

# TOLERANCIA INTRAOCULAR DE MICROPARTÍCULAS DE POLI(Valina-Prolina-Alanina-Valina-Glicina)

A.C. Rincón Alarcón<sup>1</sup>, R. Herrero – Vanrell<sup>1</sup>, B. de las Heras<sup>2</sup>, M. Alonso<sup>3</sup>,  
C. Bailez<sup>4</sup>, J.C. Rodríguez- Cabello<sup>5</sup>, I.T. Molina Martínez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense (UCM), 28040, Madrid, España. <sup>2</sup>Dpto. Farmacología. Universidad Complutense (UCM). 28040, Madrid, España. <sup>3</sup>Dpto. Química Analítica, E.U.P., Universidad de Valladolid. 47014Valladolid, España. <sup>4</sup> Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA). Universidad de Valladolid. 47014 Valladolid, España. <sup>5</sup> Dpto. Física de la Materia Condensada, E.T.S.I.I., Universidad de Valladolid. 47014 Valladolid, España.

## Introducción y Objetivos

La estructura primaria de la elastina natural contiene numerosas repeticiones de pequeñas secuencias peptídicas; entre las secuencias que se repiten destaca la VPGVG (G= Glicina, V = Valina y P= Prolina). Tomando como monómero esta secuencia, se ha sintetizado el polímero poli(VPGVG), material cabeza de grupo de los materiales bioelásticos<sup>(1)</sup>. Estos materiales son polímeros sintéticos de naturaleza polipeptídica, inicialmente diseñados y sintetizados como versiones simplificadas de la elastina natural y propuestos como vehículos potenciales para la dosificación de fármacos<sup>(2)</sup>. Estos biomateriales se caracterizan por presentar una excelente biocompatibilidad, que ha sido reflejada en los tests biológicos recomendados por la "American Society for Testing of Materials" (ASTM), ya que el sistema inmune no es capaz de diferenciarlos de la elastina natural<sup>(3)</sup>.

Además, estos biopolímeros se caracterizan por poseer las propiedades mecánicas de la elastina natural, siendo capaces de transformar distintos tipos de energía en trabajo mecánico. Dicha transformación, puede ser consecuencia de cambios del entorno (variación de pH, temperatura, etc.). Esta propiedad tiene su origen en la transición de fase que los polímeros derivados de la elastina pueden experimentar en medios acuosos y que se denomina *temperatura de transición inversa* ( $T_i$ ). Estos polipéptidos, a temperaturas por debajo de la temperatura de transición ( $T_i$ ), adoptan una disposición desordenada y relativamente extendida. Sin embargo, a

temperaturas por encima de la ( $T_i$ ) el polímero sufre una ordenación intramolecular, adoptando una estructura helicoidal ordenada. El poli (Valina-Prolina-Alanina- Valina- Glicina) [VPAVG] pertenece a esta familia de biopolímeros. La temperatura de transición inversa para este polipéptido se encuentra próxima a 30°C<sup>(4)</sup>.

Un problema especialmente difícil en el tratamiento de las enfermedades que afectan al segmento posterior del ojo es la dificultad de acceso del fármaco al vítreo. Para un tratamiento eficaz se tiene que recurrir, en numerosas ocasiones, al depósito directo del fármaco mediante la administración de inyecciones intravítreas. Sin embargo, la administración sucesiva de inyecciones no está exenta de riesgos y lleva inherentes efectos secundarios tales como desprendimiento de retina, hemorragias intravítreas, endoftalmitis y cataratas. Por las razones anteriormente mencionadas, resulta de gran interés el desarrollo de sistemas de cesión controlada de fármacos con el objeto de conseguir concentraciones eficaces, en el lugar de acción, durante un periodo de tiempo prolongado con una sola administración del preparado.

Aunque existen, hasta el momento, distintos biopolímeros utilizados para la fabricación de estos dispositivos, el desarrollo de nuevos biomateriales, que además de modular la cesión sean altamente biocompatibles y exentos de toxicidad, resultan de especial interés.

