, nanodiamantes, nanotubos de carbono y nanotubos semicerrados). Destacan todos ellos por su versatilidad, variabilidad, estabilidad química y características tales como una superficie amplia y maleable y una gran capacidad portadora y de incorporación de moléculas con actividad anticancerígena. No obstante, para poder habilitar con acierto plataformas de liberación de fármacos, el esfuerzo principal debe ir orientado hacia la investigación del mecanismo, la termodinámica, y la cinética de equilibrios de adsorción/desorción para cada uno de los distintos fármacos a base de nanomateriales de carbono con diferente pureza, química superficial y estado de aglomeración bajo determinadas condiciones. A todo esto se añade la necesidad (previa a su introducción en la práctica clínica) de una comprensión pormenorizada de sus propiedades toxicológicas y farmacológicas, así como una evaluación detallada de sus riesgos y beneficios para la salud [9].

En la misma línea, se abren ahora nuevos horizontes gracias a plataformas multifuncionales basadas en nanopartículas de oro, capaces de combinar diagnóstico (imágenes) y tratamiento tumoral (localizando múltiples dianas terapéuticas) [9]. Nanosferas de oro, nanorods, nanoshells y nanocages, son algunos ejemplos actualmente en investigación para imagen *in vivo*, terapia del cáncer, y liberación de fármacos. Concretamente, la mayoría de los estudios sobre terapia cancerosa basados en nanopartículas de oro han tenido lugar en el contexto de un enfoque fototérmico, esto es, mediante la exposición a la región infrarroja cercana al espectro láser para la destrucción de tejido tumoral, lo cual podría generar un gran impacto en el entorno clínico. Por tanto, nanopartículas de oro expuestas al láser podrían actuar como agentes terapéuticos independientes, sin necesidad de co-fármacos conjugados. Estas nanopartículas de oro, además, han sido utilizadas en investigación para liberación controlada de fármacos [10,11].

En lo que a la entrega de medicamentos se refiere, las plataformas de nanopartículas más importantes son los liposomas, los polímeros conjugados, las micelas poliméricas, los dendrímeros, las nanocápsulas y las proteínas y nanopartículas basadas en ácidos nucleicos. De entre ellas, los dos principales tipos de nanopartículas (liposomas y nanoformulaciones basadas en polímeros), representan la inmensa mayoría de la terapéutica de nanopartículas actualmente disponibles para su uso clínico habitual (Figura 2).

- Los **liposomas** son nanopartículas que tienen entre 20 nm y 500 μm de diámetro. Son esferas huecas donde la pared que separa el medio interno del medio externo es una bicapa lipídica. Al estar compuestos tanto por una fracción lipídica como por una fracción acuosa, los liposomas pueden alojar sustancias lipofílicas y/o sustancias hidrofílicas.
- Las **nanopartículas poliméricas** se definen como partículas de tamaño inferior a 1 μm [12], generalmente entre 10 y 500 nm, elaboradas a partir de materiales poliméricos de diferente naturaleza. El método de fabricación, la composición química de éstos y la naturaleza del ligando, en caso que lo posea, influenciarán su funcionalidad y efectividad.

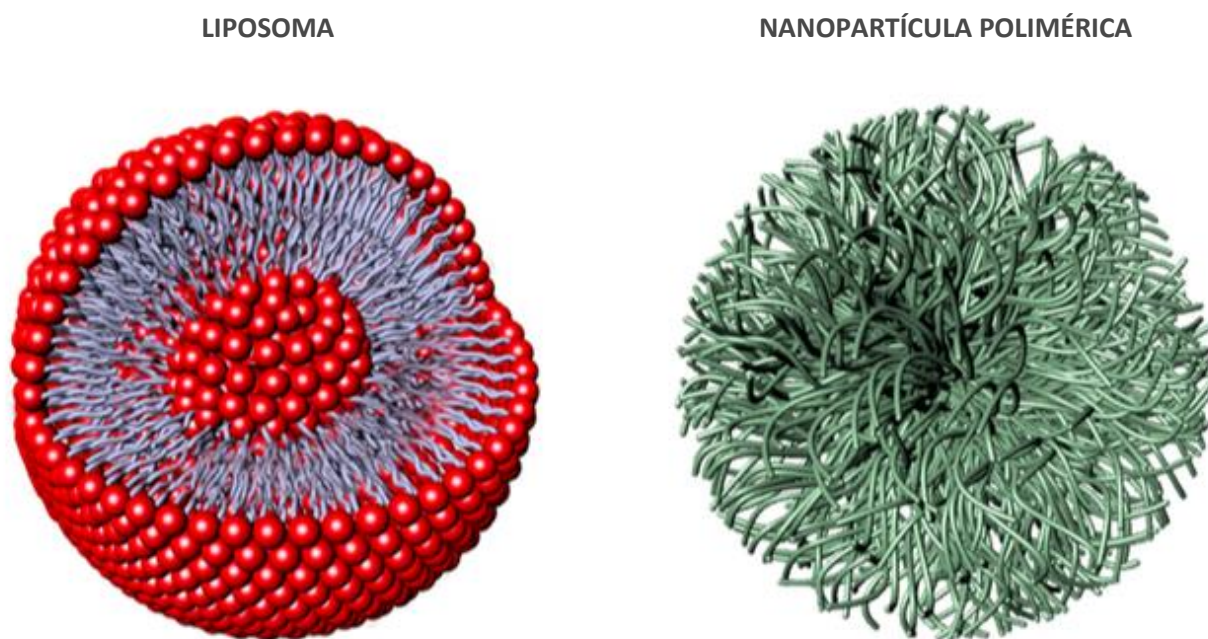


Figura 2 Nanotransportadores representativos en la liberación farmacológica: liposoma (izquierda) y nanopartícula polimérica (derecha)

Atendiendo a su estructura física, podemos clasificar las nanopartículas en nanoesferas y nanocápsulas:

- Las **nanoesferas** son sistemas matriciales, donde el fármaco se halla disperso en una matriz polimérica. En el caso del empleo de polímeros biodegradables, la liberación del fármaco se produce bien por difusión a través de los poros de la matriz, bien por degradación o erosión del polímero, o bien por una combinación de ambos. Cuando son polímeros no biodegradables los que se utilizan, la liberación tiene lugar gracias a un proceso de difusión lenta a través de la matriz.
- Las **nanocápsulas**, por su parte, son sistemas de tipo reservorio, donde el fármaco se localiza en una cavidad central cubierta por una membrana polimérica que controla la cinética de liberación dependiendo de su naturaleza química.

- La selección de una estructura u otra vendrá determinada por el método de elaboración de las nanopartículas, por las propiedades fisicoquímicas del polímero y por las características del propio fármaco.

Aunque estos materiales son susceptibles de proporcionar un alto grado de biocompatibilidad, su utilización en biomedicina requiere interacciones controladas con biomacromoléculas. Para trasladar a la práctica clínica nanofármacos desarrollados con éxito, se deben tener en cuenta varias cuestiones, entre ellas [4]:

- Una semivida en sangre favorable.
- Un comportamiento fisiológico con mínimos efectos off-target.
- Una separación efectiva del organismo humano.
- Una mínima o nula toxicidad para los tejidos sanos.
- El diámetro hidrodinámico, la carga superficial y el balance hidrófilo/hidrófobo son importantes propiedades fisicoquímicas que pueden afectar a la biodistribución *in vivo* y al aclaramiento de las nanopartículas. Por ejemplo, llevar a cabo modificaciones para optimizar la superficie de las nanopartículas empleando los polímeros biocompatibles y biodegradables adecuados, como polietilenglicol (PEG), constituye una estrategia adecuada para reducir la opsonización y los procesos de absorción del sistema reticuloendotelial, facilitando también el aclaramiento eficiente de las nanopartículas y/o de sus metabolitos en el organismo. Por lo tanto, para conseguir una vida media en sangre favorable y una biodistribución con un mínimo reconocimiento y eliminación por el sistema reticuloendotelial, debemos invertir un gran esfuerzo en optimizar su perfil fisicoquímico (figura 3).

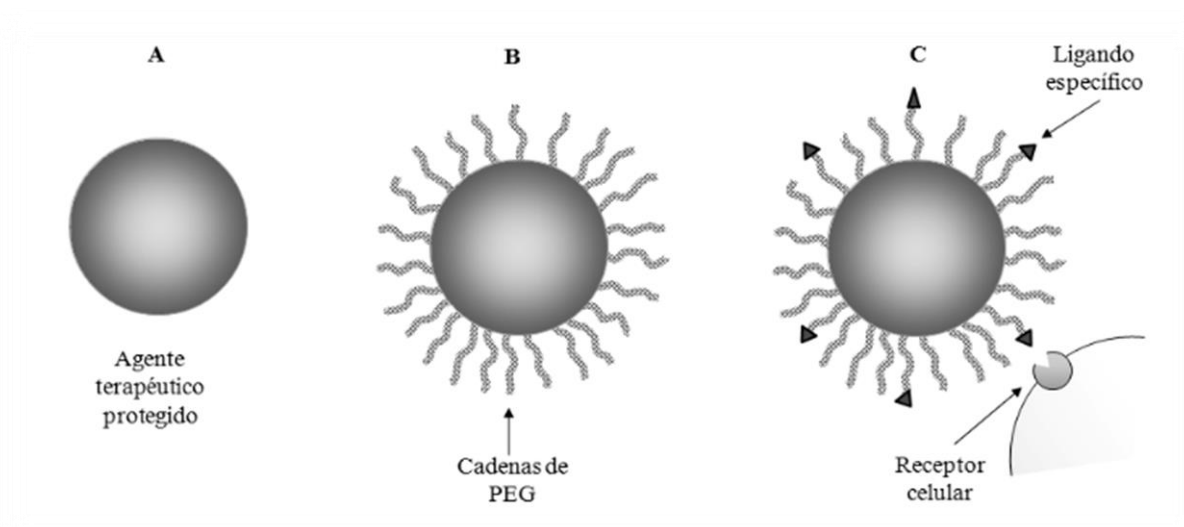


Figura 3 Nanopartículas de 1ª generación (A); nanopartículas de 2ª generación, pegiladas (B); nanopartículas de 3ª generación, direccionadas mediante ligandos específicos.

2 NANOMATERIALES

Cuando hablamos de “nanomateriales” nos referimos a todos aquellos materiales desarrollados con, al menos, una dimensión en escala nanométrica. Si, además, esta dimensión es del orden o menor que alguna longitud física crítica (como la longitud de Fermi del electrón o la de un monodominio magnético), obtenemos propiedades completamente novedosas que posibilitan el desarrollo de materiales y dispositivos con nuevos potenciales y características. Así, este ámbito de investigación incluye agregados atómicos (clusters) y partículas de hasta 100 nm de diámetro, fibras con diámetros inferiores a 100 nm, laminas delgadas de espesor inferior a 100 nm, nanoporos y materiales compuestos conteniendo alguno de estos elementos. Pese a que la composición del material puede ser muy diferente, las más importantes son silicatos, carburos, nitruros, óxidos, boruros, seleniuros, telurios, sulfuros, haluros, aleaciones metálicas, intermetálicos, metales, polímeros orgánicos y materiales compuestos [13].

La nanotecnología ha adquirido de esta forma un carácter horizontal que la ha hecho enormemente influyente en prácticamente todos los sectores socioeconómicos, desde “Sanidad y Salud” (que será el tema central del que se ocupe esta revisión) hasta energía, pasando por el sector textil, tecnologías de la comunicación e información, seguridad, transporte, y un largo etcétera que ha dotado de un enorme potencial económico, de una magnitud tal que a día de hoy resulta prácticamente imposible cuantificar.

Tal y como introdujimos en el apartado anterior, los sectores más relevantes de actividad en los cuales los nanomateriales se están convirtiendo en protagonistas, incluyen materiales nanoestructurados, nanopartículas, nanopulvos, materiales nanoporosos, nanofibras, fullerenos, nanotubos de carbono, nanohilos, dendrímeros, electrónica molecular, puntos cuánticos y láminas delgadas. Es razonable pensar que la actividad en cada uno de estos sectores está enormemente condicionada por su demanda socioeconómica. Así, el ámbito “sanidad” al que trataremos de aproximarnos a lo largo de este trabajo, está logrando resultados muy prometedores en ingeniería de tejidos, liberación controlada y dirigida de fármacos y agentes de contraste para el diagnóstico por imagen. Otros sectores de aplicación que están viendo en la nanotecnología una plataforma de despegue hacia futuras investigaciones son tan diversos como: las tecnologías de la comunicación e Información, la industria cosmética, medio ambiente y la cerámica; asimismo, la incorporación de nanomateriales funcionales a las fibras textiles está dando lugar a una nueva generación de fibras funcionales con capacidad de responder a estímulos exteriores con nuevas propiedades.

Resulta preciso aclarar que la nanotecnología va indefectiblemente de la mano de la nanoquímica en la medida en que el desarrollo y obtención de materiales por rutas sintéticas (“bottom-up”), posibilita un grado de control del tamaño y las propiedades virtualmente imposibles de lograr con técnicas físicas de reducción de tamaño (“top-down”). La enorme relevancia de los nanomateriales, por lo tanto, no radica únicamente en su pequeño tamaño (entre la escala macroscópica y la atómica), que le proporciona novedosas propiedades y optimiza otras ya existentes, sino que además han demostrado tener el potencial de ser disruptivos, siendo así capaces de dar lugar a tecnologías sustitutas de otras ya existentes a un coste inferior, tanto de materias primas como de producción.

2.1 Áreas de aplicación en biomedicina

Cuando hablamos de la aplicación de la nanotecnología en biomedicina, es decir, en las tecnologías médicas y en la farmacia con objeto de mejorar la salud del paciente, generamos automáticamente el concepto “nanomedicina”, un enorme y creciente sector de investigación que se estructura en torno a tres áreas básicas de trabajo. Dichas áreas comprenden el diagnóstico (*in vitro* e *in vivo*), los nanofármacos y la medicina regenerativa, los cuales abordaremos a continuación.

