

Desarrollo de liposomas con aplicación en BNCT para el tratamiento del cáncer de mama HER2+.

Mario A. Gadan

División Instrumentación y Dosimetría, Subgerencia de Instrumentación y Control,
Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)

Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ingeniería y Ciencias Exactas y Naturales
(FICEN), Universidad Favaloro (UF)

Curso Intensivo

Terapia por Captura Neutrónica en Boro

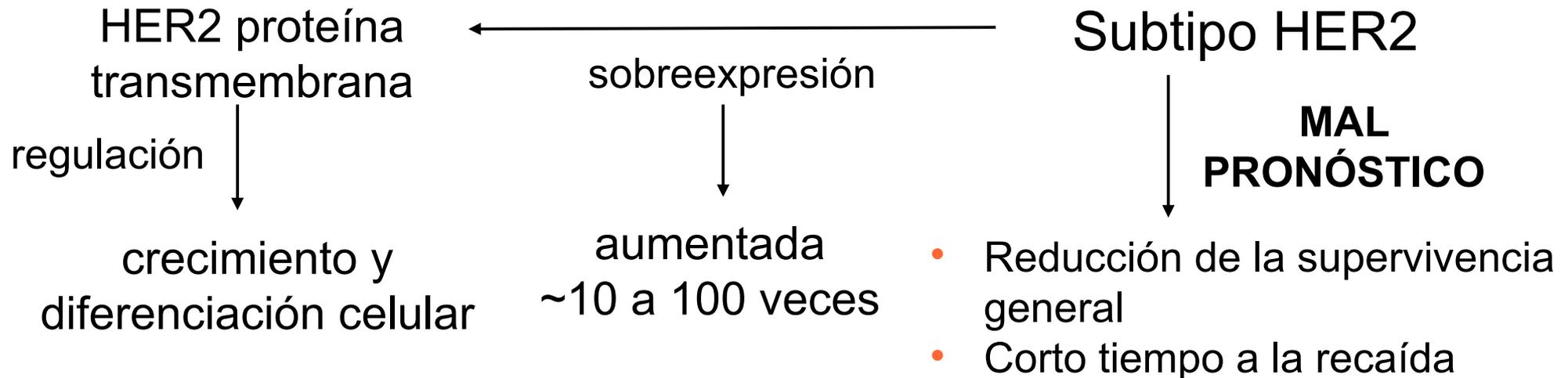
Aspectos Interdisciplinarios para la Concreción de una Radioterapia Selectiva

FICEN - UF

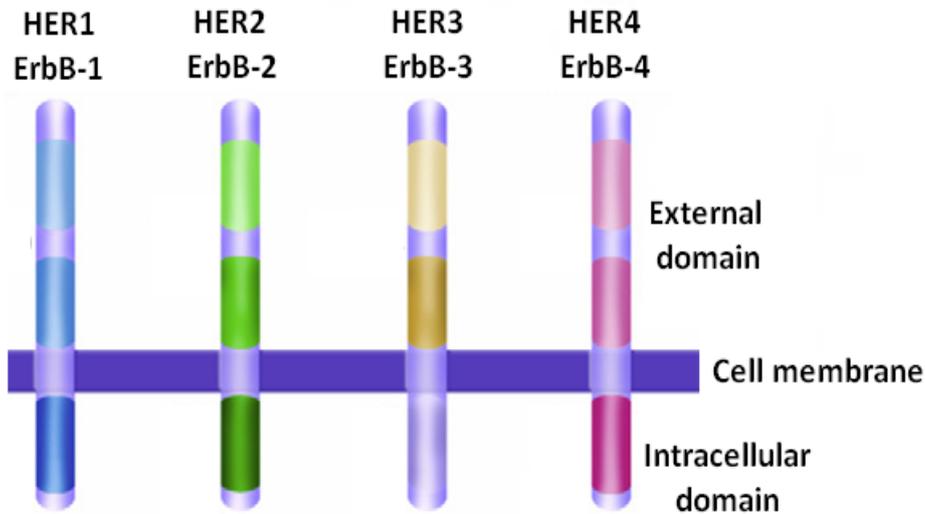
3 al 5 de mayo de 2018

contacto: mario.gadan@gmail.com; mgadan@cae.cnea.gov.ar

Introducción. Cáncer de mama HER2.



ErbB family receptors



- Tratamiento: tto. estándar + esquema de quimioterapia en combinación con un anticuerpo monoclonal dirigido a HER2 (TRASTUZUMAB).
- A pesar de las terapias actuales, existe un grupo de pacientes que no responden al tratamiento.

(adaptado de Levitzki et al Molecular Aspects of Medicine 2010)

Inmunoliposomas. Estrategia.