El objetivo de este proyecto ha sido evaluar la tolerancia del polímero poli(VPAVG),

como vehículo para la administración de fármacos por vía intravítrea.

## **Materiales y Métodos**

El biopolímero Poli (Valina-Prolina-Alanina-Valina-Glicina) fue sintetizado por el Dr. J.C. Rodríguez Cabello (Departamento de Física de la Materia Condensada, E.T.S.I.I. Universidad de Valladolid).

### **Preparación de las micropartículas**

La formación de partículas se llevó a cabo mediante la disolución y posterior precipitación del polímero en una solución acuosa. En primer lugar, se pesó una cantidad determinada de polímero y se añadió un volumen de 500 µl de disolvente acuoso. La dispersión obtenida se enfrió a 4°C, manteniéndose en nevera durante 1 hora. Una vez disuelto el polímero, se introdujo la muestra en un baño termostatzado con agitación a 37°C, temperatura superior a la de transición del polímero Tt (30°C), con el fin de conseguir la formación de las partículas. Posteriormente, se llevó a cabo la separación de las micropartículas obtenidas por centrifugación (18,000 xg durante 45 minutos a 33°C).

Se ensayaron diferentes concentraciones de polímero (10, 20, 30 y 60 mg/ml), utilizándose como disolventes agua destilada y solución tampón fosfato (pH 7,4) isotonzado con cloruro sódico.

### **Caracterización de micropartículas**

El examen morfológico de las micropartículas se llevó a cabo mediante microscopia electrónica de barrido (CAI de la UCM) y la evaluación del tamaño se determinó por espectroscopia de correlación fotónica.

### **Tolerancia**

#### **Ensayo de edema plantar en ratas**

Se determinó en este ensayo la tolerancia del polímero a través de la inyección

subcutánea en la aponeurosis plantar de la pata trasera izquierda de ratas, evaluando la inflamación producida en dicha región. Se utilizaron ratas Wistar macho (n=18). Se procedió a la administración de suspensiones de 1 mg y de 2,5 mg de micropartículas de poli(VPAVG) en un volumen de 0,1 ml de solución fosfato isotónico de pH 7,4, empleándose como formulación control el vehículo. El equipo utilizado para cuantificar la inflamación producida fue un pletismómetro, valorándose el volumen de la pata izquierda antes de la administración (valor basal [V<sub>0</sub>]) de la solución control y de la suspensión de micropartículas y después de la inyección de éstas, a diferentes tiempos: 1, 3, 5, 7 y 24 horas.

### **Ensayo de tolerancia intraocular**

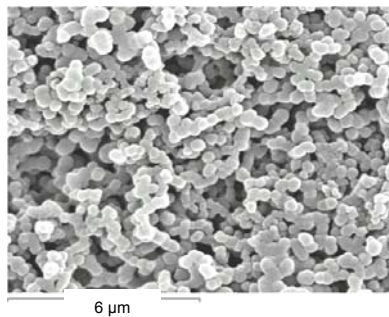
El ensayo de tolerancia intraocular, se llevo a cabo en el laboratorio del Instituto Universitario de Oftalmobiología (IOBA) de la Universidad de Valladolid. Los animales empleados fueron conejos pigmentados (n=12). Los animales fueron tratados de acuerdo con las normas de utilización de animales en experimentación (ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research). De acuerdo con dicha normativa se utilizó el ojo derecho como grupo experimental y el izquierdo como grupo control.

Previo a la inyección de las partículas, se realizó una vitrectomía-gas (SF<sub>6</sub>). Después de 48 horas, se llevó a cabo la inyección intravítrea de una suspensión de las micropartículas (0,1 ml) en el ojo derecho de cada animal y de 0,1 ml de solución fosfato isotónico en el ojo izquierdo. En todos los casos se realizó una exploración clínica previa a la vitrectomía. Posteriormente se observaron signos anteriores y posteriores, antes y después de la inyección del biopolímero y a los 7, 14, 21 y 28 días después de la inyección de las partículas. Los signos evaluados fueron los siguientes: determinación de la presión intraocular, edema conjuntival y palpebral, congestión vascular, secreciones, hemorragias y cataratas. La evaluación de los signos del segmento posterior se realizó mediante oftalmoscopia indirecta y retinografías.