Nanodiagnóstico (*in vivo*, *in vitro*)

IN VITRO

Este término describe la integración en la práctica clínica de diagnóstico molecular, tratamiento de datos y nuevas plataformas de detección diferencial, todo ello con el fin de optimizar la atención al paciente. Un sector fundamental del diagnóstico aspira a la detección de biomarcadores de enfermedades utilizando sistemas sencillos de despistaje de patologías (tanto en los centros de salud como en los hospitales), sin necesidad de enviar las muestras al laboratorio para su procesamiento. Estas son las denominadas herramientas “point of care” (pruebas cerca del paciente, POCT) (Figura 4) [14].

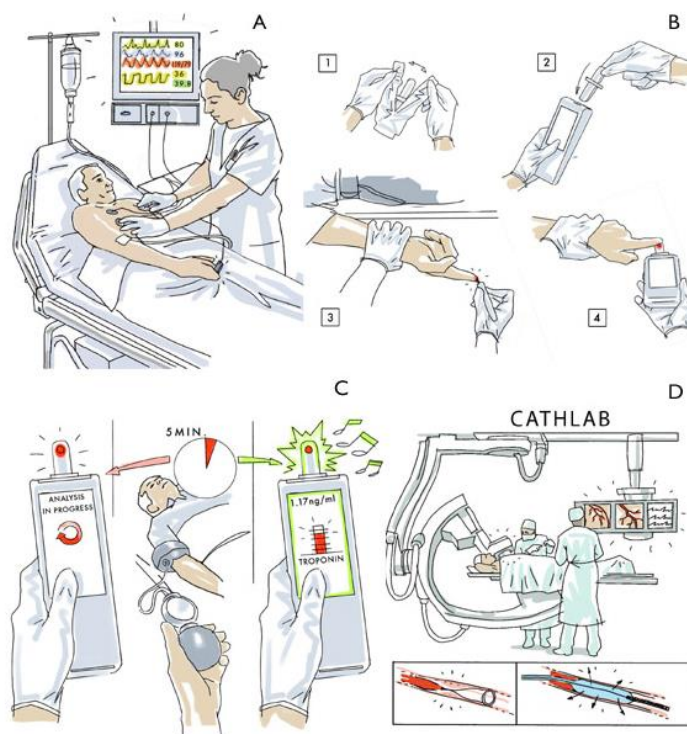


Figura 4 Ejemplo de “Point Of Care Test”, POCT

De esta formas hemos logrado obtener pruebas de laboratorio sencillas, capaces de orientar o confirmar un diagnóstico precozmente y a dos niveles, tanto en la detección de biomarcadores específicos para determinadas patologías, como en la optimización de tratamientos farmacológicos mediante pruebas de análisis genético. De la misma forma,

somos ahora capaces de llevar a cabo varios ensayos de forma sincrónica, pudiendo optar tanto por el ensayo individual como por el ensayo de múltiples muestras simultáneamente sin que esto suponga un aumento de coste (multiplexado).

Esta aplicación nos conduce hacia una práctica clínica donde los análisis más rápidos, precisos y sencillos son una realidad comparados con las prácticas estándar hasta ahora existentes; de esta forma, podrían ser empleados incluso por personal no especializado. Otra ventaja a tener en cuenta (especialmente en oncología) de los sistemas analíticos basados en nanobiotecnología es que utilizan menor cantidad de muestra inicial. La miniaturización, además, podría suponer un ahorro en costes materiales no despreciables para el fabricante. No deberíamos perder de vista, sin embargo, que la innovación que el uso de estos nanodispositivos supone debe aportar seguridad, eficiencia y un conocimiento más exhaustivo del estado del paciente, más allá de un abaratamiento de costes.

La automatización en el contexto del diagnóstico *in vitro* es otro de los puntos clave que la nanotecnología debería ser capaz y de hecho aspira a cubrir; se evita así al usuario la manipulación de muestras con las eventuales contaminaciones que implica, todo ello sin mermar la sensibilidad y especificidad del ensayo. Los objetivos esenciales de estas técnicas se traducen en uno solo: convertirse en pruebas de rutina en los laboratorios, altamente implantadas, precisas, rápidas, sensibles y específicas, todo lo cual derivaría en una gran optimización de recursos. La mayor dificultad estriba en la capacidad del sector sanitario para incorporar estas técnicas innovadoras (dado su coste inicial, siempre superior al de la técnica actual). Otro aspecto a tener en cuenta para la adopción definitiva de estas nuevas tecnologías de diagnóstico es la formación del clínico que va a prescribirlas. En lo que a la microbiología se refiere, las técnicas de diagnóstico avanzadas permiten determinar simultáneamente todos los microorganismos presentes causantes de una infección con gran sensibilidad; no obstante, puesto que las técnicas clásicas sólo determinen uno o dos microorganismos, el clínico podría encontrarse inseguro a la hora de establecer el significado clínico de la presencia de más microorganismos asociados.

Resulta conveniente considerar lo siguiente: en la actualidad, las técnicas de diagnóstico *in vitro* apenas representan un 2% del coste sanitario total y, pese a ello, aproximadamente el 70% de las decisiones clínicas se fundamentan en los datos que aportan, repercutiendo asimismo en el plan terapéutico a llevar a cabo. Considerando este dato, nos hallaríamos frente a una disminución real de los costes sanitarios.

IN VIVO

La resonancia magnética (RMN), la tomografía axial computarizada (TAC) y la imagen nuclear (PET), constituyen las principales herramientas de diagnóstico *in vivo* utilizadas en la práctica clínica a día de hoy. De la misma forma cabe destacar el empleo de técnicas ópticas como la microscopía 3D en fases preclínicas y caracterización de modelos animales. Los parámetros “evaluadores” de la calidad que nos brinda una herramienta de imagen diagnóstica con respecto a otra incluirían: el grado de contraste anatómico, el contraste funcional/molecular, la resolución espacial, la penetración y la seguridad para el paciente. Por ofrecer la mejor

combinación de todos ellos, la resonancia magnética se ha erigido como una de las técnicas diagnósticas preferidas, especialmente en el ámbito de la oncología [15].

En el contexto de las oportunidades que nos brinda la aplicación de la nanotecnología a la imagen médica, podríamos referirnos a dos niveles de innovación: la incremental y la disruptiva. En cuanto a la innovación a más corto plazo y de menor riesgo, tenemos la optimización de las prestaciones en sensibilidad y especificidad de los sistemas establecidos mediante la utilización de nanoobjetos como agentes de contraste. Estas mejoras permiten determinar procesos que acontecen a nivel celular, por eso hablamos de “imagen molecular”. En cuanto al ámbito disruptivo, estos sistemas de imagen molecular podrán ser empleados para la monitorización, control y orientación en tiempo real de nanofármacos (nanosistemas transportadores de agentes terapéuticos capaces de ser liberados de forma dirigida y controlada). Así, se convierten en ambiciosas herramientas “teranósticas” que permiten el estudio del comportamiento farmacológico *in vivo* (biodistribución, farmacocinética, farmacodinámica y eficacia para alcanzar el tejido u órgano diana).

En contraposición al diagnóstico *in vitro*, los estudios llevados a cabo hasta ahora (así como la información obtenida a través de empresas punteras en tecnología médicas) no ha demostrado un abaratamiento de costes derivado de la implantación de las mejoras basadas en nanotecnología. Sin embargo, convendría no perder de vista al evaluar el coste-beneficio que, al contribuir al desarrollo de este tipo de técnicas, incrementamos muy sustancialmente el valor para el paciente.

Nanoterapia – nanofármacos

El objetivo último de la nanoterapia es el desarrollo de nanosistemas activos para el transporte y liberación del agente terapéutico en la zona afectada, consiguiendo así aumentar la eficacia terapéutica, al tiempo que se minimizan al máximo los efectos secundarios.

El tamaño de los nanotransportadores (NTs) de los sistemas de transporte farmacológico varía entre 3 y 200 nm, pudiendo ser de distinto tipo en función del material elegido para su fabricación: proteínas (albúmina), lípidos (liposomas), polímeros [polimerosomas, micelas, nanopartículas (NPs) o dendrímeros], virus (NTs virales), metales (NPs metálicas) y compuestos organometálicos (nanotubos), entre muchos otros [16].

El uso de NTs de fármacos en el tratamiento de diversas enfermedades ofrece múltiples ventajas farmacológicas [17,18,19]. Cuando un fármaco o molécula bioactiva se administra de manera convencional (intravenosa, oral, etc.), se libera rápidamente al medio biológico y su comportamiento en el organismo es completamente dependiente de su estructura química. Así, su absorción a través de las membranas y su distribución orgánica vienen condicionadas por las propiedades físico-químicas de la molécula (tamaño, lipofilia, ionización, etc.) [18,19]. Por contra, cuando esta molécula activa se administra a través de NTs, son las propiedades físico-químicas de éstos (tamaño, características superficiales, etc.) las que condicionan su comportamiento en el organismo [17].

La capacidad terapéutica de un fármaco viene determinada no sólo por las propiedades físico-químicas de la molécula, sino también por procesos relacionados con su comportamiento

dentro del organismo, como su vida media en circulación, su eliminación por ciertos órganos, su transformación metabólica y su degradación. La investigación y desarrollo de NTs con capacidad de transportar el fármaco hasta el lugar necesario de manera más eficiente y segura, mejoraría en gran medida el resultado terapéutico global [20,21].

Por una parte, el empleo de NTs demora la degradación e inactivación en el torrente sanguíneo del agente terapéutico, al aislar al fármaco de factores del medio externo que afectan a su estructura y estabilidad (como cambios de pH y/o temperatura, actuación de proteasas, etc). Este retraso en la inactivación del fármaco aumenta las posibilidades de que éste sea capaz de ejercer su actividad [18,19,22].

Además de estabilizar la estructura del agente terapéutico, la utilización de determinados tipos de NTs garantiza la posibilidad de transportar fármacos pocos solubles o hidrofóbicos. Esta ventaja resulta fundamental, puesto que disponemos de una amplia variedad de fármacos probadamente efectivos *in vitro* que, por ser hidrofóbicos, ocasionan problemas de naturaleza tóxica local e incluso embólica al agregarse tras ser administrados *in vivo*. El empleo de NTs de fármacos hidrofóbicos abre así todo un frente de nuevas posibilidades terapéuticas [22].

Otra ventaja que ofrece el uso de NTs es la posibilidad de incrementar la concentración del fármaco administrado. Dado que así se encuentran aislados y poco accesibles al ambiente externo que los rodea, podemos aumentar su concentración por encima de la tóxica, ya que va a interaccionar poco o nada durante su tránsito por el organismo hasta alcanzar el lugar afectado [18,19].

Por último, los NTs nos ofrecen la posibilidad de aumentar el tiempo de circulación del fármaco en el torrente sanguíneo. La administración del fármaco libre supone un aclaramiento renal precoz (debido fundamentalmente a su bajo peso molecular), cosa que no ocurre (por su mayor tamaño), con el empleo de NTs, que permiten reducir sustancialmente la filtración renal y de esta forma alargar el tiempo de circulación en sangre. No obstante, los NTs son reconocidos por el sistema mononuclear-fagocítico (SMF, previamente reconocido como sistema retículo-endotelial), preferentemente en hígado y bazo. Para escapar de este reconocimiento, una de las estrategias más empleadas se basa en cubrir su superficie con polietilenglicol (PEG) o polisacáridos [23]. Las macromoléculas hidrofílicas que constituyen este revestimiento proporcionan una “capa de hidratación” que genera un efecto tipo “máscara” que, por un lado, evita la interacción del NT con el SFM, el sistema inmune y las células sanguíneas, y por otro, dota de estabilidad a la partícula, previniéndola de la adsorción de proteínas y la interacción con otros NTs, así evitando la formación de agregados [24-26].

El conjunto de todas las ventajas de los NTs descritas derivan en una mayor cantidad de fármaco activo que llega al área patológica, aumentando así la biodisponibilidad del fármaco y, consecuentemente, el efecto terapéutico.

Nanomedicina regenerativa

La medicina regenerativa es otro de los ámbitos sanitarios a los que la nanotecnología ha abierto nuevos horizontes, ofreciendo la posibilidad de controlar y monitorizar de manera individualizada la interacción biomaterial-célula, así como la nanofabricación del biomaterial empleado como soporte.

Todas y cada una de las estrategias agrupadas bajo la denominación de “ingeniería tisular” se refieren al desarrollo de “scaffolds” (o matrices de soporte) encargados de guiar el crecimiento celular o de reemplazar vías anatómicas en la creación de tejidos artificiales de más o menos complejos. Como sabemos, los tejidos se estructuran en torno a células (destacando las células madre mesenquimales por su potencial de aplicación y su capacidad de diferenciación hacia distintos linajes celulares) y a una matriz de soporte y alimentación. De esta forma, la reproducción de un tejido precisa de la interacción entre células y materiales que remeden al máximo la matriz de soporte [27].

La nanotecnología con la que contamos en la actualidad dispone de las herramientas fundamentales para la generación del entorno óptimo para crear un verdadero sustituto tisular. Además, la investigación actual está orientándose hacia el desarrollo de nuevos biomateriales con capacidad de remedar la matriz extracelular de múltiples tejidos, adquiriendo otras propiedades básicas en regeneración (como la porosidad, el tamaño óptimo del poro, la biodegradabilidad). El uso de nanomateriales como “scaffolds” para la regeneración de tejidos presenta varias ventajas frente a los biomateriales clásicos [28]. Esto se debe básicamente a tres factores:

- a) Su estructura nanométrica, que propicia la creación de un entorno que emula las condiciones naturales y promueve la adhesión, diferenciación y crecimiento celular.
- b) Su gran área superficial, que posibilita una mayor absorción proteica y propicia la adhesión, proliferación y diferenciación celular.
- c) Su capacidad para la liberación de biomoléculas (proteínas, péptidos, genes y factores de crecimiento de una forma secuencial, fundamentales para el crecimiento celular, puesto que regulan las actividades de regeneración).

Conviene recordar que el objetivo básico de cualquier tipo de terapia celular ha de ser la implantación de una cantidad suficiente (en general millones) de células capaces de restaurar la función de la estructura orgánica en cuestión. Esto requiere necesariamente emplear técnicas aptas para obtener de forma segura y eficaz las dosis celulares necesarias. Sin lugar a dudas, la mejor fuente en la actualidad para conseguir células de forma ilimitada en el laboratorio son las células madre (embrionarias, mesenquimales o reprogramadas).