HER2 en cáncer de mama HER2+
incrementado ~10 a 100 veces

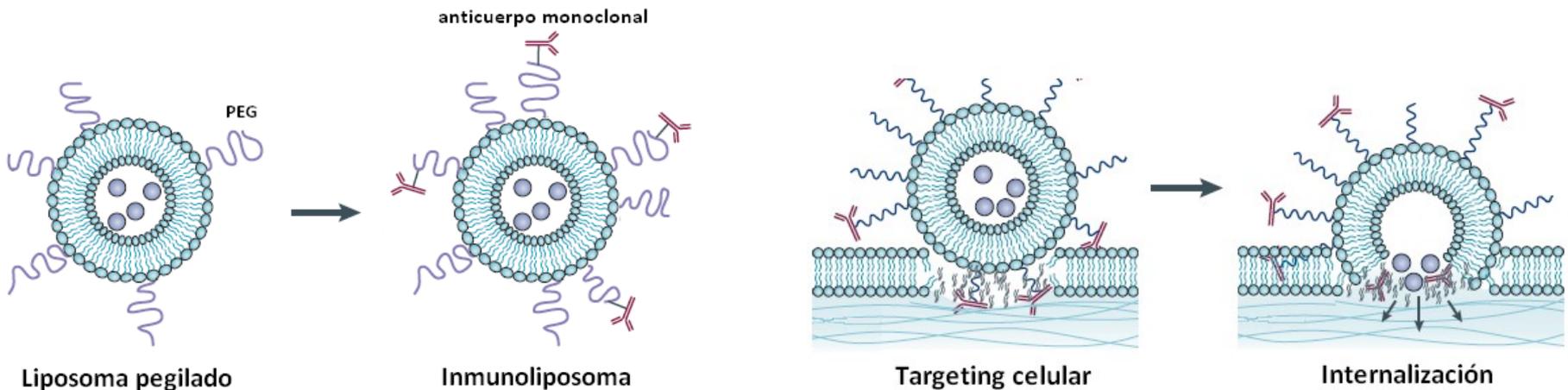
Liposomas marcados con el anticuerpo monoclonal trastuzumab



Targeting específico en células tumorales que sobreexpresen HER2

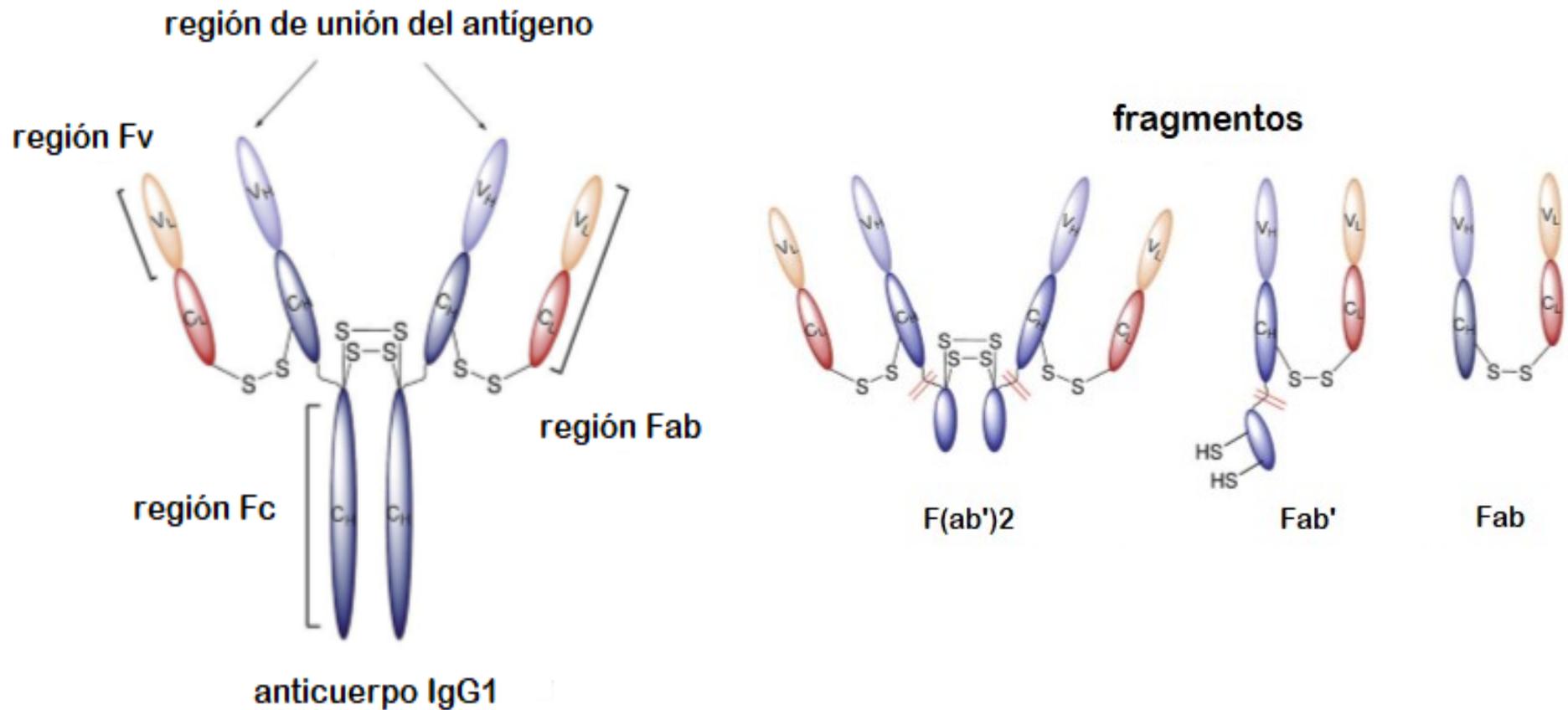


Incrementar la selectividad y niveles de concentración de boro en el microambiente tumoral



(adaptado de Torchilin, Nature Review 2005)

Estrategia de especificidad. Empleo de anticuerpos.

