

NUEVOS NANO-SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE DROGAS MUCOADHESIVOS PARA LA LIBERACIÓN SOSTENIDA DE INHIBIDORES DE PROTEASA EN EL TRATAMIENTO DE HIV

Imperiale J.C.¹, Chiappetta D.A.^{1,2}, Sosnik A.^{1,2}

¹The Group of Biomaterials and Nanotechnology for Improved Medicines (BIONIMED), Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Junín 956, C.P. (1113), University of Buenos Aires (UBA).

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

E-mail: alesosnik@gmail.com

RESUMEN

La terapia combinada que se utiliza actualmente para tratar la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) posee varias limitaciones como la alta frecuencia de administración, lo que disminuye la adherencia a los regímenes terapéuticos. Este factor es crítico para alcanzar éxito terapéutico. El objetivo de este trabajo es diseñar sistemas de liberación mucoadhesivos innovadores de fármacos antirretrovirales que permitan disminuir la frecuencia de administración y mejorar así la aceptación por parte del paciente. En este contexto, se han diseñado y desarrollado sistemas denominados NiMOS (Nanoparticle in Microparticle Oral Delivery System) que comprenden nanopartículas de un ARV modelo puro, indinavir (IND), encapsulado en micropartículas de alginato. Las técnicas elegidas para la preparación de las nanopartículas y micropartículas fueron la nanoprecipitación y gelificación ionotrópica, respectivamente. En el presente trabajo se discutirán diferentes variables para la optimización de dicho sistema.

Palabras claves: indinavir, nanoprecipitación, alginato, gelificación ionotrópica, NiMOS.

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que aproximadamente 40 millones de personas alrededor del mundo están infectadas con VIH, dentro de los cuales 26 millones viven en la región sub-sahariana del África [1]. La farmacoterapia actual que se utiliza para tratar el HIV se denomina Terapia Antirretroviral de Alta Actividad (HAART) y consiste en la administración en forma crónica de al menos tres drogas antirretrovirales; dos inhibidores nucleosídicos de la retrotranscriptasa (NRTIs), más un inhibidor no nucleosídico de la retrotranscriptasa (NNRTIs) o un inhibidor de la proteasa (PIs); la biodisponibilidad de los PIs es aumentada gracias a la co-administración de ritonavir, otro PI, en bajas dosis. El principal desafío de la farmacoterapia es lograr adherencia de por lo menos el 95% [2]. Es por eso que el diseño de sistemas de liberación de drogas (DDS) que permitirían reducir la frecuencia de administración pueden llevar a una mejora en las perspectivas del tratamiento.

Los PIs son fármacos de primera línea en HAART. Estos fármacos poseen alto peso molecular y una baja biodisponibilidad. IND es uno de los inhibidores de proteasa más selectivos, específicos y potentes dentro de los de su familia. Si bien, este fármaco ha caído en desuso porque provoca efectos adversos severos en riñón y además el virus ha desarrollado resistencia, constituye un excelente fármaco modelo para el diseño y desarrollo de nuevos sistemas de liberación; IND base es muy poco soluble en agua y presenta baja biodisponibilidad oral y alta variabilidad inter-individual.

El alginato es un polímero natural biocompatible con propiedades mucoadhesivas. Esta característica lo posiciona como potencial vehículo para la liberación de fármacos por la vía oral [3].

El presente trabajo describirá los progresos llevados a cabo en el diseño y producción de NiMOS mucoadhesivos a base de alginato para la administración y liberación sostenida de IND y otros PIs por la vía oral.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Indinavir sulfato, cloruro de calcio dihidrato, protanal LF120M, acetona PA ACS, etanol absoluto PA ACS.

2.2. Métodos

2.2.1 Obtención de indinavir base libre a partir de indinavir sulfato

Para la extracción del indinavir base se suspendió el contenido de 24 cápsulas de Crixivan® (indinavir sulfato, lactosa, estearato de magnesio) en 100 ml de agua destilada. El estearato de magnesio insoluble fue removido por filtración. Luego, la solución se ajustó a pH 6 con hidróxido de sodio 1M para lograr la precipitación del indinavir base libre, el cual fue aislado por filtración al vacío. Se lavaron los cristales con abundante agua destilada para remover la lactosa residual. Por último se recrystalizó el indinavir base libre utilizando una mezcla etanol-agua[4].