Puesto que son muchas las indicaciones terapéuticas en las que se la terapia celular podría resultar útil, dependiendo de la dosis celular indicada, la vía de aplicación y la naturaleza de la zona a tratar, resulta conveniente diseñar un “plan de terapia”, desde la aplicación directa de una fracción celular obtenida del tejido del paciente (sin manipulación sustancial), hasta la amplificación *in vitro* en caso de requerir altas dosis o la espera hasta la llegada de células al tejido lesionado (si se utilizan vías sistémicas de aplicación). No obstante, el protocolo de trabajo en laboratorio para conseguirlo no presenta aún un nivel de eficiencia adecuado, ni mucho menos está estandarizado.

La situación actual (que se caracteriza por una eficiencia muy limitada de los procesos de obtención celular y por una baja supervivencia celular una vez implantadas en el órgano diana) debe intentar mejorarse a corto-medio plazo. De esta forma, se debería intentar mejorar la eficiencia de los procesos de obtención del fenotipo celular deseado a partir de células madre. Entre las muchas dianas de interés podemos destacar:

- La investigación en nanocapas de alimentación (“feeder layers”) capaces de potenciar el proceso de expansión celular.
- La detección de nanomateriales capaces de mejorar la diferenciación celular.
- El desarrollo de nanosuperficies que potencien el crecimiento y orientación celulares.

Otro objetivo fundamental sería garantizar la supervivencia de las células una vez implantadas, tratando de evitar reacciones inmediatas como el rechazo inmune, la apoptosis o la inflamación. Todo ello podría lograrse mediante la agregación de biomateriales y estrategias nanotecnológicas con acciones inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antiapoptóticas. De la misma forma se debe postular la manipulación de los sistemas de activación/desactivación moleculares que condicionan el crecimiento adecuado de un implante (como el bloqueo de señales moleculares que impiden la reinervación medular tras su sección) como objetivo prioritario del uso de nanomateriales. La prevención es otro área de enorme potencial para la nanotecnología, pues podríamos llegar a ser capaz de activar/desactivar genes relacionados con la inducción de cambios en la actividad celular (como la formación de tumores)

Por último, mencionar las nuevas perspectivas para la reprogramación celular controlada y a “gran escala” que la nanotecnología está abriendo. Las células madre reprogramadas o células pluripotentes inducidas (induced pluripotent stem cells o iPS) son células pluripotentes obtenidas a partir de células adultas humanas mediante la inserción de genes o proteínas de otro origen. Debido a que se trata de un hallazgo relativamente reciente [29], su uso terapéutico se halla aún en fases iniciales que precisan de más investigación básica de acerca de su potencial tumorigenicidad y su eficiencia. Además, las iPS ofrecen prometedoras perspectivas de futuro como base de plataformas de testado masivo de fármacos y de modelización de enfermedades (permitiendo identificar nuevas vías moleculares de señalización y nuevas dianas terapéuticas) [27,28].

3 TERAPIAS DIRIGIDAS CON NANOMATERIALES

3.1 Estado del arte

Aunque es cierto que la comercialización de productos médicos y farmacéuticos basados en nanotecnología es a día de hoy una realidad, podemos considerar que nos encontramos aún en una etapa inicial. En lo que a las nanoterapias se refiere, el mercado farmacéutico cuenta con aproximadamente una treintena de productos comercializados. Esta cifra ascendería al doble si habláramos de las nanomedicinas en desarrollo clínico actual, aún en fases preclínicas. Este panorama es el que corresponde a un área emergente que está viviendo crecimiento exponencial en las últimas décadas. Puesto que la oportunidad de negocio esencial ofrecida por los nanofármacos está condicionada por el número decreciente de moléculas nuevas identificadas y registradas, se emplean estrategias como la nanoencapsulación para mejorar las terapias con moléculas ya conocidas [5].

Si nos fijamos en el área terapéutica de aplicación, los nanofármacos hasta ahora comercializados o en fases clínicas son en su mayoría tratamientos utilizados en oncología, y su fin último es optimizar el acceso del principio activo a su sitio de acción diana, evitando al mismo tiempo los indeseados efectos secundarios desgraciadamente frecuentes de estas terapias. Las cifras de beneficios que a día de hoy están reportándose (casi 5000 millones de dólares en 2012 según NanoMarkets) y previéndose para el futuro parecen indicar que, además de los beneficios terapéuticos, suponen un potencial beneficio económico prometedor, aunque con la desventaja de que su desarrollo implica una inversión económica (y temporal) inicial sustancialmente mayor.

Es una oportunidad la fabricación de dispositivos a escala nanométrica, cuyo tamaño permite a estos dispositivos atravesar poros y membranas celulares. Asimismo, se puede aumentar la efectividad del medicamento mediante el control preciso de la dosis requerida y, al dirigirse selectivamente a los órganos, tejidos o células dañadas, se puede disminuir la toxicidad asociada al fármaco. Además, se pueden resolver problemas relacionados con la solubilidad del fármaco, y proporcionar alternativas a las vías de administración tradicionales, mucho más invasivas.

A través de la consecución de los principales objetivos ya mencionados de la nanomedicina (atravesar barreras orgánicas más fácilmente, aumentar la efectividad del medicamento mediante el control de dosis, dirigirse específicamente hacia tejidos dañados, disminuir la toxicidad, etc.) se ha logrado hacer frente a muchos de los problemas planteados por los medicamentos tradicionales, entre los que se encuentran:

- Baja solubilidad: sistemas como las micelas o los liposomas proporcionan al fármaco un ambiente tanto hidrofóbico como hidrofílico, incrementando así la solubilidad de la molécula.
- Daño tisular por la extravasación: los sistemas de liberación controlada son capaces de disminuir o eliminar este daño.
- Farmacocinética desfavorable: estos dispositivos protegen al medicamento contra su prematura degradación o pérdida de actividad, requiriéndose así dosis menores.

- Baja biodistribución: la especificidad de estos sistemas de liberación minimiza el volumen de distribución, reduciendo los eventuales efectos secundarios en órganos sensibles.
- Falta de selectividad para tejidos: los sistemas de liberación controlada pueden aumentar la concentración de la molécula activa en el tejido diana.

Más específicamente, las oportunidades de la nanomedicina en el ámbito farmacéutico son [30]:

- Terapia tradicional: mejora del efecto terapéutico, optimizando la posología de un principio activo para garantizar el cumplimiento terapéutico y minimizando los efectos adversos.
- Terapia combinatoria: la actual tendencia a prescribir varios fármacos para tratar una patología conlleva dificultad en lo que al cumplimiento terapéutico se refiere. Estas pautas son la norma en terapias contra el cáncer o enfermedades metabólicas, por lo que aunar varias moléculas en una nanomedicina “polivalente” única facilitaría enormemente el cumplimiento.
- Nuevos biomateriales y nanoestructuras: estructuras biomiméticas así como nanosistemas inteligentes, que respondan a estímulos biológicos y activables externamente.
- Sistemas de transporte y liberación de macromoléculas a través de barreras biológicas (como la barrera hematoencefálica, barreras mucosas y la piel): los nanotransportadores podrían resultar de gran ayuda para la administración de péptidos como la insulina, polisacáridos como la heparina, proteínas, anticuerpos monoclonales, etc., siendo también empleados para la administración de DNA y RNA en el ámbito de la terapia génica (donde la dificultad para llegar al lugar de acción es especialmente destacable).
- Administración de vacunas y de anticuerpos.

Así, las áreas terapéuticas que con mayor facilidad pueden ser capaces de beneficiarse del desarrollo de la nanomedicina serían la oncología (por el direccionamiento farmacológico), la medicina cardiovascular (por la localización de nanoestructuras a nivel cardiocirculatorio) y la neurología (por la liberación mejorada de fármacos a nivel cerebral).

3.3 Retos, barreras y recomendaciones

RETOS Y BARRERAS

En el transporte y liberación farmacológicos tenemos como nanosistemas protagonistas a las micelas, los liposomas, los dendrímeros, las nanopartículas, las nanocápsulas, los nanotubos y los conjugados poliméricos. En lo que a nanofarmacología se refiere podemos diferenciar dos clases de estrategias básicas, dependiendo de si se emplean excipientes o polímeros ya validados, o si por contra se opta por otros enteramente nuevos. Cada una de estas estrategias es poseedora de sus propios beneficios y riesgos técnicos. Normalmente, la incorporación de nuevos compuestos a formulaciones farmacéuticas puede asociar el inconveniente de una mayor inversión (económica y temporal) que el desarrollo de un principio activo, ya que en nanomedicina los prototipos poseen componentes ya formulados de forma diferenciada y específica. El desarrollo de formas farmacéuticas con nuevas sustancias presenta una serie de necesidades que en muchas ocasiones pueden transformarse en barreras [31]:

- Caracterización del compuesto y sus metabolitos: resulta fundamental conocer exactamente cómo se degrada, qué metabolitos genera y qué riesgos supone. En estadios preclínicos, es básico disponer de herramientas analíticas adecuadas que nos otorguen información sobre farmacocinética, mecanismo de acción, liberación, metabolismo, perfil de seguridad, etc. Conseguir dichas herramientas no es, por lo tanto, una cuestión banal.
- Reproducibilidad entre lotes de producto: puede existir una importante variabilidad inicial que obliga a estandarizar procedimientos de fabricación (producción y calidad).
- Una vez que obtenido un procedimiento de trabajo sólido, resulta mandatorio disponer de un proceso escalable y viable a nivel industrial. Múltiples líneas de investigación no logran la consecución de sus objetivos por falta de rentabilidad o viabilidad.
- Aumento de la cantidad de formulaciones estudiadas a fin de detectar eventuales efectos o sinergias de los nuevos componentes (en 2ª fase clínica, por ejemplo). En varios trabajos, se ha visto que la presencia de nuevas sustancias conlleva la necesidad de realizar una 1ª fase clínica que garantice que la formulación es tolerable y segura.

En caso de emplear excipientes ya conocidos previamente, los materiales presentarán una química y un metabolismo sobradamente caracterizados al ya existir en el mercado productos con este tipo de compuestos ya aprobados y validados por las agencias regulatorias. Es por eso que en estos prototipos los parámetros de mayor relevancia dependen del propio método de encapsulación y del comportamiento del nanofármaco en el organismo (liberación, ritmo de degradación, estabilidad del principio activo, etc.) [32].

Además de las muchas barreras técnicas, no podemos perder de vista el arduo proceso de aprobación a los que son sometidos los nuevos materiales, previamente a su uso clínico, por parte de las agencias regulatorias, que si ya de por sí supone una barrera importante se hace aún mayor y más compleja con los nuevos materiales [33].

RECOMENDACIONES

1. Avance en la creación de una regulación en materia de nanopartículas, dentro de la cual se consideren aspectos como:
 - La investigación y desarrollo de nuevos materiales biocompatibles.
 - Los análisis de toxicidad (tanto *in vitro* como *in vivo*) para las nanopartículas y sus productos de degradación eficazmente adaptados.
 - La homogeneización de las técnicas analíticas validadas para confirmar la identidad, resistencia y estabilidad de los nuevos nanofármacos.
 - La estabilidad e integridad de las nanopartículas en diferentes ambientes biológicos.
 - El desarrollo de nanoformulaciones con una aceptable vida media.

Un producto novedoso nacido de la nanotecnología va a tener que enfrentarse, necesariamente, a múltiples obstáculos antes de ser aprobado; por una parte, será preciso “encajar” este nuevo producto en un sistema de clasificación ya establecido y, por otra, la agencia regulatoria encargada deberá dotarse de un nivel adecuado de experiencia científica en el campo de la nanomedicina; ambos factores son esenciales para asegurar la innovación en el ámbito nanofarmacéutico.

2. Interdisciplinariedad: resulta básico fomentar las relaciones universidad - empresa, aplicando eficazmente herramientas de transferencia de tecnología y resultados de investigación. Asimismo, resultan de gran ayuda la creación de redes de colaboración y las facilidades de comunicación que medien entre el entorno académico y las farmacéuticas tradicionales.
3. Colaboración en entornos de “innovación abierta”: esto debería formar parte de “políticas científicas”, con consenso en cuanto a la cooperación entre grupos de investigación multidisciplinares y la financiación de proyectos.

4 NANOTERAPIA Y CÁNCER

Es bien sabido que la incidencia de cáncer ha ido aumentando en las últimas décadas, y la erradicación de los tipos principales de la enfermedad sigue siendo objetivo clínico esquivo debido, en gran parte, a la heterogénea y peculiar naturaleza de los distintos tipos de cáncer y a la imposibilidad de dirigirse específicamente hacia áreas neoplásicas sin dañar tejidos sanos circundantes. Se trata, por tanto de uno de los problemas de salud prioritarios en la actualidad, ya que pese a los importantes avances de las últimas décadas, los diversos tratamientos actuales siguen planteando múltiples problemas. La mayoría de los agentes antitumorales actualmente administrados basándonos en protocolos terapéuticos validados son sistémicamente distribuidos sin localización preferente por el tejido canceroso, encontrándose mayoritariamente limitados a la radiación y a la quimioterapia, técnicas altamente invasivas e incómodas para el paciente y que en muchos casos conducen a la alteración de la salud. Esta vasta biodistribución de quimioterápicos resulta tanto en efectos anticancerosos como en efectos adversos “off-target” [34].

Además de las importantes limitaciones mencionadas relativas a la reducida especificidad de los agentes quimioterapéuticos por las células tumorales, existen muchas otras, como la vida media corta que presentan los fármacos en circulación debido al rápido aclaramiento *in vivo* y la resistencia a muchos fármacos ejercida por las células tumorales. Hasta ahora, solo unos pocos materiales nanoterapéuticos (y diagnósticos) han sido aprobados por la US Food and Drug Administration (FDA) para su uso clínico, aunque muchos más se hallan en distintas etapas de desarrollo preclínico y clínico. Dado que la mayoría de estos productos no fueron diseñados específicamente para tener selectividad hacia dianas biológicas, deben considerarse nanofármacos de primera generación [4,35].