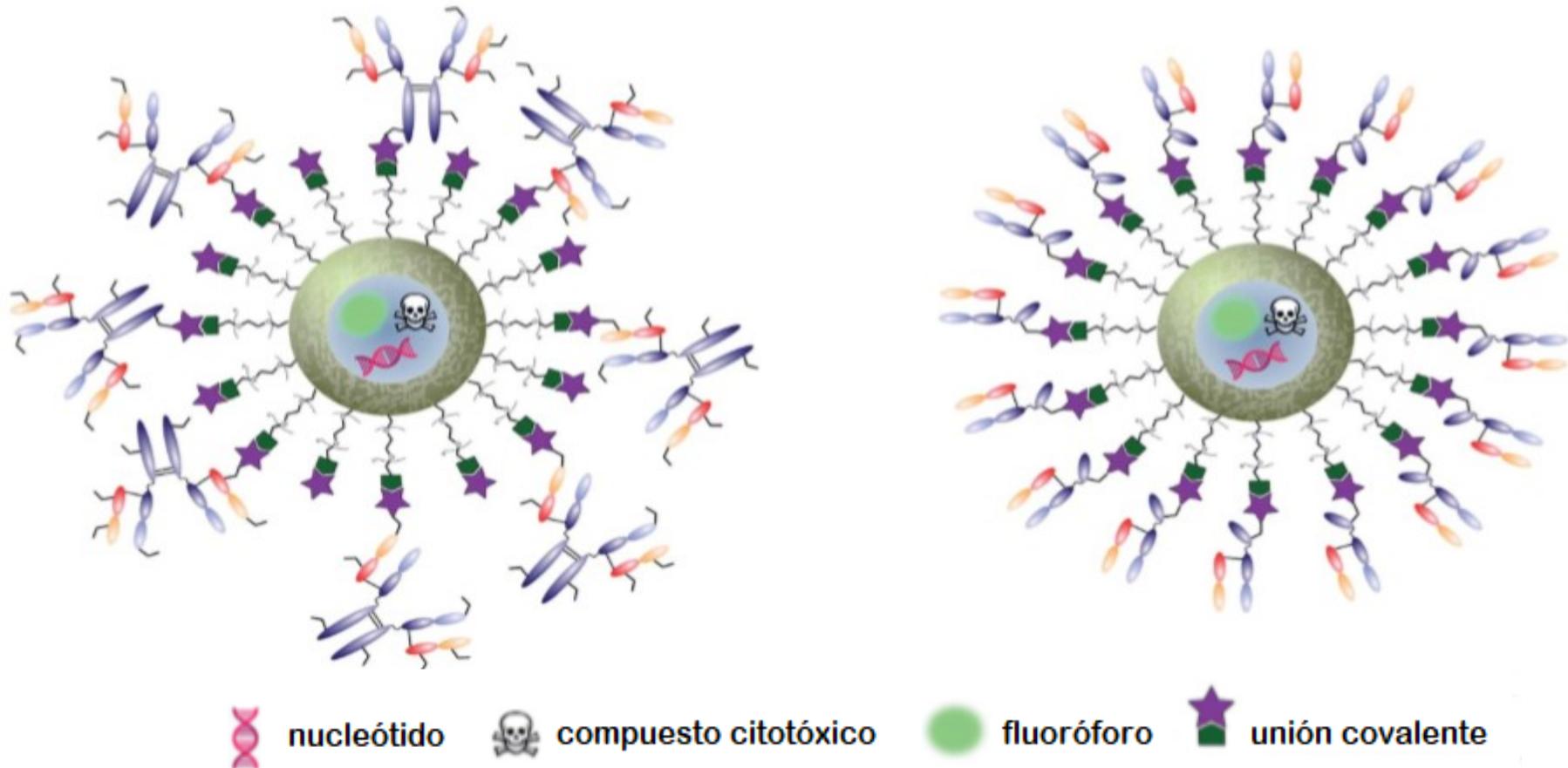


(adaptado de Richards et al., Chem. Sci. 2017)

Nanopartículas + anticuerpos monoclonales.

- disposición no orientada
- aglomeración significativa
- gran incremento del tamaño