2.2.2. Preparación de nanopartículas de indinavir base libre

Las nanopartículas fueron preparadas por el método de nanoprecipitación. Diferentes cantidades de indinavir base libre fueron disueltas en 10 ml de acetona. La solución se inyectó sobre agua destilada bajo agitación mecánica a 2000 RPM. La agitación continuó a la misma velocidad a temperatura ambiente hasta total evaporación del solvente orgánico. La suspensión resultante se filtró al vacío para aislar las nanopartículas; las partículas de tamaño macroscópico quedaron retenidas en el papel de filtro. Luego, la suspensión de nanopartículas se liofilizó. *Para determinar la eficiencia del proceso*, se disolvió el lote liofilizado en metanol. Luego una dilución apropiada se analizó por espectrofotometría ($\lambda = 661 \text{ nm}$) para establecer la cantidad de IND.

2.2.3. Caracterización de las nanopartículas de droga

Se determinó el tamaño, la distribución de tamaños y el potencial zeta de las nanopartículas por difracción de luz láser (dynamic Light scattering, Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments) provisto de un láser He-Ne (633 nm) y un correlator digital, modelo ZEN3600. Todas las mediciones fueron realizadas a 25° con un ángulo de dispersión de 173°.

2.2.4. Preparación de micropartículas de alginato

Las micropartículas fueron preparadas por el método de gelificación ionotrópica [5]. Se prepararon soluciones de alginato de sodio de diferentes concentraciones disolviendo el polímero en agua destilada previamente filtrada por filtros de 0.45 μm . La solución así obtenida fue sonicada por 15 minutos para eliminar las burbujas que se hayan creado durante la agitación. Dicha solución fue inyectada sobre 60 ml de CaCl_2 0,5M. El tiempo de endurecimiento fue de 2 h. Las partículas fueron secadas a temperatura ambiente.

2.2.5. Preparación de NiMOS (Nanoparticle in Microparticle Oral Delivery System)

Se preparó una solución de alginato 1.8 % p/v como se detalló en el ítem 2.2.4 y se agregaron las nanopartículas hasta obtener una concentración final de 0.15% p/v de fármaco. Dicha suspensión fue inyectada sobre una solución de cloruro de calcio 0,5M. El tiempo de endurecimiento fue de 2 hs. Las partículas fueron secadas a temperatura ambiente.

2.2.6. Caracterización de las micropartículas de alginato y NiMOS

Se determinó el tamaño y la morfología de las micropartículas de alginato y de NiMOS utilizando un microscopio óptico.

El grado de hinchamiento (Q_t) se estimó mediante gravimetría. Micropartículas secas se sumergieron en agua destilada y solución de HCl 0,1N (símil gástrico) se almacenaron a 37°C. A diferentes tiempos, las micropartículas se escurrieron, se secaron cuidadosamente con papel tissue y se pesaron [6]. El Q_t se calculo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Q_t = (W_t - W_o) / W_o \times 100$$

Donde W_o es el peso de la muestra seca y W_t es Peso de la muestra a tiempo t.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Producción y caracterización de las nanopartículas de IND

Las nanopartículas de IND fueron obtenidas por el método de nanoprecipitación. Como se muestra en la Figura 1 el tamaño promedio obtenido fue de 330 nm.

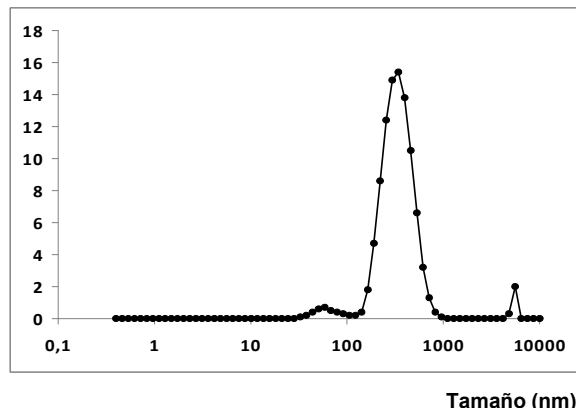


Figura 1: Análisis del tamaño de nanopartícula obtenido por DLS.

Todas las muestras presentaron un potencial zeta negativo de entre -13 y -20 mV, lo cual refleja la carga negativa de la droga. La eficiencia del proceso de nanoprecipitación dependió de la proporción fase orgánica:fase acuosa (FO:FA), como se muestra en la Figura 2. La eficiencia óptima de aproximadamente 60 % se obtuvo cuando FO:FA fue de 1:40.