Se podría medir la eficacia de un tratamiento anticanceroso en base a su capacidad para reducir el tamaño tumoral o eliminarlo, sin ocasionar durante el proceso efectos deletéreos en la salud. El objetivo principal no es otro que prolongar el tiempo de supervivencia y la calidad de vida del paciente; para ello, una vez demostrada la efectividad de un fármaco *in vitro*, resulta fundamental que su biodisponibilidad y biodistribución en el organismo sean óptimos [36]. La biodisponibilidad dependerá de la cantidad de fármaco activo que alcanza el lecho tumoral, sin olvidar que la dosis administrada no debe superar en ningún caso la dosis tóxica letal. La utilización de NTs hace posible incrementar la concentración del fármaco, minimizar su inactivación y/o reducir la toxicidad, al tiempo que mejora su estabilidad y solubilidad.

Utilizando métodos terapéuticos convencionales, las moléculas de fármaco libre, llegan al tejido enfermo, pero de la misma forma alcanzan regiones y tejidos sanos circundantes, ocasionando así los ya mencionados e indeseables efectos secundarios. En esta línea, la biodistribución de un fármaco puede verse modificada cuando se utilizan NTs gracias al denominado “efecto de aumento de permeabilidad y retención” (EPR, del inglés, Enhanced Permeability and Retention effect).

Hasta la fecha, las estrategias utilizadas para conseguir la acumulación de los NTs contenientes del fármaco en el tumor se basan, tal y como estudiaremos más adelante, en dos mecanismos: el direccionamiento pasivo y el activo.

4.1 Fármacos clínicamente aprobados

Entre una amplia variedad de nanosistemas, sólo unos pocos como Doxil[®] (Janssen Biotech Inc., Horsham, PA, USA), Myocet[®] (Sopherion Therapeutics Inc., Princeton, NJ, USA), DaunoXome[®] (Galen US Inc., Souderton, PA, USA), Depocyt[®] (Pacira Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA, USA), Abraxane[®] (Celgene Corporation, Inc., Berkeley Heights, NJ, USA), Genexol-PM[®] (Samyang Biopharmaceuticals Corporation, Jongno-gu, Seoul, Korea), y Oncaspar[®] (Enzon Pharmaceuticals Inc., Bridgewater, NJ, USA) están aprobados para su uso en el tratamiento del cáncer (Tabla 1).

Doxil, la primera nanomedicina en obtener la autorización de la FDA para el tratamiento de sarcoma de Kaposi en 1995 y en Europa en 1997 con el nombre comercial CAELYX[®], se obtuvo mediante la encapsulación de doxorubicina en liposomas [37,38]. Este nanoformulación mejoró enormemente el perfil farmacocinético y de biodistribución de la doxorubicina, posibilitando así una mayor vida media en circulación y maximizando la acumulación del fármaco en el tejido tumoral. Sin embargo, a pesar de la validación clínica de este prototipo representativo de tecnología liposomal en el tratamiento del cáncer de mama metastásico, cáncer de ovario y mieloma múltiple, esta clase de nanovehículos generalmente no proporcionan la liberación controlada y la estabilidad necesarias para controlar el perfil de cinético y la distribución del fármaco en el tejido tumoral de destino. Las formulaciones de doxorubicina liposomal no pegilada, Myocet y DaunoXome, han sido utilizados para el cáncer de mama metastásico y el sarcoma de Kaposi, respectivamente [19,40]. Además, DepoCyt, un nanocarrier liposomal no pegilado cargado con citarabina, fue aprobado en 1999 para el tratamiento intratecal de la meningitis linfomatosa, habiendo entrado ahora en Fase III de estudio para la leucemia y en Fase I/II para el glioblastoma [39].

Otra nanoformulación terapéutica clínicamente segura y aprobada por la FDA (en 2005) es Abraxane, un co-condensado de albúmina y paclitaxel [40]. En comparación con el paclitaxel formulado utilizando Cremophor[®], Abraxane demostró significativamente mayores tasas de respuesta tumoral y mayor tiempo en la progresión tumoral en pacientes con cáncer de mama metastásico. Más recientemente, en 2007 en Corea, otro nanocarrier polimérico fue aprobado para su comercialización, Genexol-PM, un bloque poli(ácido láctico)-poli(etilen glicol) cargado con paclitaxel en formulación micelar, que fue desarrollado para evitar la necesidad de utilizar Cremophor [41]. Genexol-PM condujo a un aumento en la potencia de paclitaxel en el tratamiento del cáncer de mama y el cáncer de pulmón, y está actualmente en la fase II de desarrollo clínico en los EE.UU. y Rusia. En lo que respecta a dispositivos pegilados, Oncaspar, una combinación de PEG-L-asparaginasa, ha sido recientemente aprobado para el tratamiento de la leucemia [39].

NOMBRE	FORMULACIÓN	COMPONENTE BIOACTIVO	INDICACIÓN	ESTADO
<u>LIPOSOMAS</u>				
DaunoXome [®]	Liposomas no PEGilados	Daunorrubicina	Sarcoma de Kaposi	Aprobado
Myocet [®]	Liposomas no PEGilados	Doxorrubicina	Cáncer de mama	Aprobado
Onco TCS [®]	Liposomas no PEGilados	Vincristina	Linfoma No Hodgkin	Aprobado
Depocyt [®]	Liposomas no PEGilados	Citarabina	Leucemia Glioblastoma	Fase III Fase I/II
Doxil [®] /Caelyx [®]	Liposomas PEGilados	Doxorrubicina	Cáncer de mama Cáncer de ovario Mieloma Múltiple Sarcoma de Kaposi	Aprobado
Thermodox [®]	Liposomas PEGilados	Doxorrubicina	Cáncer de hígado Cáncer de mama	Fase III
SPI-77	Liposomas PEGilados	Cisplatino	Cáncer de ovario	Fase II
NL CPT	Liposomas PEGilados	Irinotecan	Glioma	Fase I
<u>NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS</u>				
Genexol-PM [®]	PEG-poli(ácido láctico)	Paclitaxel	Cáncer de mama Cáncer de pulmón Cáncer de ovario	Fase II
NK105	PEG-poli(ácido aspártico)	Paclitaxel	Cáncer gástrico Cáncer de mama	Fase I Fase III
NK911	PEG-poli(ácido aspártico)	Doxorrubicina	Varios tumores sólidos	Fase II
OpaxioTM	PGA-paclitaxel	Paclitaxel	Cáncer de pulmón Cáncer de ovario	Fase III
CRLX101	PEG-ciclodextrina	Camptotecina	Cáncer de pulmón no microcítico	Fase II
NC-6004	PEG-poli(ácido glutámico)	Cisplatino	Cáncer de páncreas	Fase II
ProLindacTM	HPMA	DACH-Pt	Cáncer de ovario	Fase II
<u>OTROS</u>				
Abraxane [®]	A base de albúmina	Paclitaxel	Cáncer de mama	Aprobado
Paclical [®]	Derivado retinoide micelar	Paclitaxel	Cáncer de ovario	Fase III
NC-4016	PEG/poli(aminoácido micelar)	Oxaliplatino	Varios tumores sólidos	Fase I/II
Oncaspar [®]	PEG-L-asparaginasa	Asparagina específica de enzima	Leucemia linfobástica aguda	Aprobado

Tabla 1: Nanosistemas no dirigidos en terapia anticancerosa

4.2 Fármacos en desarrollo clínico

A pesar de los progresos en el desarrollo clínico de nanotransportadores basados en liposomas, hay varios aspectos que limitan su consideración definitiva como principal plataforma de liberación de fármacos, entre los que se incluyen:

- La dificultad en la modulación de la liberación *in vivo*.
- La limitada cantidad de fármaco que puede ser cargado.
- La posible oxidación de fosfolípidos liposomales.
- La dificultad de mantener una vida útil estable.

Además, los nanotransportadores poliméricos han demostrado tener una estabilidad *in vivo* similar e incluso superior en comparación con los liposomas y una alta capacidad de carga; además, posibilitan la liberación tanto controlada como “provocada” de fármacos. Podríamos llegar así a la conclusión de que los nanomateriales basados en polímeros tienen el potencial de aportar soluciones a una amplia gama de problemas en el campo de la nanomedicina [35,41-43].

El camino hacia el futuro en la implantación clínica de nanopartículas poliméricas de liberación controlada fue allanado por el fecundo trabajo de Langer y Folkman en 1976, que demostró la liberación controlada de macromoléculas de polímeros biodegradables de forma temporal. Además, una influyente publicación de Langer et al. en 1994 arrojó la luz adicional necesaria para demostrar que los copolímeros “diblock” de polímeros biocompatibles con PEG pueden ser capaces de aumentar drásticamente el control de la liberación y la vida media en circulación de nanopartículas poliméricas [37]. Por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y flexibilidad química y tecnológica, los materiales poliméricos más ampliamente utilizados para la liberación controlada de medicamentos incluyen PLA, poli(D,L-láctico-co-glicolide) (PLGA), poli(caprolactona) (PCL), poli(ácido glutámico), N-(2-hidroxipropil-metacrilato copolímeros) y poli(aminoácidos).

4.2.1 Estrategias de “drug-targeting”- “direccionamiento de fármacos”

Desde que Paul Ehrlich, considerado el “padre de la quimioterapia”, sugiriera el concepto de “bala mágica”, esto es, “una droga que ataca selectivamente a células enfermas, pero no es tóxica para las sanas” hace aproximadamente un siglo, se ha generado un gran interés en esta dirección, centrándose especialmente en el tratamiento del cáncer. Entre las muchas estrategias explotables para alcanzar una diana biológica específica podemos incluir: “targeting” pasivo, “targeting” activo, “targeting” activo hacia células endoteliales y liberación “dependiente de estimulación” (Figura 5) [35,42,43].

Direccionamiento pasivo

Esta estrategia supone la acumulación de los NTs en regiones corporales específicas, debido a las características fisiológicas del propio tejido. El ejemplo clásico de direccionamiento

pasivo es fácilmente explicable mediante el efecto EPR asociado a la vascularización de los tumores sólidos.

EFFECTO DE AUMENTO DE PERMEABILIDAD Y RETENCIÓN

Las características fisiopatológicas de los tumores sólidos, (y de las áreas inflamadas e infartadas), propician la acumulación y retención prolongada de macromoléculas en estas zonas [44,45]. Este efecto fue demostrado por primera vez mediante la inyección intravenosa de un colorante azul (Evans blue) unido a albúmina en tumores de roedores. La distribución de los compuestos inyectados fue significativamente distinta, apreciándose un intenso color azul en la zona tumoral con respecto al tejido sano, sin color.

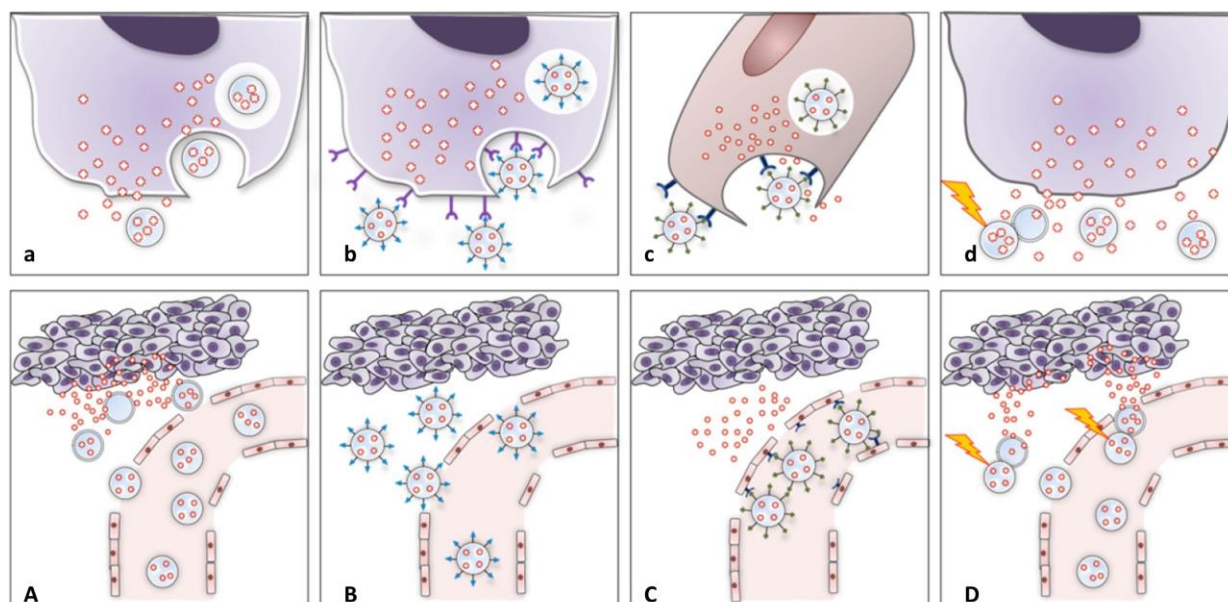


Figura 5: Estrategias adoptadas para el direccionamiento de fármacos y nanosistemas hacia células y tejidos tumorales.

NOTA: (A) Direccionamiento pasivo: las nanopartículas circulantes difunden pasivamente hacia el tejido tumoral gracias a la permeabilidad aumentada de los vasos sanguíneos (la vasculatura que rodea a un tumor sólido tiende a ser pobre y desorganizada, lo que se suma a la ausencia de drenaje linfático y a la acumulación preferente en células tumorales –efecto EPR–) (a) El fármaco se libera hacia la matriz extracelular y difunde a través de las células hacia el tejido tumoral. (B) Direccionamiento activo: una vez las nanopartículas se han extravasado pasivamente y concentrado en el tejido diana gracias al efecto EPR, la presencia de ligandos en la superficie de la nanopartícula posibilita el direccionamiento activo de la misma hacia receptores que tienden a sobreexpresarse en las células y tejidos tumorales, resultando todo ello en una absorción mejorada y en una internalización vía endocitosis mediada por receptor. (b) Los ligandos específicos de tumor de las nanopartículas se unen a la superficie celular de los receptores, desencadenando su internalización en la célula a través de endosomas en los cuales, debido al pH interno ácido, el fármaco se libera de la nanopartícula y difunde hacia el citoplasma. (C) Direccionamiento activo hacia células endoteliales: las nanopartículas pueden ser programadas para unirse a receptores de superficie de células endoteliales angiogénicas con el objetivo de: aumentar la cantidad de fármaco acumulado en el endotelio tumoral, inhibiendo por tanto el crecimiento vasos sanguíneos que nutren al tumor (así, no actúan sobre las células tumorales como tales) (c) mejorando de la liberación de agentes quimioterápicos hacia las células tumorales gracias al efecto EPR, con el potencial de actuar sinérgicamente al dirigirse tanto al tejido vascular como a las células tumorales propiamente dichas. (D) Liberación controlada mediante nanofármacos “sensibles a estímulos”: las nanopartículas se acumulan pasivamente en el área tumoral gracias al efecto EPR. Una vez localizados en el lugar “diana” o mientras circulan a través de la vasculatura tumoral (d) las nanopartículas pueden ser activadas mediante estímulos externos (como hipertermia, luz, campos magnéticos, ultrasonidos...) que inducen la liberación de los fármacos precargados.