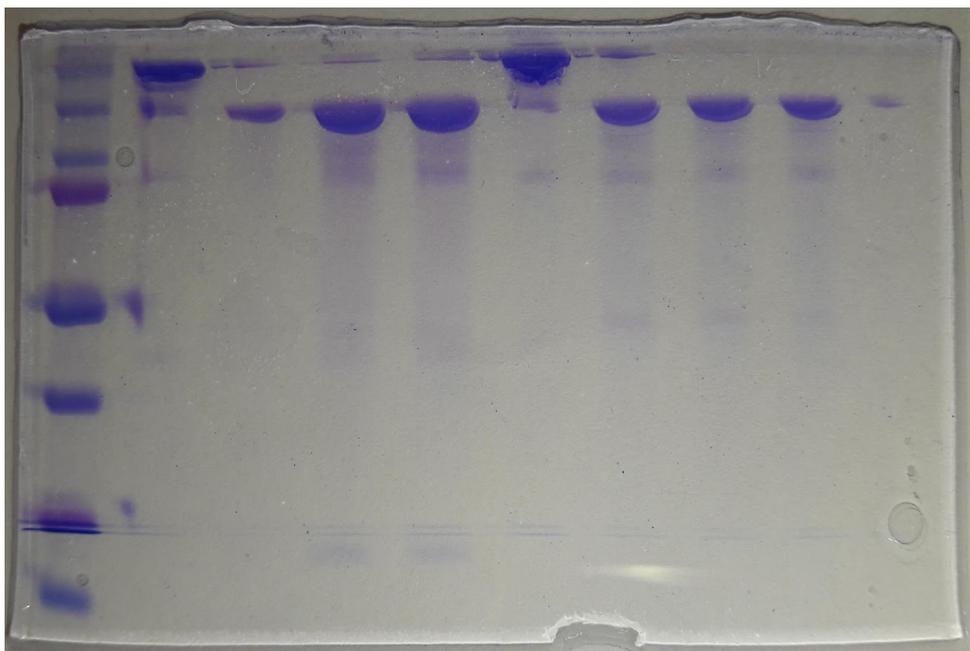
- orientación mejorada
- reducción significativa de la aglomeración
- variación de tamaño menos significativo



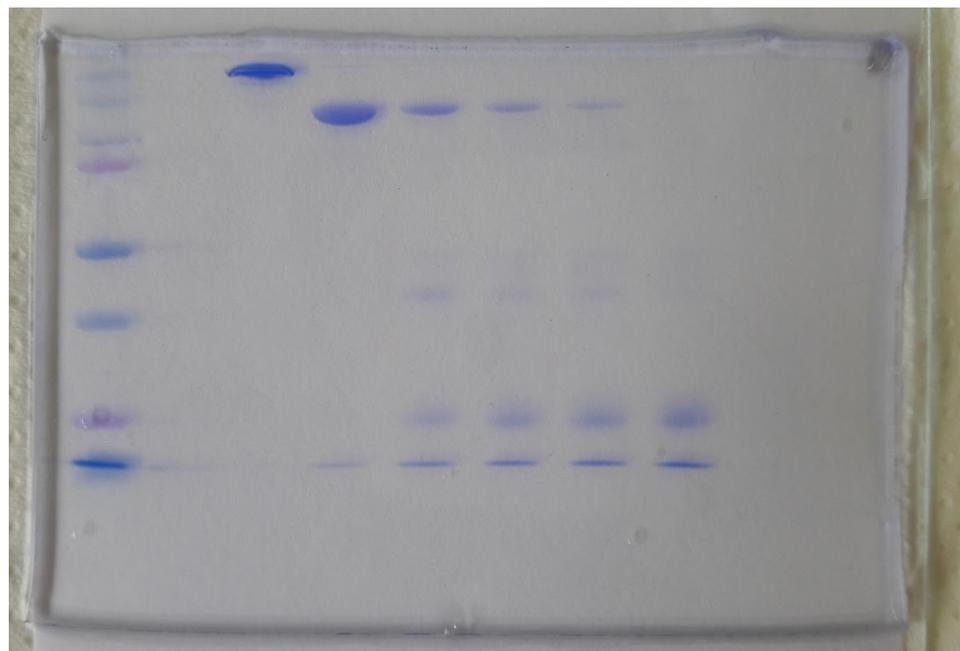
(adaptado de Richards et al., Chem. Sci. 2017)

Obtención de regiones funcionales de Trastuzumab y Cetuximab.

Empleo de mercaptoetilamina (2-me)



Empleo de dithiothreitol (DTT)

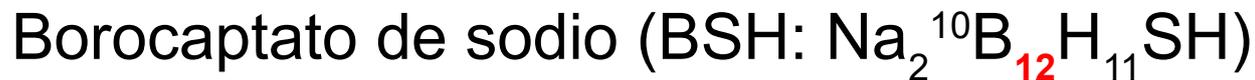


- Parámetros de trabajo:
 - concentración de reactivo
 - tiempo de incubación (baño térmico 37°C)

Compuestos borados.

La distribución del ^{10}B y su acumulación selectiva en células tumorales es un aspecto crítico y de amplio estudio en el ámbito de la comunidad científica de BNCT.