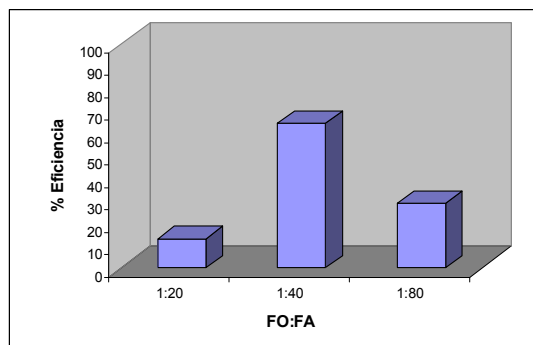


Figura 2: Porcentaje de recuperación de nanopartículas utilizando FO:FA variables.

3.2. Producción y caracterización de las micropartículas de alginato puro

Las micropartículas de alginato fueron producidas por gelificación ionotrópica. El tamaño de las partículas húmedas fue de entre 2 a 3 mm. Este parámetro se ve afectado por el diámetro de la

aguja utilizado, resultando partículas más pequeñas cuanto menor es el diámetro de la aguja (información no mostrada). Con respecto a su morfología, las micropartículas resultaron ser esféricas con superficie lisa cuando se trabajó con concentraciones mayores de alginato como se muestra en la Figura 3. Una vez secas, dicho tamaño disminuyó notablemente a 800-1000 μm .

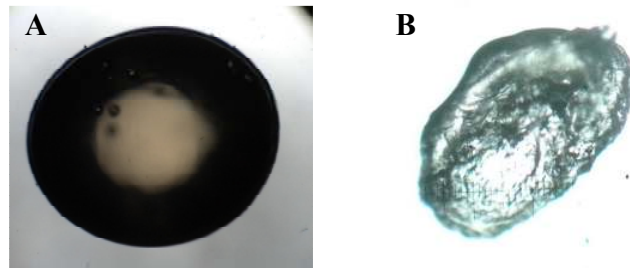


Figura 3: Imágenes de microscopía óptica de micropartículas de alginato. (A) 3,0% (B) 1,8%.

El ensayo de hinchamiento en agua destilada y HCl 0,1 N indicó valores de Q_t de 10 y 30%, respectivamente. El máximo Q_t se obtuvo luego de 20 min. El mayor Q_t en medio ácido se debería a la ruptura parcial de uniones de complejación de iones calcio y la formación de una red más laxa. Las micropartículas no se desintegraron durante el tiempo del ensayo (2 h), tiempo aproximado de residencia en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, debido a que los NiMOS han sido diseñados para liberación prolongada, las propiedades de las micropartículas deberán ser evaluadas a tiempos mayores. Sin embargo, parecerían altamente estables en las condiciones extremas de pH estomacal.

3.3. Preparación y caracterización de los sistemas NiMOS

Los sistemas NiMOS fueron producidos por gelificación ionotrópica de una suspensión de IND base nanonizado en soluciones de alginato de diferentes concentraciones. El tamaño y la morfología de dichos sistemas fueron similares a los de las micropartículas sin fármaco. La eficiencia del proceso de microencapsulación fue del 20-50%.

4. CONCLUSIONES

Se obtuvieron NiMOS de tamaño promedio entre 800-1000 μm , cargados con nanopartículas de IND que permitirían la liberación sostenida de fármaco en el tracto gastrointestinal. El trabajo actualmente está dedicado a optimizar las condiciones para aumentar el % de carga de IND dentro de las micropartículas y a la evaluación de las propiedades mucoadhesivas de las mismas en un modelo *ex vivo*.

5. AGRADECIMIENTOS

JCI agradece la beca doctoral de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

6. REFERENCIAS

- [1] www.unaids.org
- [2] Alejandro Sosnik, Diego A. Chiappetta, Ángel M. Carcaboso. *Journal of Controlled release* 2009; 138 (1) 2-15
- [3] Wayne R. Gombotz, Siow Fong Wee. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; 31 267-285
- [4] Maria M. Toteva, Roger Zanon, Drazen Ostovic. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008; 97 (9) 3810-3819.
- [5] Beatrice Albertini, Beatrice Vitali, Nadia Passerini, Federica Cruciani, Marcello Di Sabatino, Lorenzo Rodriguez, Patrizia Brigidi. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; 40 359-366.
- [6] Jose-Fernando Rosa dos Santos, Juan-Jose Torres-Labandeira, Nele Matthijs, Tom Coenye, Angel Concheiro, Carmen Alvarez-Lorenzo. *Acta Biomaterialia* 2010; 6(10):3919-3926.