En el momento que los agregados de células tumorales alcanzan un diámetro de 1-2 mm, la difusión de nutrientes y oxígeno se ve dificultada, lo cual desencadena el proceso de angiogénesis que conduce a la formación de neovasos. Estos vasos sanguíneos recién formados en el lecho tumoral presentan una estructura irregular e incompleta en comparación con la vasculatura de los tejidos sanos, con una capa endotelial que presenta discontinuidades (poros) causadas por la ausencia de uniones intercelulares estrechas. Además, su pared no presenta células musculares lisas que permitan regular el flujo sanguíneo, así como tampoco expresan el receptor de angiotensina II. Otra característica fisiopatológica tumoral es la elevada producción de mediadores vasculares como la bradiquinina, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), prostaglandinas, colagenasas, etc., que facilitan la extravasación de sustancias [46] (Figura 5A).

Todas estas características derivan en un aumento en la permeabilidad de la vasculatura en el tejido tumoral. A esto se suma la práctica ausencia de sistema linfático intratumoral, provocando la retención de las macromoléculas acumuladas en el intersticio del tejido patológico. Así, macromoléculas mayores de 40 KDa y partículas de tamaño comprendido entre 10-500 nm se acumulan en el tejido patológico por el efecto EPR [47] (figura 6).

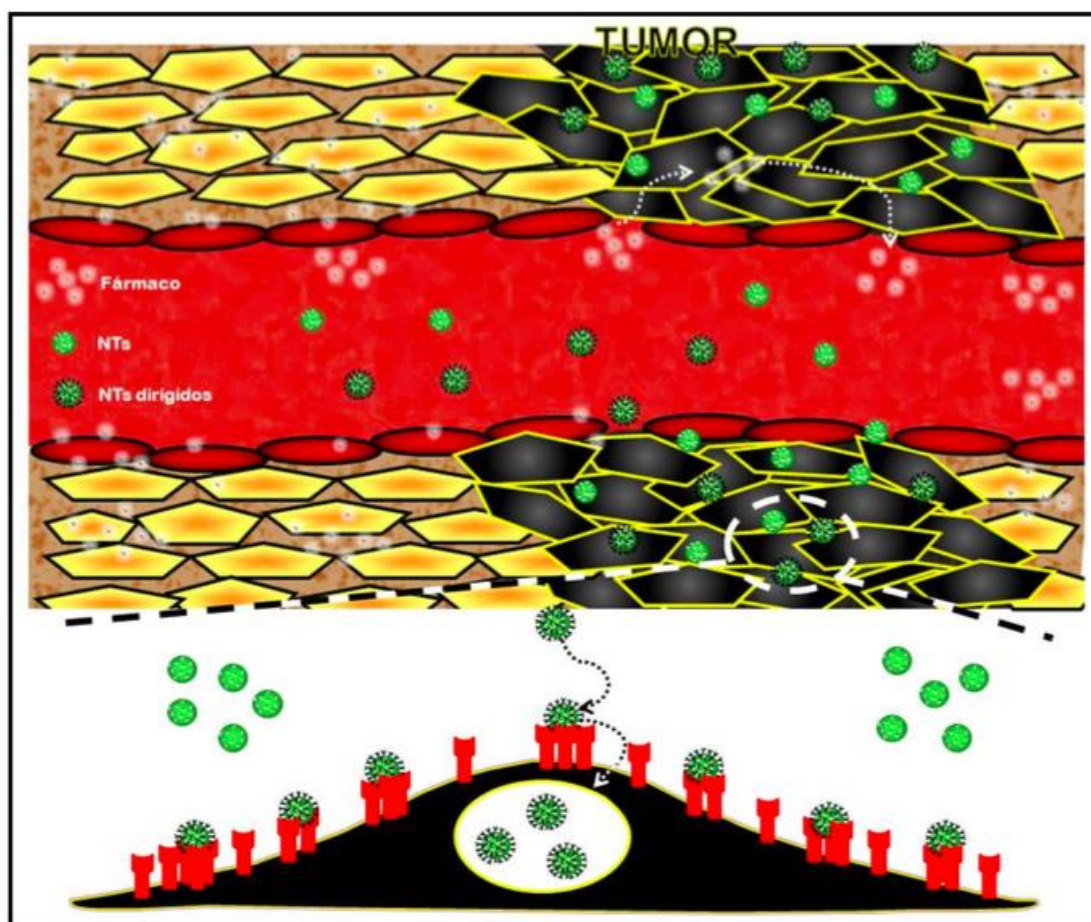


Figura 6 Efecto de aumento de permeabilidad y retención (EPR). Representación de los fármacos administrados de forma libre y vehiculizados en NTs con y sin direccionamiento.

ACLARAMIENTO PLASMÁTICO DE LOS NTS

Con el fin de optimizar el efecto EPR, conviene que los NTs permanezcan estables en el torrente circulatorio el tiempo suficiente para que tenga lugar la acumulación del fármaco en el tumor. Con este objetivo, tras la inyección de los NTs, el primer reto es que no interaccionen con los componentes sanguíneos; es primordial, por tanto, evitar el desarrollo de NTs cuya superficie posea moléculas hidrofóbicas.

Durante su tiempo en circulación, los órganos donde pueden ser eliminados los NTs de forma preferente son el riñón, el hígado y el bazo. Un conocimiento detallado de la función y estructura de estos órganos nos permite seleccionar las características físico-químicas que deberían poseer los nanosistemas para eludir el aclaramiento en estos órganos.

Como sabemos, la misión fisiológica del riñón consiste en la filtración del plasma sanguíneo a través de la barrera de filtración glomerular, cuya superficie se encuentra cargada negativamente y posee un tamaño de poro de aproximadamente 6 nm. Por tanto, el uso de NTs de tamaño superior de 6 nm en cualquiera de sus dimensiones, bloquearía su aclaramiento renal. En lo que a la carga se refiere, se debe evitar el uso nanosistemas cargados positivamente, pues con independencia de su tamaño son atraídos eléctricamente hacia la barrera de filtración. Su forma y flexibilidad pueden asimismo condicionar su excreción renal, de forma que las estructuras muy hidrodinámicas pueden modificar el diámetro efectivo dependiendo de las fuerzas físicas a las que estén sometidas. Así, resulta lógico pensar que con el objetivo de evitar la excreción renal, deberían utilizarse, en definitiva, nanosistemas poco maleables, con un tamaño mayor de 6 nm y con carga eléctrica neutra o negativa.

El hígado y el bazo, por su parte, son órganos caracterizados por sus capilares discontinuos (sinusoides) con un importante desarrollo del SMF. Dado que los nanosistemas son sustancias desconocidas y a priori “sospechosas” para el organismo, un tamaño >300 nm y una carga excesivamente negativa favorecerían el rápido reconocimiento por parte de los macrófagos. Los compuestos hidrofóbicos, además, tienen tendencia a asociarse a proteínas séricas, siendo así reconocidos por los macrófagos y eliminados fundamentalmente en el hígado. Por todo esto, el parámetro principal a tener en cuenta a la hora de disminuir el atrapamiento de los NTs por el SMF es su tamaño, debiendo ser inferior a 300 nm, puesto que los poros sinusoidales tienen unas dimensiones aproximadas de 150 nm.

La estabilidad en sangre por un lado y la reducción del reconocimiento por los macrófagos por otro, son objetivos realizables mediante el revestimiento de los NTs con polímeros hidrofílicos (PEG o carbohidratos), que proporcionan, tal y como hemos mencionado anteriormente, una conveniente capa de hidratación. El adecuado desarrollo de nanosistemas permite aumentar el tiempo de circulación en sangre y, de esta forma, la acumulación de macromoléculas en el intersticio tumoral por el efecto EPR. Este fenómeno, común a todos los tumores sólidos, permite, como ya dijimos, el direccionamiento pasivo de fármacos.

Resulta fundamental tener en cuenta que tanto el aumento de permeabilidad como el efecto de retención son fenómenos muy heterogéneos, variando drásticamente de tumor de tumor y de paciente a paciente. En este sentido, aun considerando un único modelo de tumor, existen muchas diferencias con respecto a la permeabilidad vascular (partículas con un diámetro >200-300 Nm podrían ser capaces de extravasarse en un determinado área tumoral, mientras en otra parte del mismo tumor, moléculas sólo unos pocos nanómetros mayores podrían tener dificultad para entrar en el intersticio).

La mayoría de nanosistemas de focalización pasiva tienen una superficie revestida con PEG por motivos de biocompatibilidad y de "sigilo biológico, ocultamiento" [47]. Es importante subrayar el hecho de que un incremento en la hidrofiliidad de la nanopartícula puede impedir su absorción por parte de las células cancerosas, impidiendo así la entrega efectiva de fármacos a los tumores mediante este sistema de focalización pasiva [47,48]. Sin embargo, los copolímeros de bloque basados en PEG se han traducido clínicamente en numerosas nanopartículas poliméricas de focalización pasiva, incluyendo el ya mencionado Genexol-PM, así como SP1049C, NK911 y otros prototipos que están ahora en fases iniciales de ensayos clínicos para el tratamiento de gran cantidad de cánceres.

SP1049C es una nanopartícula polimérica micelar "Plurónica" portadora de doxorrubicina, encontrándose actualmente en fase II de ensayos clínicos para el cáncer metastásico de esófago refractario a protocolos quimioterapéuticos estándar [49]. Otro ejemplo de nanocarrier polimérico que actúa a través de un mecanismo de focalización pasiva es NK911, una nanopartícula micelar compuesta de PEG, doxorrubicina y poli(ácido aspártico), actualmente en Fase II de desarrollo clínico para diversos tipos de cáncer. También OpaxioTM (antes XyotaxTM), otra nanoconstrucción de focalización pasiva de paclitaxel/poli(L-ácido glutámico), está resultando eficaz para tumores ováricos [50], y CRLX101 (antes IT-101), un polímero conjugado de camptotecina-cyclodextrin, está mostrando una eficacia farmacocinética mejorada tanto en estudios clínicos como preclínicos. Otros nanoterápicos poliméricos conjugados como NC-6004 [un copolímero en bloque de formulación micelar de cisplatino que incorpora PEG-poli(ácido glutámico)] y ProLindacTM (un profármaco de diaminociclohexano-platino hidroxipropilmetacrilamida), están en fases finales de ensayos clínicos. Además, Paclical®, una formulación micelar de paclitaxel, ha recibido recientemente la designación de medicamento huérfano por la FDA y está actualmente en ensayos de Fase III para el carcinoma ovárico [51]. Nanocarriers lipídicos de focalización pasiva están entrando también en etapas avanzadas de ensayos clínicos, y se está realizando un intenso esfuerzo para incluir estos sistemas en la práctica clínica. Nanofármacos liposomales prometedores en fase de ensayo incluyen Thermodox®, una formulación de doxorrubicina liposomal termosensible que libera la droga activa a temperaturas de unos 39°C y que actualmente se halla en ensayos clínicos de fase III junto a la ablación por radiofrecuencia en pacientes con carcinoma hepatocelular. Por último, SPI-77, una formulación liposomal pegilada de cisplatino, está en ensayos de Fase II para pacientes con cáncer epitelial de ovario recidivante, y una formulación nanoliposomal de irinotecán (CPT-11) está en ensayos de Fase I para el glioma. Varias formulaciones liposomales portadoras de dos tipos distintos de la quimioterápicos (como citarabina y daunorrubicina), parecen encontrarse también en proceso de desarrollo clínico [52].

Direccionamiento activo

Dado que las estrategias de focalización pasiva han mostrado ciertas limitaciones, una considerable cantidad de trabajo y esfuerzo están ya en marcha para la investigación de nanoformulaciones de focalización activa que puedan maximizar su acumulación en dianas de interés. En este sentido, nanopartículas poliméricas están haciendo posibles versátiles modificaciones, pudiendo actuar como plataformas funcionales para el montaje de estructuras multifuncionales bien definidos [53].

Como veremos, pequeñas variaciones en la composición polimérica así como la funcionalización de las superficies de unión al ligando pueden facilitar la capacidad de focalización de las nanopartículas hacia sistemas biológicos. La focalización farmacológica activa implica la utilización de una amplia variedad de ligandos de afinidad para dirigir el enlace de nanopartículas hacia múltiples dianas biológicas, representadas por antígenos, que se sobreexpresan de forma diferencial tanto en la membrana plasmática como en el tejido enfermo (Figura 5B y b) [35,54]. Este enfoque puede utilizarse para aplicaciones de liberación controlada de medicamentos, donde el fármaco es liberado en el compartimiento intracelular o extracelular. En este último proceso, la internalización de las nanopartículas por endocitosis mediada por receptor puede ocurrir a través de varias vías que conducen a la formación de endosoma, y permitirá, en última instancia, la generación de los lisosomas [55]. Puesto que la principal función del ligando de focalización es la mejora en la absorción de nanopartículas en las células diana, la internalización celular por nanopartículas de focalización activa se postula como firme candidata para mejorar la eficacia terapéutica en comparación con nanopartículas no dirigidas [42,43].

Esto nos lleva a pensar que, mientras la biodistribución se relaciona estrictamente con las propiedades coloidales de las nanopartículas, el ligando de focalización es importante para mejorar tanto el reconocimiento celular como la internalización celular en los sitios de destino. Pese a que los beneficios potenciales de las nanopartículas de focalización activa parecen ser ampliamente aceptados, esta tecnología se ha traducido hasta ahora solamente en unos pocos nanofármacos clínicamente validados (Tabla 2).