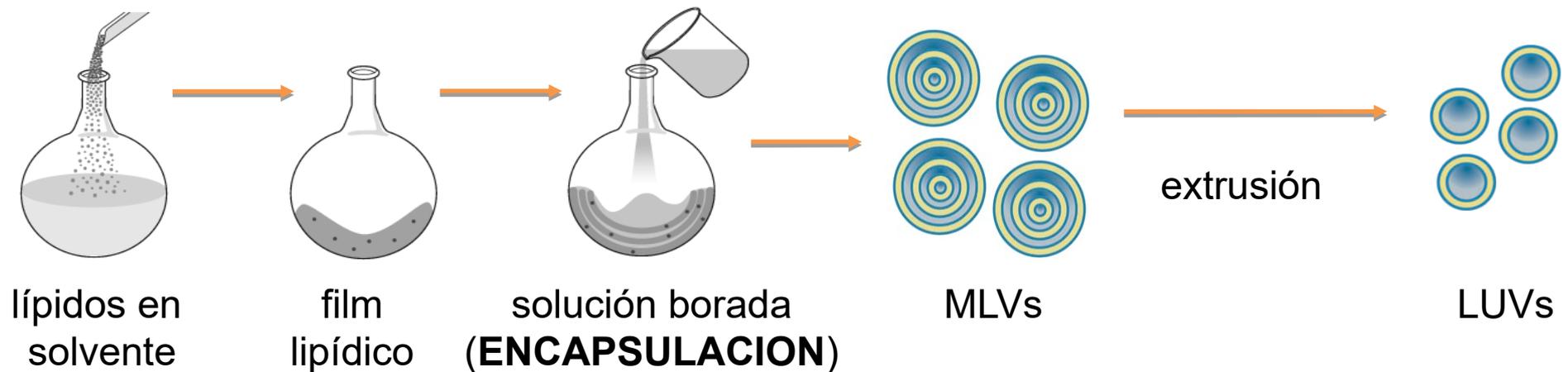
- Compuestos borados



- Optimización de la selectividad: asociación de compuestos borados a aminoácidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, **liposomas**, entre otros.

Desarrollo de liposomas.

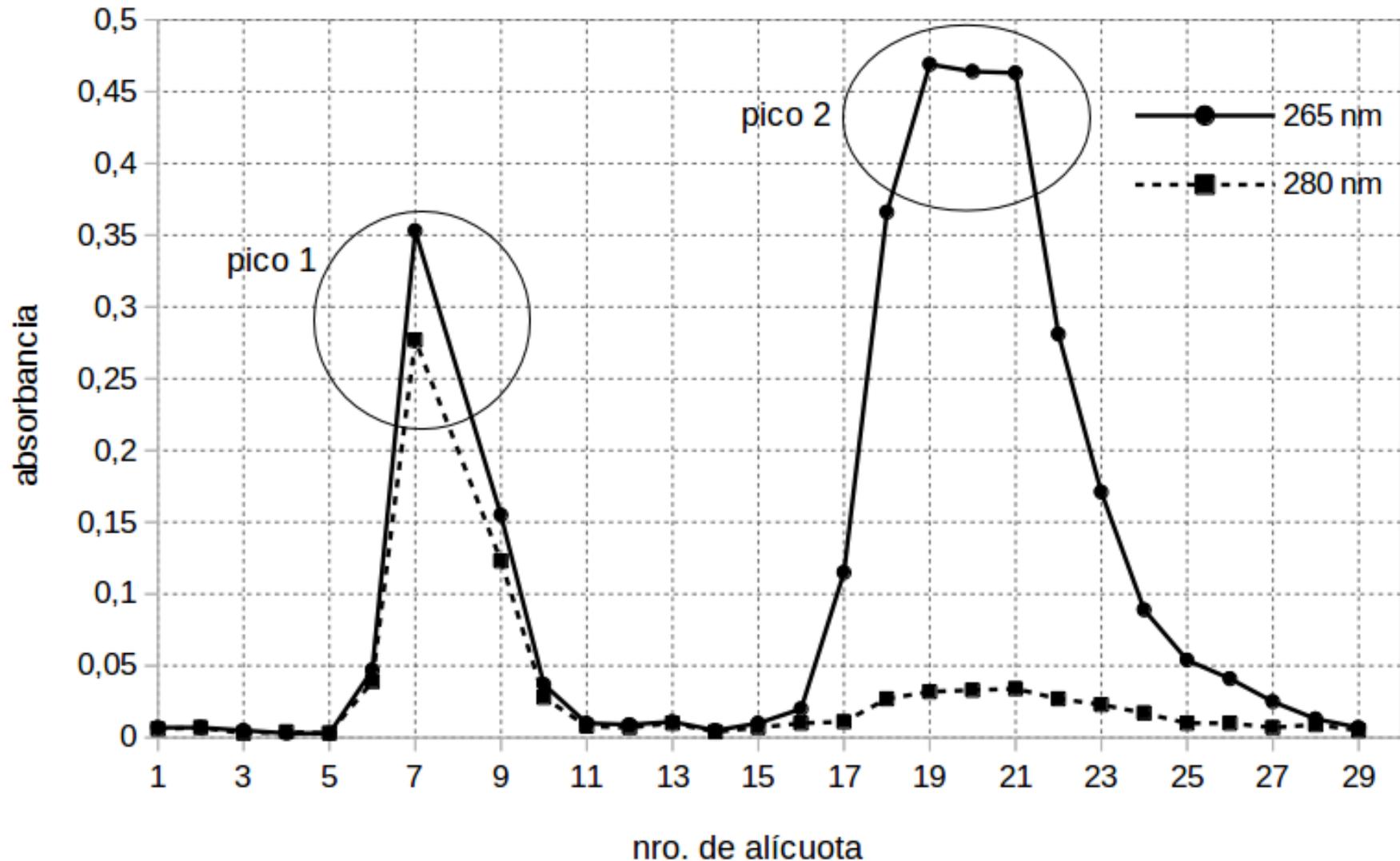
- Formulación lipídica. POPC:CHOL:DDAB:PEG.
- Técnica de hidratación del film lipídico:



(adaptado de Avanti Polar Lipids web site y Jezorka & Orwar Annu. Rev. Anal. Chem. Rev. 2008)

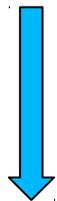
- MLVs: vesículas multilamelares.
- LUVs: vesículas unilamelares (liposomas).
- Purificación de liposomas: cromatografía de exclusión molecular.