## Resultados y Discusión

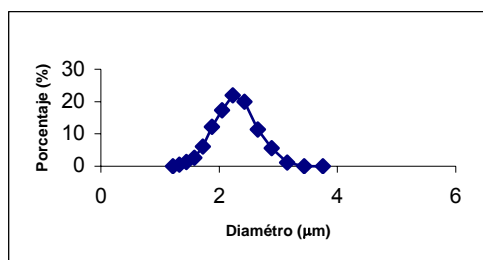
### Caracterización de las micropartículas:

Al estudiar la morfología de las partículas con el microscopio electrónico de barrido, se puede observar la presencia de agregados. Las partículas (figura 1) presentan una forma "elipsoide".



**Figura 1.** Microfotografía de micropartículas a una concentración de 30 mg/ml de poli [VPAVG]. (10000x).

Las micropartículas formadas a partir de una concentración de 10 mg/ml de polímero, resultaron tener un diámetro medio volumen de 2,13 µm (figura 2).



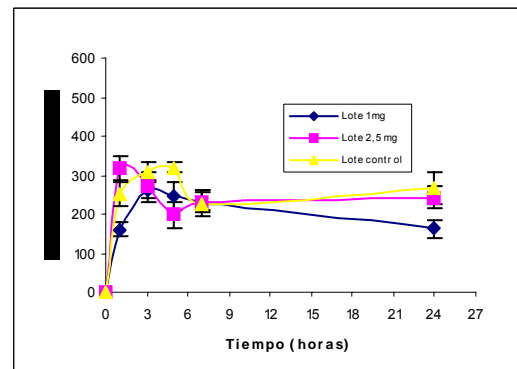
**Figura 2.** Distribución de tamaño de partículas (µm) obtenida de una suspensión de micropartículas con una concentración de 10 mg/ml de poli(VPAVG).

### Tolerancia

#### Ensayo edema plantar en ratas

El edema inducido en la pata de rata, por la inyección de las formulaciones de polímero poli(VPAVG) de concentraciones de 1mg y 2,5mg, se presenta en la figura 5. Las micropartículas administradas produjeron

respuestas inflamatorias locales similares, a la observada después de la inyección de la solución control de fosfato isotónica ( $p < 0.05$ ). En todos los casos los valores máximos de edema alcanzados fueron observados entre las 1 y 5 horas del ensayo ( $\approx 300\mu\text{l}$ ). Al final del ensayo (24h) las respuestas residuales obtenidas fueron las mismas tanto para las formulaciones experimentales como para la solución control.



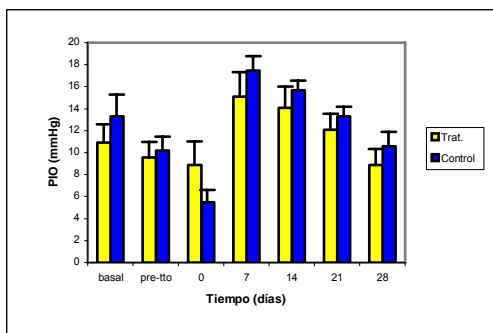
**Figura 5.** Incrementos de volumen en la pata de la rata ( $\mu\text{l}$ ) (+/- SD) inducido por la inyección de diferentes formulaciones de micropartículas de poli (VPAVG).