NOMBRE	FORMULACIÓN	LIGANDO DE UNIÓN	COMPONENTE BIOACTIVO	INDICACIÓN	ESTADO
<u>LIPOSOMAS</u>					
CALAA-01	NP a base de ciclodextrina conteniendo anti-RRM2	Transferrina	siRNA	Tumores sólidos	Fase I
MBP-426	Liposomas	Transferrina	Oxaliplatino	Adenocarcinoma gastroesofágico	Fase II
MCC-465	Liposomas PEGilados	2 fragmentos F(ab) GAH humanos	Doxorrubicina	Cáncer de estómago metastásico	Fase I
SGT53	Liposomas	Fragmento Ab de cadena única del receptor anti-transferrina	Gen p53	Tumores sólidos	Fase I
C225-ILS-DOX	Liposomas PEGilados	Fragmentos de unión a antígeno (Fab) de cetuximab	Doxorrubicina	Tumores sólidos avanzados	Fase I
<u>NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS</u>					
BIND-014 (Accurins™)	PL(G)A PEGilada	Molécula pequeña	Docetaxel	Tumores sólidos	Fase II
Atu027	Liposomas	Proteinkinasa N3	siRNA	Tumores sólidos	Fase I
C-VISA-BikDD	Liposomas	Gen proapoptótico	Plásmido DNA de BikDD	Cáncer de páncreas	Fase I

Tabla 2 Nanofármacos dirigidos en desarrollo clínico

DIRECCIONAMIENTO ACTIVO HACIA CÉLULAS ENDOTELIALES Y POR “ESTIMULACIÓN EXTERNA”

Por desgracia, se han identificado varios obstáculos importantes en la focalización activa de fármacos hacia células tumorales, entre los que se incluyen:

- La mala penetración tumoral de los nanofármacos.
- La complejidad a la hora de predecir la utilidad potencial de un fármaco dirigido activamente para una aplicación específica.
- La dificultad para manejar nanoformulaciones demasiado complejas en su diseño.
- La implementación no siempre favorable de nanoformulaciones en regímenes terapéuticos combinados clínicamente consistentes.
- El bajo nivel de conocimientos sobre los procesos biológicos y fisiopatológicos principales en la progresión tumoral y el correspondiente tratamiento.

El fracaso clínico de un gran número de nanofármacos puede atribuirse a la incapacidad de las nanopartículas dirigidas de superar una sucesión de membranas que actúan como barreras biológicas (representadas por capas celulares, entre el endotelio y las células tumorales, basadas en pericitos, células musculares lisas y fibroblastos), así como a un gran número de procesos celulares y anatómicos referentes al tumor (como la alta densidad celular de los tumores sólidos y la alta presión del líquido intersticial) que representan obstáculos importantes para alcanzar el estroma tumoral [42].

Para abordar estas cuestiones, varias nanoformulaciones dirigidas/focalizadas a nivel vascular han sido diseñadas y evaluadas hasta la fecha (Figura 5C y c). Ejemplo de ligandos focalizados al endotelio angiogénico son los derivados lineales y cíclicos de un oligopéptido que contiene la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que se une al endotelio de destino vía receptores de integrina [56].

Otra estrategia capaz de generar nanoformulaciones innovadoras se centra en la posibilidad de que un nanosistema pueda activarse para liberar su contenido (es decir, la carga farmacológica) ante la exposición a estímulos externos concretos, tales como la luz, el calor, ultrasonidos o campos magnéticos, a fin de maximizar la liberación del fármaco en el sitio patológico (Figura 5D y d). El ya mencionado Thermodox (un liposoma de doxorrubicina pegilada sensible a temperatura), constituye un ejemplo interesante de nanofármaco de respuesta a estímulos [57].

Pese al potencial clínico de estas nanoformulaciones, aún persisten limitaciones importantes para su implementación clínica, incluyendo las dificultades en la fabricación y los problemas con la gestión de la forma en que responden a los estímulos sensibilizadores de liberación. Sin embargo, se continúa haciendo grandes esfuerzos para mejorar la capacidad de respuesta a los estímulos de estos nanofármacos y para desarrollar nanopartículas más eficaces que optimicen la entrega del medicamento en el futuro [58].

4.2.2 Métodos y ligandos utilizados para la liberación controlada de fármacos

En el transcurso de la última década se han desarrollado varias estrategias de conjugación de ligandos de focalización con la superficie de las nanopartículas [41,42]. En lo que se refiere a alcanzar la “diana”, una cuestión clave implica la elección de ligandos de focalización óptimos, lo cual es posible encontrando el equilibrio entre la estequiometría y las peculiaridades “antiincrustamiento” de la superficie de la nanopartícula. Concretamente dos importantes propiedades del ligando, la afinidad y la densidad, juegan un papel clave en el direccionamiento efectivo de las nanopartículas hacia la superficie de la membrana celular. La afinidad para la unión del ligando será el resultado del equilibrio entre ventajas entálpicas (para la interacción ligando-receptor) y pérdidas entrópicas (estiramiento, flexibilidad o compresibilidad del nanosistema). Por ejemplo, una mayor densidad de ligandos no conduce necesariamente a una mayor concentración intracelular, dada la disminución del “sigilo” de la superficie. Además, aunque la absorción de nanopartículas generalmente aumenta con un aumento del ratio de cargas (+/-), un exceso de cargas positivas puede inducir toxicidad y promover una reacción inmunológica. Por tanto, la óptima densidad de ligando y carga en la superficie de la nanopartícula debe investigarse caso por caso. En este sentido, disponemos de una amplia gama de modificaciones químicas para anclar los ligandos de focalización a las nanopartículas [59].

Los métodos convencionales de preparación de nanopartículas dirigidas implican dos opciones típicas, a saber, los abordajes “precoupling” o pre-acoplamiento y “postcoupling” o post-acoplamiento. El primero implica la bioconjugación del núcleo preformado de la nanopartícula con los ligandos de focalización a la superficie de la misma. El abordaje “postcoupling” para acoplar ligandos de afinidad no permite un ajuste preciso de la densidad

de ligandos en la superficie. Por otro lado, estrategias más eficaces y novedosas incluyen la preconjugación de un ligando de focalización tras la formación de la nanopartículas seguido de la nanoformulación (método "precoupling"). Como ejemplo, el efectivo auto-ensamblaje de polímeros tribloque prefuncionalizados, logrado por Farokhzad y Langer [60], demostró la posibilidad de desarrollar nanopartículas dirigidas capaces de controlar los ratios ligando-nanopartículas y evitar una distribución heterogénea de ligandos en la superficie de las nanopartículas. Resumiendo: es evidente que una combinación de varios factores "impredecibles" como la naturaleza del ligando, el tamaño, la forma y la composición de los nanosistemas diana, así como el equilibrio entre el ratio ligando-superficie de nanopartícula, sinérgicamente, pueden contribuir a la eficiencia de la unión entre nanopartículas selectivas y sus células diana, afectando directamente el perfil biológico *in vivo*. Todos estos aspectos deben ser, por tanto, investigados racionalmente a la hora de desarrollar un nanosistema.

Los abordajes a través de los cuales las nanopartículas pueden ser funcionalizadas mediante ligandos de focalización incluyen: anticuerpos monoclonales (o sus fragmentos), péptidos, proteínas, ácidos nucleicos (como los aptámeros) y moléculas pequeñas, cuyas características se describen en las siguientes secciones (Figura 7) [61].



Figura 7 Tipos de ligandos utilizados para direccionar nanopartículas

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales han sido durante varios años la clase preferida de ligandos de focalización; así, la ingeniería de anticuerpos monoclonales, preferiblemente de aquellos con capacidad de evadir el sistema inmune, ha sido ampliamente utilizada en el desarrollo de nanopartículas dirigidas. El desarrollo actual de los anticuerpos monoclonales ha conducido a derivados quiméricos y humanizados que permiten la modulación de su inmunogenicidad. La capacidad de los anticuerpos monoclonales diseñados para dirigirse hacia e interferir con los procesos celulares ha sido demostrado por el éxito de varias terapias [62]. Algunas de ellas, incluyendo rituximab y trastuzumab, se han conjugado con nanopartículas PLA, obteniéndose nanoconjugados que muestran un aumento significativo de la tasa de captación de partículas en comparación con sus contrapartes no dirigidos. Sin embargo, a pesar de los intensos esfuerzos realizados para su desarrollo, en los anticuerpos monoclonales aún persisten una serie de limitaciones, entre ellas:

- Su gran tamaño.
- Sus exigentes requerimientos de optimización mediante tecnologías de ingeniería molecular.
- La dificultad de gestionar su escalada terapéutica y su fabricación.
- Las características inmunogénicas que derivan en un rápido aclaramiento.

Debido a estos problemas en el uso de anticuerpos monoclonales, se ha suscitado un

creciente interés en la ingeniería y uso de fragmentos de anticuerpos como moléculas de focalización, en los que se preserve la alta especificidad de unión antígeno-anticuerpo, pero con menos inmunogenicidad y un tamaño menor, obteniéndose así anticuerpos monoclonales más adecuados para la focalización molecular. Entre ellos se incluyen: fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena simple (scFv) minibodies, diabodies y nanobodies [63].

Aptámeros

Los aptámeros son secuencias pequeñas de oligonucleótidos de DNA o RNA de hebra única que pueden diseñarse como ligandos capaces de unirse a dianas con alta sensibilidad y especificidad [64]. Son de tamaño pequeño (normalmente unos 15 kDa), y menos inmunogénicos que los anticuerpos monoclonales u otras macromoléculas, condicionando una mejor estabilidad y biodistribución [65]. Estas biomoléculas se pliegan mediante complejas interacciones intramoleculares en conformaciones tridimensionales únicas, adquiriendo así las características de unión al ligando necesarias para la eficiente afinidad receptor-antígeno diana. Determinados aptámeros, con afinidad hacia un objetivo específico, están siendo actualmente identificados mediante un proceso químico *in vitro* conocido como "evolución sistémica de ligandos por enriquecimiento exponencial" (SELEX). En este proceso, que se puede ampliar fácilmente y a un costo relativamente bajo, un total de diez oligonucleótidos al azar se enriquecen con el fin de identificar el prototipo de mayor afinidad y especificidad. Utilizando esta tecnología, Langer y Farokhzad diseñaron y desarrollaron nanopartículas personalizadas de liberación controlada cargadas con docetaxel, obteniendo capacidad de focalización hacia al antígeno de membrana prostático específico (PSMA) [60]. Se han obtenido nanopartículas dirigidas al incorporar a su superficie un aptámero ARN A10 capaz de unirse a PSMA [66], un marcador tumoral clínicamente validado que no sólo es sobreexpresado en la superficie de los cánceres de próstata, sino también en la neovascularización de muchos tumores sólidos. Este enfoque ha constituido la "prueba de concepto" para el desarrollo de la primera nanoformulación polimérica dirigida (BIND-014), actualmente aprobada para uso clínico (en la que nos detendremos en próximas secciones).

Moléculas proteicas y peptídicas

Proteínas endógenas capaces de unirse selectivamente a receptores de membrana específicos pueden ser utilizadas con propósitos de focalización a través de la endocitosis mediada por receptor. Por ejemplo, la transferrina (proteína transportadora de hierro) que se une específicamente a los receptores de la transferrina (TfR) de la superficie celular, ha sido utilizada para el transporte de nanopartículas en diferentes tipos de células [67]. Sin embargo, su eficacia para propósitos de focalización puede estar limitada por su inmunogenicidad y susceptibilidad al aclaramiento precoz. Los receptores diana de estas proteínas también se expresan comúnmente en varios tipos de células no seleccionadas, lo que puede conducir a efectos no deseados.

Los ligandos basados en péptidos están surgiendo como una alternativa atractiva de

focalización debido a su pequeño tamaño, alta estabilidad y relativamente baja inmunogenicidad en comparación con muchas proteínas. La identificación de ligandos de focalización específicos ha derivado generalmente en colecciones de péptidos de fagos/bacterias/plásmidos empleadas antes y ahora, así como del uso de tecnologías de detección más actuales y sencillas. De la misma forma que los anticuerpos monoclonales y los aptámeros, los péptidos pueden unirse a varias dianas moleculares con un alto grado de afinidad y especificidad, y son fáciles de fabricar mediante conjugación con polímeros, lípidos, y diversas superficies de nanopartículas [68].

Moléculas pequeñas

Las moléculas pequeñas, generalmente definidas como moléculas orgánicas de bajo peso molecular (<500 Da), constituyen una prometedora clase de moléculas de focalización por su pequeño tamaño, alta estabilidad, manejo químico, y bajo coste de producción [68]. Otras ventajas incluyen:

- La disponibilidad de métodos químicos adecuados para su fácil conjugación.
- La posibilidad de modular la densidad y la carga del ligando en la superficie de la nanopartícula (ya que estos parámetros pueden afectar a la estabilidad, tamaño, morfología y eficiencia de focalización).
- La disponibilidad de una amplia gama de ligandos de focalización con propiedades fisicoquímicas diferentes y una gran variedad de grupos funcionales.
- Los menores efectos inmunogénicos *in vivo*.
- La fabricación reproducible y económica.

De entre las muchas moléculas pequeñas identificadas como potenciales ligandos de focalización, el ácido fólico ha sido uno de los más ampliamente estudiados y utilizados [69]. Debido a su alta afinidad por los receptores de folato (sobrexpresados en muchos tipos de células tumorales), la vitamina folato también se ha utilizado en conjugados farmacológicos y muchos sistemas de liberación controlada (liposomas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros) para acumular selectivamente el fármaco en las células cancerosas mediante endocitosis mediada por receptor de folato [70].

Zhou et al [71] identificaron moléculas pequeñas hidrofílicas a partir de una serie de inhibidores PSMA a base de urea como nuevos agentes de diagnóstico capaces de dirigirse al receptor PSMA de las células de cáncer de próstata con afinidad y especificidad similares a las de anticuerpos y aptámeros. Curiosamente, una pequeña molécula de esta clase, el ácido pentanedoico pseudomimetic dipeptide 2-[[[(5-amino-1-carboxypentyl) carbamoyl]amino}], ya utilizada por Sechi et al. para desarrollo de nanopartículas de PSMA cargadas con (-)-epigallocatequina 3 y dirigidas por Chandran et al. para la preparación de nanopartículas dirigidas de docetaxel-PLA/PCL, también fue utilizada como ligando de focalización en el desarrollo de BIND-014 [72].