Purificación de liposomas. Columna de exclusión molecular.

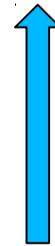


Desarrollo de liposomas. Microfluídica.

- La naturaleza se comporta diferente según la escala. La importancia relativa de distintos fenómenos cambia al reducir la escala:



- Gravedad.
- Inercia.



- Viscosidad.
- Tensión superficial.
- Difusión.
- Fuerzas electrostáticas.

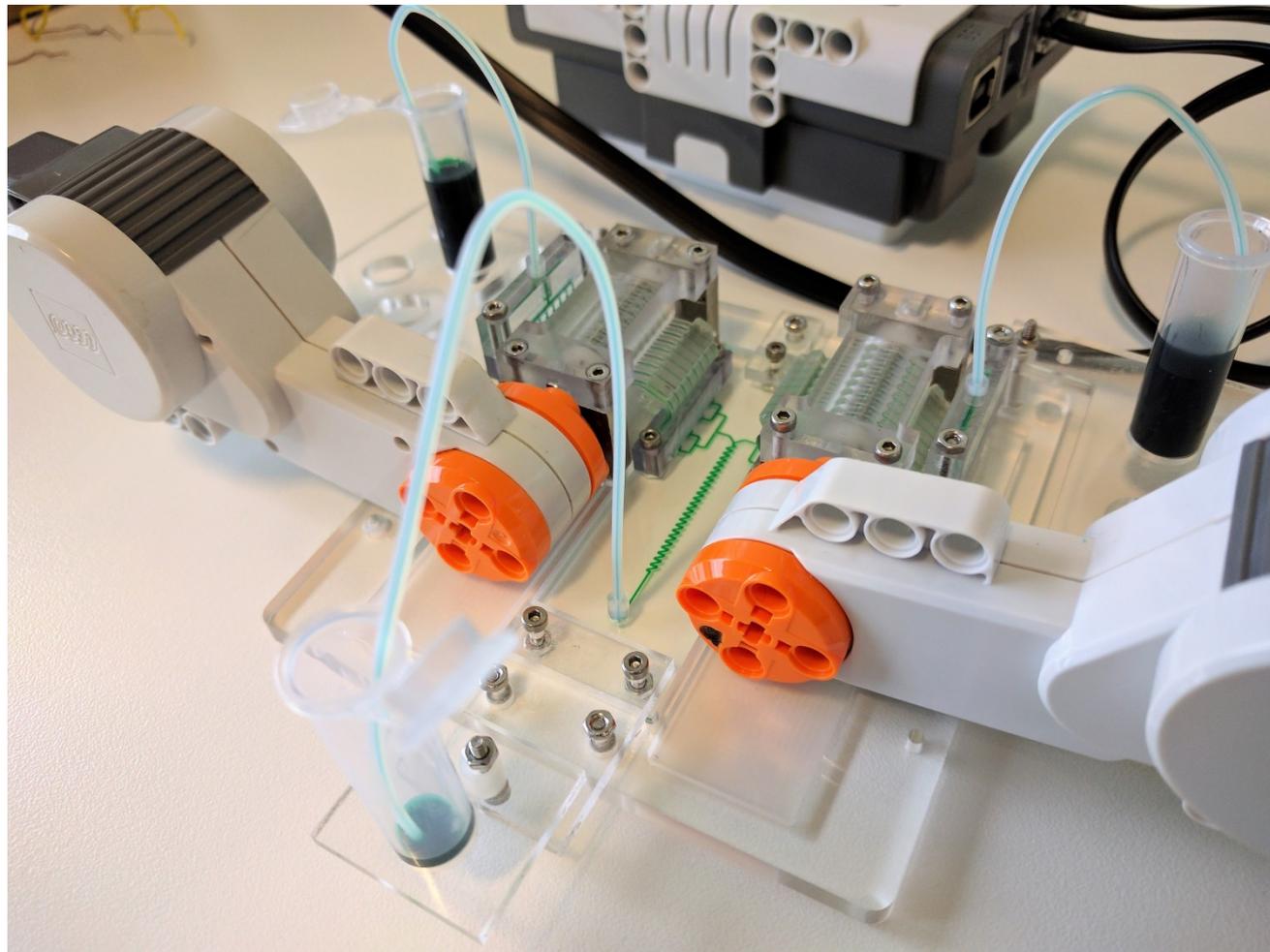
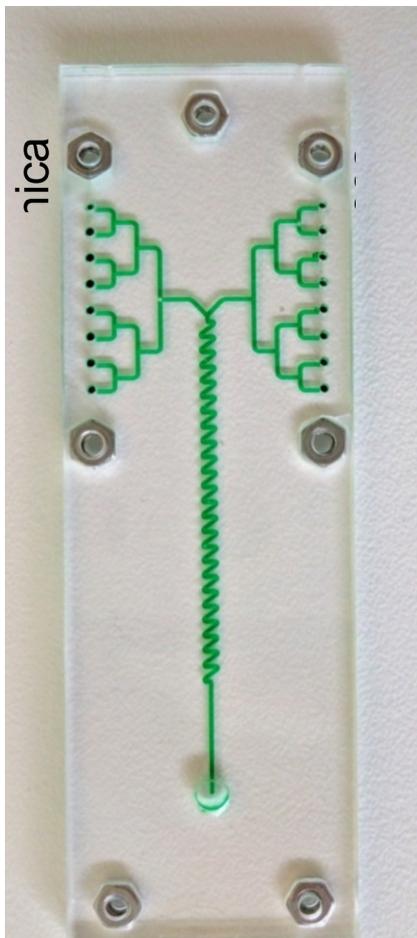
- Estas propiedades son representadas por parámetros adimensionales:

Número de Reynolds :	$R_e = \rho l v / \mu$	ρ : densidad del fluido l : longitud característica
Capilaridad :	$C_a = \mu v / \gamma$	v : vel. promedio del fluido μ : viscosidad del fluido
Número de Péclet :	$P_e = v l / D$	γ : tensión superficial D : coeficiente de difusión

Desarrollo de liposomas. Microfluídica.

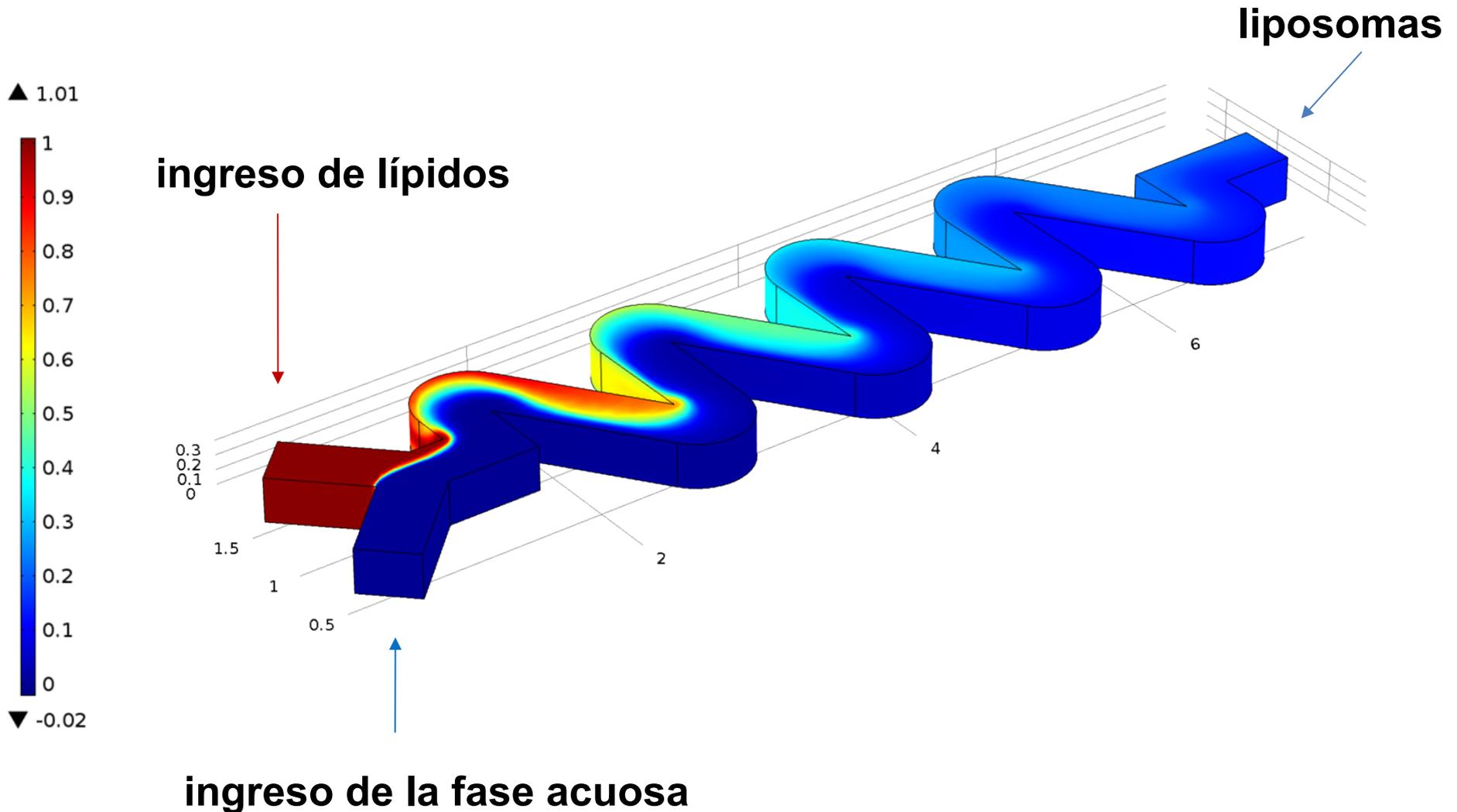
- Para sistemas microfluídicos:
 - R_e , C_a y P_e presentan valores bajos.
 - Las fuerzas viscosas dominan por sobre las inerciales (flujo laminar).
 - La difusión domina por sobre procesos de convección.
- Aspectos generales:
 - Dimensiones y propiedades de los microsistemas.
 - Comportamiento de los líquidos en pequeña escala.
 - Comportamiento de partículas sumergidas en diluciones (suspensiones).
 - Concepto Lab-on-a-chip: sistemas que reproducen procesos de laboratorio en muy pequeña escala, con reducción de costos, tiempos, y mayor eficiencia en el uso de insumos.