### Tolerancia Intraocular

#### • Signos anteriores:

Se apreció la existencia de edema conjuntival en el sitio de la inyección tanto en el grupo control como en el experimental, desapareciendo 7 días después de la administración. En ningún ojo se apreció edema palpebral, congestión vascular, secreciones y hemorragias. En los ojos de dos conejos, se presentaron cataratas después de la vitrectomía por lo que se excluyeron del estudio. Las cataratas fueron visibles a los 7 días post-tratamiento, incrementándose en ambos grupos (control y experimental) a lo largo del tiempo de ensayo. Así, al final del estudio (28 días), el 64% del grupo experimental y el 55% del grupo control, habían desarrollado cataratas, no encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambos grupos. En cuanto a la presión intraocular (PIO), (figura 3) permaneció sin cambios después de la vitrectomía. Sin embargo, a los 7 y 14

días posteriores a la inyección, estos valores de PIO fueron incrementándose, observándose un descenso a valores basales (antes de vitrectomía) a los 21 días del ensayo.

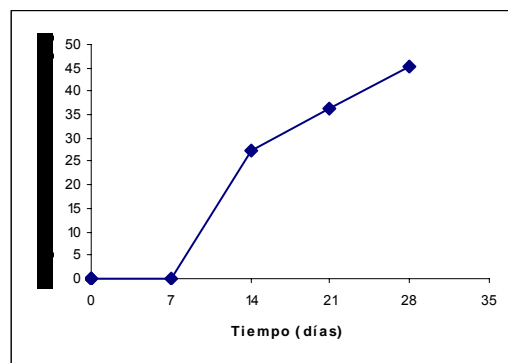


**Figura 3.** Valores medios de presión intraocular [PIO], (+SD) obtenidos a diferentes tiempos de estudio.

- Signos posteriores:

Después de la inyección de las micropartículas se apreciaron signos de turbidez en el vítreo, con un grado de opacidad vítrea de moderada a intensa, en un 75% del grupo experimental. Por el contrario, en el grupo control sólo un animal presentó una ligera opacidad vítrea. La opacidad alcanzó su grado máximo a los 7 días después de la inyección, disminuyendo al final del ensayo, hasta llegar en el grupo experimental a una opacidad de ligera a moderada y a una ausencia de opacidad en el grupo control. Después de la administración de las micropartículas se pudo detectar, mediante la observación por oftalmoscopia indirecta, la presencia de un material fibroso blanco en el vítreo, que se mantuvo visible hasta el final del ensayo. Se apreciaron también hemorragias vítreas inmediatamente después de la inyección tanto en el grupo experimental como en el control, desapareciendo durante el tiempo que duró el estudio.

Se observaron desprendimientos de retina (figura 4), en el grupo experimental, a los 14 días después de la administración de las micropartículas, incrementándose el número de animales afectados a lo largo del estudio. Al final del ensayo (28 días) el 45% del grupo experimental presentó desprendimiento de retina.



**Figura 4.** Evolución del desprendimiento de retina(%), observado después de la inyección de micropartículas de poli(VPAVG).

## Bibliografía

1. D.W. Urry. "Molecular Machines: How Motion and Other Functions of Living Organisms Can Result from Reversible Chemical Changes". Chem. Int. Ed. Engl. 32, 819, (1993).
2. D.W. Urry, C.M. Harris, C.X. Luán, C.H. Luán. Controlled Drug Delivery: The Next Generation. "Transductional Protein-Based Polymers as New Controlled-Release Vehicles". K. Park Ed. ACS Professional Ref. Book, Washington, DC, (1999).
3. D.W. Urry, T.M. Parker, M.C. Reid and D.C. Gowda. "Biocompatibility of the Bioelastic Materials, Poly(VPGVG) and its  $\gamma$ -irradiation Cross-Linked Matrix: Summary of Generic Biological Test Results". Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 6, 263, (1991).
- 4- Herrero-Vanrell R., Rincón A., Alonso M., Reboto V., Molina Martínez I.T., Rodríguez-Cabello J.C. "Self-assembled microparticles of the thermo-responsive elastin-like polymer poly(VPAVG) as potential vehicle for controlled drug release". Journal Control Release .Admitido para publicación.

## Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MAT-2000-1764-C02-01) y por el Ministerio de Sanidad y Consumo (FISS-PI030910).