Otras moléculas pequeñas que podrían ser utilizadas como ligandos de focalización, como los hidratos de carbono, han recibido también una atención especial por su bajo peso molecular, alta disponibilidad, biocompatibilidad y facilidad de producción. Varios de estos ligandos se

unen a los receptores de membrana para carbohidratos (lectinas) expresados diferencialmente en las membranas celulares e intracelulares, y algunos carbohidratos, como la glucosa, galactosa, manosa, y sus derivados, han sido considerados como potenciales ligandos para la liberación selectiva de fármacos [73].

La traducción clínica de las tecnologías descritas ha derivado en una nueva era en el desarrollo de nanopartículas terapéuticas innovadoras capaces de dirigirse y liberarse controladamente, considerándose también la posibilidad de “co-liberación” de múltiples agentes activos.

4.2.3 Desarrollo clínico de nanopartículas dirigidas

Hasta la fecha, sólo tres liposomas y cuatro nanopartículas poliméricas dirigidas han avanzado en el desarrollo clínico. Un prototipo que llegó a ensayos clínicos fue MCC-465, una nueva generación de doxorubicina encapsulada liposomal con una superficie cubierta tanto por el PEG como por fragmentos de unión a antígeno [F(ab')₂] para conferir protección inmunológica y focalización, respectivamente; se utiliza en el tratamiento del cáncer de estómago. Otro liposoma dirigido es SGT53-01, una nanoformulación funcionalizada hacia TfR que contiene un fragmento de cadena de anticuerpos (TfRscFv) como ligando de focalización. Ha sido diseñado para transportar el gen supresor de tumores p53 a las células cancerosas, y está actualmente en la fase I de ensayos clínicos en combinación con doxorubicina para el tratamiento de tumores sólidos. El tercer nanocarrier liposomal sitio-específico es MBP-426, un liposoma dirigido a TfR que encapsula oxaliplatino, utilizado en clínica para el tratamiento de tumores sólidos [74].

Con respecto a determinadas nanoformulaciones polimérico, CALAA-01 fue el primer nanoterápico en lograr desarrollo clínico para la liberación de siRNA en 2008. Este nanosistema consiste en nanopartículas pegiladas a base de ciclodextrina dirigidas hacia TfR conteniendo siRNA; es capaz de reducir la expresión de la subunidad M2 de la ribonucleótido reductasa. La seguridad de CALAA-01 fue evaluada en un ensayo clínico de Fase I por administración intravenosa en adultos con tumores sólidos refractarios a las terapias estándar de tratamiento [75]. Más recientemente, un nanoimmunoliposoma anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico cargado con doxorubicina (C225- ILS-DOX) pasó a fase I de investigación para el tratamiento de tumores sólidos. Fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal quimérico cetuximab (Erbix) C225, se conjugaron covalentemente a la membrana liposomal para dirigir la nanopartículas contra las células tumorales que sobreexpresan EGFR [76].

Centrándonos en el primer nanofármaco clínicamente probado, hablaremos de BIND-014 [72], una nueva formulación de docetaxel desarrollada por un equipo dirigido por Langer y Farokhzad en el Instituto de Tecnología de Massachusetts, el Harvard Medical School, y BIND Therapeutics, como un nanofármaco programable que entró recientemente en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de pacientes con tumores sólidos. El desarrollo de BIND-014, junto con su perfil farmacobiológico y su posible papel clínico, está explicado en las siguientes secciones (Figura 8).

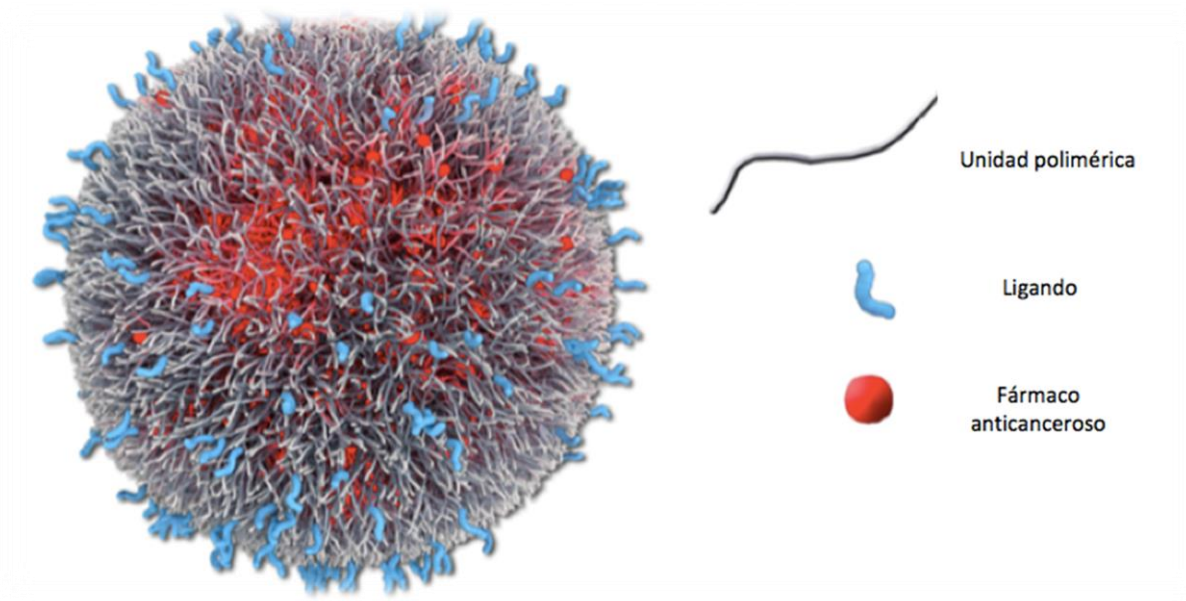


Figura 8 Representación gráfica de BIND-014 (modificada de BIND Therapeutics)

BIND-014:

La evolución del proceso que a continuación estudiaremos resultó en BIND-014, la primera nanopartícula polimérica dirigida y de liberación controlada en el tratamiento quimioterápico del cáncer en llegar a fase I de ensayo clínico en enero de 2011 [72].

DESARROLLO DE BIND-014

La traducción clínica de un nanosistema de liberación controlada de fármacos está estrechamente relacionada con una combinación óptima y sinérgica de varias características fisicoquímicas, incluyendo el tipo de polímero, el tamaño, la carga superficial, el equilibrio hidrófilo/hidrófobo, el tipo y la densidad del ligando, las propiedades del fármaco (solubilidad, carga, cinética) y la capacidad de liberación *in vivo* (es decir, la penetración tisular, el movimiento a través de membranas y barreras biológicas, la evasión inmune y la capacidad de unión e internalización en la célula [72]).

Considerando estas cuestiones, BIND Biosciences (ahora BIND Therapeutics) ha desarrollado nanopartículas personalizadas de liberación controlada mediante el uso de nuevas tecnología de alto rendimiento para lograr la optimización multifactorial de nanosistemas poliméricos. La historia de este proyecto comenzó con el trabajo pionero de Langer y Farokhzad, que supuso la prueba de concepto para el desarrollo de innovadores vehículos farmacológicos compuestos de varios materiales seguros, aprobados por la FDA, como polímeros biocompatibles (PLA, PLGA y PEG) y aptámeros dirigidos a PSMA [59,60]. Esas nanopartículas fueron cargadas con docetaxel, uno de los quimioterápicos más usados [77]. Además, en la carcasa exterior de las nanopartículas fue incorporado un espaciador hidrofílico (PEG) a fin de prevenir interacciones (entre ellas y con el medio), y así escapar a la captura del sistema

reticuloendotelial y reducir la opsonización, permitiendo el "sigilo" necesario para la evasión inmune.

La capacidad de esas nanopartículas para dirigirse al tumor fue logrado añadiendo a la superficie capsular un aptámero RNA A-10 (después reemplazado por una pequeña molécula inhibidora de PSMA a base de urea) para enlazar PSMA. Los resultados biológicos demostraron que el fármaco encapsulado interactuó eficientemente con el tumor y liberó selectivamente docetaxel a las células cancerosas de la próstata [60].

Este concepto se trasladó a BIND-014 mediante la adopción de un enfoque de auto-ensamblaje modular que involucra el uso de materiales poliméricos prefuncionalizados para generar una biblioteca combinatoria de más de 100 nanopartículas poliméricas de auto-ensamblaje de distinta composición. Esta biblioteca fue diseñada introduciendo diversidad fisicoquímica en cada nanopartícula a través de un número concreto de componentes, y variando sistemáticamente tanto la nanoformulación como los parámetros críticos del proceso [72].

Estas nanopartículas dirigidas cargadas de docetaxel constan de un núcleo copolimérico biodegradable (PLA o PLGA y PEG), un dipéptido pseudomimético como ligando de unión a PSMA y docetaxel como anticanceroso. Dado que la producción de nanoformulaciones a gran escala es un desafío enorme que ha impedido avanzar a muchos prototipos, debemos subrayar algunos de los principales factores que pueden dificultar la traducción clínica de estas plataformas nanoterapéuticas. Entre ellos se incluyen el uso de materiales poliméricos aprobados por la FDA, que ya han sido validados para la preparación de productos farmacéuticos y aplicaciones biomédicas. Además, se ha logrado un gran objetivo al desarrollar un proceso robusto, escalable, eficiente y continuo para la formación de nanopartículas mediante un modelo adecuado (encapsulación de un compuesto hidrofóbico anticanceroso) para obtener drogas de alta carga y eficiencia de encapsulación [72]. Por tanto, la comprensión de los aspectos fundamentales termodinámicos y cinéticos para optimizar la producción de las nanopartículas de forma reproducible y escalable constituye un aspecto clave para la fabricación de nanopartículas en las cantidades necesarias para su uso clínico.

PERFIL FARMACOBIOLOGICO

En general, BIND-014 ha demostrado ser hasta 10 veces más eficaz en la liberación de docetaxel en tumores con respecto a una dosis equivalente de droga libre en varios modelos animales, sin aumento de la toxicidad. En lo que a biodistribución se refiere, la administración intravenosa de nanopartículas en experimentos *in vivo* en ratas mostró una vida media en la circulación sanguínea de aproximadamente 20 horas, con mayores concentraciones plasmáticas de docetaxel en relación a las del fármaco libre, pues la encapsulación impidió la rápida distribución del docetaxel desde el compartimento plasmático a los tejidos (menor acumulación de nanopartículas en el hígado y la médula ósea con respecto al plasma). Los resultados de la liberación *in vitro* y la farmacocinética *in vivo* demostraron también que la gran cantidad de docetaxel liberada de estos prototipos nanopoliméricos produjo un largo tiempo en circulación sanguínea, con liberación sostenida de la droga, conduciendo así a un

aumento de hasta 1000 veces en la tasa de docetaxel en el plasma disponible para llegar al locus tumoral con respecto a la formulación convencional (Taxotere) [72].

Además, se han llevado a cabo estudios de tolerabilidad en ratas para la caracterización toxicológica de dosis únicas de nanopartículas libres (sin droga), nanopartículas dirigidas, y nanopartículas no dirigidas. Los resultados confirmaron la buena tolerancia a los ingredientes utilizados la nanoformulación, sin observarse la hipersensibilidad o las reacciones anafilácticas/anafilactoides vistas tras la infusión de dosis más altas.

Los resultados preclínicos obtenidos hasta ahora sugieren que las nanoterapias así desarrolladas pueden ser beneficiosas para el tratamiento de tumores sólidos por mejorar el índice terapéutico de docetaxel a través de la focalización y la liberación controlada de la droga en el microambiente tumoral. Además, puesto que el objetivo molecular (PSMA) se expresa en las células tumorales de la próstata y en la neovascularización de otros tumores sólidos, estos nanosistemas tienen el potencial de aumentar la utilidad de docetaxel en el tratamiento de una amplia variedad de cánceres.

PERFIL DE SEGURIDAD, TOLERANCIA Y EFICACIA DE BIND-014. CÁNCERES DIANA

De acuerdo con los datos clínicos que hemos revisado hasta ahora, el comportamiento de BIND-014 en estudios preclínicos sugiere que el docetaxel es más eficaz cuando se formula como BIND-014 que como Taxotere (su formulación clásica). Sobre la base de estos prometedores resultados, se ha evaluado su dosis límite tóxica y su dosis máxima tolerada [72]. En este estudio, BIND-014 se infundió por vía intravenosa en pacientes con cáncer avanzado o metastásico, mediante dos programas de dosis: una cada 3 semanas (Q3W) y una vez por semana durante 3 semanas, seguido por una semana sin tratamiento a lo largo de un ciclo de 4 semanas (Q1W). Hasta la fecha, BIND-014 ha sido clínicamente probado en más de 45 pacientes con cáncer avanzado o metastásico refractarios a tratamientos previos.

Sobre la base de los datos obtenidos, se evaluó la eficacia de BIND-014 en varios tipos de tumores sólidos. Vale la pena señalar que la farmacocinética de docetaxel cuando se liberó de BIND-014 fue muy similar a la observada en humanos en estudios preclínicos, y significativamente diferente a la de Taxotere. En la parte del estudio Q3W, BIND-014 fue bien tolerado, con toxicidades predecibles y manejables y sin observarse toxicidad inesperada, con una neutropenia transitoria y manejable como toxicidad limitante de dosis. Otros eventos adversos incluyeron neuropatía leve, fatiga, diarrea, mucositis, retención de líquido, anemia, sarpullido, pérdida del cabello, reacciones relacionadas con la infusión, cambios en las uñas, náuseas y vómitos, todos ellos comúnmente asociados con docetaxel, así como con muchos otros medicamentos anticancerígenos [78]. La dosis máxima tolerada se estableció en 60 mg/m² como infusión de 60 minutos bajo el régimen Q3W de tratamiento [72]. Con esta dosis, BIND-014 demostró eficacia antitumoral en 9 de los 28 pacientes tratados, yendo desde una respuesta completa (cáncer cervical), tres respuestas parciales (cáncer de pulmón no microcítico metastásico, cáncer de próstata resistente a la castración y cáncer ampular) y cinco pacientes con estabilización de la enfermedad superior a 12 semanas (páncreática, colorrectal, de vesícula biliar, amigdalas y anal). Estos resultados confirmarían la desaparición del cáncer como respuesta completa al tratamiento y disminución del tamaño o grado de

extensión tumoral como respuesta parcial.

En resumen, los resultados de estos ensayos indican que BIND-014 tiene un perfil farmacológico diferente al docetaxel libre, incluyendo propiedades farmacocinéticas consistentes en una semivida en circulación más prolongada y una retención de docetaxel en los compartimentos vasculares, con múltiples casos de reducción tumoral a dosis hasta cinco veces inferiores a la del docetaxel clásicamente administrado. Estos resultados demuestran que la combinación de nanopartículas de largo tiempo de circulación, nanopartículas dirigidas y la liberación controlada de docetaxel, aumentan considerablemente la cantidad de docetaxel entregado al tumor, logrando la inhibición del crecimiento tumoral durante períodos de tiempo prolongados. Aunque la parte Q1W del estudio está en curso, la fase II de desarrollo de BIND-014 como tratamiento de segunda línea para pacientes con cáncer pulmonar no microcítico [79] y con metástasis de cáncer de próstata resistente a la castración se inició en 2013 con la pauta de dosificación Q3W. Por supuesto, su aplicación en el tratamiento de muchos otros tumores sólidos está siendo a día de hoy objeto de mucho trabajo de investigación.

6 CONCLUSIONES

Por la enorme magnitud y complejidad de los aspectos tratados a lo largo de este artículo de revisión, las líneas de investigación a las que hemos podido referirnos representan solamente una pequeña proporción de las muchas actualmente ocupadas en el desarrollo de nuevos horizontes para la nanotecnología, la cual está demostrando un amplio impacto en muchos sectores, entre los que destacamos la medicina y, dentro de ésta, la liberación de fármacos. En este sentido, hemos hallado en el uso de nanopartículas poliméricas una plataforma sólida y versátil para optimizar la eficacia terapéutica de los fármacos convencionales.

A través de la creación y el desarrollo de materiales biocompatibles y biodegradables, se están obteniendo nanofármacos de características optimizadas según su vía de administración y su diana terapéutica. Gracias a estrategias como la manipulación del tamaño o carga superficial, la adición de ligandos de superficie, el recubrimiento con moléculas hidrofílicas, etc., se ha logrado alargar significativamente el tiempo en circulación de estas prometedoras “balas mágicas”, mejorando de esta forma la especificidad y eficacia terapéutica al tiempo que se minimizan los indeseables efectos secundarios tan limitantes de los regímenes de tratamiento tradicionales.

Pese a los muchos métodos probadamente aptos y validados para direccionar nanopartículas con una amplia gama de ligandos de focalización, aún debe ahondarse en varios aspectos relevantes relativos a las características fisicoquímicas de las nanopartículas y a la mejor comprensión de su comportamiento *in vivo*. Sólo de esta forma seremos capaces de superar la barrera entre los estudios preclínicos y el desarrollo clínico, como ha ocurrido con BIND-014, un nanovehículo polimérico de entrega de fármacos cargado con el agente quimioterápico docetaxel, ya aprobado para su uso en el tratamiento de varios tumores sólidos entre los que se incluyen mama, pulmón y próstata.

La idea fundamental que puede extraerse a lo largo de esta revisión no es otra que la prometedora capacidad de la nanomedicina para ofrecer respuestas a algunos de los retos clínicos más acuciantes en la actualidad. Lamentablemente, muchos de los resultados obtenidos se encuentran aún lejos del mercado real y, por ende, de la práctica sanitaria habitual. Para llegar a su traslación clínica definitiva se debería poner énfasis en la necesidad de difusión los resultados hasta ahora obtenidos, promocionando socialmente la nanotecnología y así evitando retrasos y trabas en su implantación.

7 REFERENCIAS

- [1]. Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanomedicine. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2434–2443.
- [2]. Doane TL, Burda C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chem Soc*
- [3]. PetrosRA, DeSimoneJM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov*.
- [4]. Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J Control Release*. 2012;161(2):175–187.
- [5]. Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Calafiore R, Chang TMS, De Vos P, et al. Cell encapsulation: Promise and progress. *Nat Med* 2003;9(1):104–107.
- [6]. Orive G, De Castro M, Kong H-, Hernández RM, Ponce S, Mooney DJ, et al. Bioactive cell-hydrogel microcapsules for cell-based drug delivery. *J Control Release* 2009;135(3):203–210.
- [7]. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2007;2(12):751–760.
- [8]. RiehemannK, SchneiderSW, LugerTA, GodinB, FerrariM, FuchsH. Nanomedicine – challenge and perspectives. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48(5):872–897.
- [9]. Sperling RA, Rivera-Gil P, Zhang F, Zanella M, Parak WJ. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2008;37(9): 1896–1908.
- [10]. Lal S, Clare SE, Halas NJ. Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: impending clinical impact. *Acc Chem Res*. 2008;41(12): 1842–1851.
- [11]. Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010;49(19):3280–3294.
- [12]. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54:631–651.
- [13]. Vicent MJ, Ringsdorf H, Duncan R. Polymer therapeutics: Clinical applications and challenges for development. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(13):1117–1120.
- [14]. Giljohann DA, Mirkin CA. Drivers of biodiagnostic development. *Nature* 2009;462(7272):461–464.
- [15]. Gaspar R, Duncan R. Polymeric carriers: Preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(13):1220–1231.
- [16]. Greco F, Vicent MJ. Combination therapy: Opportunities and challenges for polymer-drug conjugates as anticancer nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(13):1203–1213.
- [17]. Jain, K.K. Recent advances in nano-oncology. *Technol Cancer Res Treat*. 2008;7(1):1–13.
- [18]. Alexis F, Pridgen EM, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle technologies for cancer therapy. *Handb Exp Pharmacol*, 2010(197):55–86.
- [19]. Tiwari M. Nano cancer therapy strategies. *J Cancer Res Ther*, 2012;8(1)19–22.
- [20]. Greco F, Vicent MJ, Gee S, Jones AT, Gee J, Nicholson RI, et al. Investigating the mechanism of enhanced cytotoxicity of HPMA copolymer-Dox-AGM in breast cancer cells. *J Control Release* 2007;117(1):28–39.
- [21]. Greco F, Vicent MJ. Polymer-drug conjugates: Current status and future trends. *Front Biosci* 2008;13(7):2744–2756.
- [22]. Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature*. 1998;392(Suppl 6679): 5–10.
- [23]. Cong H, Revzin A, Pan T. Non-adhesive PEG hydrogel nanostructures for self-assembly of highly ordered colloids. *Nanotechnology* 2009;20(7).
- [24]. Moros M, Hernández B, Garet E, Dias JT, Sáez B, Grazú V, González-Fernández A, Alonso C, de la Fuente JM. Monosaccharides versus PEG-functionalized NPs: influence in the cellular uptake. *ACS Nano*. 2012 Feb 28;6(2):1565–77
- [25]. Li Y, Pei Y, Zhang X, Gu Z, Zhou Z, Yuan W, et al. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J Controlled Release* 2001 4/2;71(2):203–211.
- [26]. Wang AZ, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. *Annu Rev Med*
- [27]. Linazasoro G. Potential applications of nanotechnologies to Parkinson's disease therapy. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14(5):383–392.
- [28]. Linazasoro G. Cell therapy for Parkinson's disease: Only young onset patients allowed? Reflections about the results of recent clinical trials with cell therapy and the progression of Parkinson's disease. *Cell Transplant* 2006;15(6):463–473.
- [29]. Yamanaka YJ, Leong KW. Engineering strategies to enhance nanoparticle-mediated oral delivery. *J Biomater Sci Polymer Ed*. 2008;19(12)1549–70.
- [30]. Juliano RL. The future of nanomedicine: Promises and limitations. *Sci Public Policy* 2012;39(1):99–104.
- [31]. Silva GA. Neuroscience nanotechnology: Progress, opportunities and challenges. *Nat Rev Neurosci* 2006;7(1):65–74.
- [32]. Spuch C, Antequera D, Portero A, Orive G, Hernández RM, Molina JA. The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biomaterials* 2010;31(21):5608–18.
- [33]. Eaton MAW. How do we develop nanopharmaceuticals under open innovation? *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2011;7(4):371–375.

- [34]. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
- [35]. Shi J, Xiao Z, Kamaly N, Farokhzad OC. Self-assembled targeted nanoparticles: evolution of technologies and bench to bedside translation. *Acc Chem Res*. 2011;44(10):1123–1134.
- [36]. Vicent MJ, Greco F, Nicholson RI, Paul A, Griffiths PC, Duncan R. Polymer therapeutics designed for a combination therapy of hormone-dependent cancer. *Angew Chem Int Ed* 2005;44(26):4061–4066.
- [37]. Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(5):419–436.
- [38]. US Food and Drug Administration. *Drugs*. Accessed November 5, 2013.
- [39]. Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int J Pharm*. 2009;379(2):201–209.
- [40]. Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, et al. 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):7794–7803.
- [41]. Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)*. 2011;3(3):1377–1397.
- [42]. Elsbahy M, Wooley KL. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2545–2561.
- [43]. Nicolas J, Mura S, Brambilla D, Mackiewicz N, Couvreur P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem Soc Rev*. 2013;42(3):1147–1235.
- [44]. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*. 1986; 46(12 Pt 1):6387–6392.
- [45]. 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(1–2):271–284.
- [46]. Danquah MK, Zhang XA, Mahato RI. Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(8):623–639.
- [47]. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008;5(4):505–515.
- [48]. Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. A multifunctional envelope type nanodevice (MEND) for gene delivery to tumors based on the EPR effect: a strategy for overcoming the PEG dilemma. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(3):152–160.
- [49]. Valle JW, Armstrong A, Newman C, et al. A phase 2 study of SP1049C, doxorubicin in P-glycoprotein-targeting pluronics, in patients with advanced adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Invest New Drugs*. 2011;29(5):1029–1037.
- [50]. Young C, Schluep T, Hwang J, Eliasof S. CRLX101 (formerly IT-101)-a novel nanopharmaceutical of camptothecin in clinical development. *Curr Bioact Compd*. 2011;7(1):8–14.
- [51]. Clinical Trials.gov. Study of paclitaxel in patients with ovarian cancer. Accessed November 5, 2013.
- [52]. Tardi P, Johnstone S, Harasym N, et al. *In vivo* maintenance of synergistic cytarabine:daunorubicin ratios greatly enhances therapeutic efficacy. *Leuk Res*. 2009;33(1):129–139.
- [53]. Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(15):1615–1626.
- [54]. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(10):750–763.
- [55]. Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2718–2739.
- [56]. Mitra A, Mulholland J, Nan A, McNeill E, Ghandehari H, Line BR. Targeting tumor angiogenic vasculature using polymer-RGD conjugates. *J Control Release*. 2005;102(1):191–201.
- [57]. Tagami T, Ernsting MJ, Li SD. Efficient tumor regression by a single and low dose treatment with a novel and enhanced formulation of thermosensitive liposomal doxorubicin. *J Control Release*. 2011;152(2):303–309.
- [58]. Deckers R, Moonen CT. Ultrasound triggered, image guided, local drug delivery. *J Control Release*. 2010;148(1):25–33.
- [59]. Gu F, Langer R, Farokhzad OC. Formulation/preparation of functionalized nanoparticles for *in vivo* targeted drug delivery. *Methods Mol Biol*. 2009;544:589–598.
- [60]. Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, et al. Targeted nanoparticle- aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(16):6315–6320.
- [61]. Yu B, Tai HC, Xue W, Lee LJ, Lee RJ. Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Mol Membr Biol*. 2010;27(7): 286–298.
- [62]. Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol*. 2009;157(2):220–233.
- [63]. Weiner LM, Adams GP. New approaches to antibody therapy. *Oncogene*. 2000;19(53):6144–6151.
- [64]. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990;249(4968):505–510.
- [65]. Xiao Z, Farokhzad OC. Aptamer-functionalized nanoparticles for medical applications: challenges and opportunities. *ACS Nano*. 2012;6(5):3670–3676.

- [66]. Schulke N, Varlamova OA, Donovan GP, et al. The homodimer of prostate-specific membrane antigen is a functional target for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(22):12590–12595.
- [67]. 103. Chou LY, Ming K, Chan WC. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2011;40(1):233–245.
- [68]. Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, et al. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science*. 2010;328(5981):1031–1035.
- [69]. Talekar M, Kendall J, Denny W, Garg S. Targeting of nanoparticles in cancer: drug delivery and diagnostics. *Anticancer Drugs*. 2011;22(10):949–962.
- [70]. Liang C, Yang Y, Ling Y, Huang Y, Li T, Li X. Improved therapeutic effect of folate-decorated PLGA-PEG nanoparticles for endometrial carcinoma. *Bioorg Med Chem*. 2011;19(13):4057–4066.
- [71]. Zhou J, Neale JH, Pomper MG, Kozikowski AP. NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(12):1015–1026.
- [72]. Hrkach J, Von Hoff D, Mukkaram Ali M, et al. Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. *Sci Transl Med*. 2012;4(128):128ra139.
- [73]. Hashida M, Nishikawa M, Yamashita F, Takakura Y. Cell-specific delivery of genes with glycosylated carriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;52(3):187–196.
- [74]. Sankhala KK, Mita AC, Adinin R, et al. A phase I pharmacokinetic (PK) study of MBP-426, a novel liposome encapsulated oxaliplatin. *J Clin Oncol*. 2009;27:S2535.
- [75]. Davis ME. The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. *Mol Pharm*. 2009;6(3):659–668.
- [76]. Mamot C, Ritschard R, Vogel B, et al. A phase I study of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):S3029.
- [77]. Zhang L, Zhang N. How nanotechnology can enhance docetaxel therapy. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:2927–2941.
- [78]. Baker J, Ajani J, Scotte F, et al. Docetaxel-related side effects and their management. *Eur J Oncol Nurs*. 2009;13(1):49–59.
- [79]. ClinicalTrials.gov. A Phase 2 study to determine the safety and efficacy of BIND-014 (docetaxel nanoparticles injectable suspension) as second line therapy to patients with non-small cell lung cancer.