Desarrollo de liposomas. Sistema microfluídico.



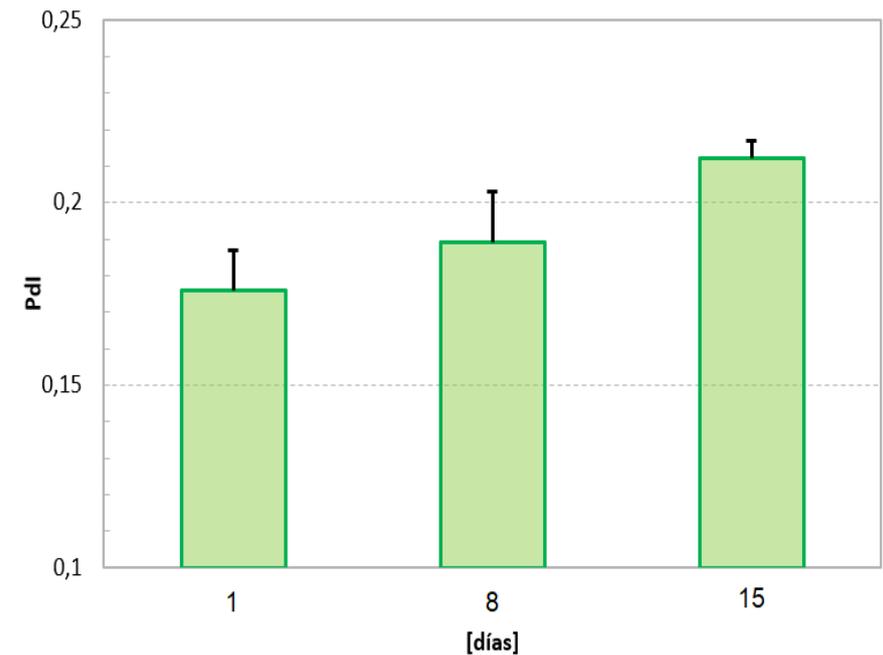
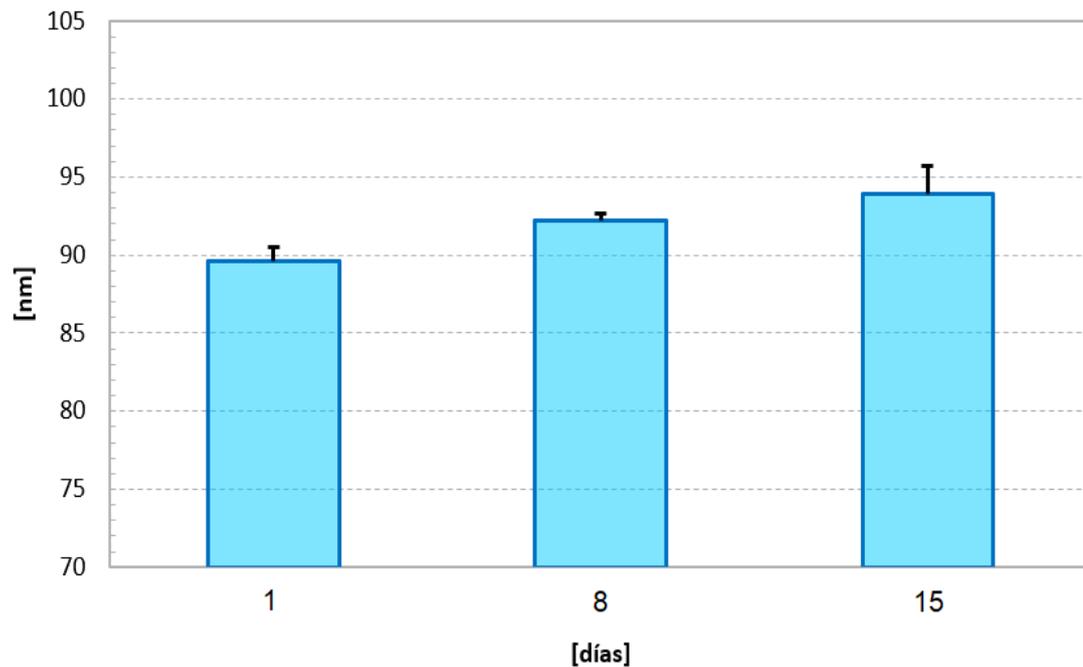
(Conde et. al, Lab on a chip, 2014)

Desarrollo de liposomas. Sistema microfluídico. Micromezclador.



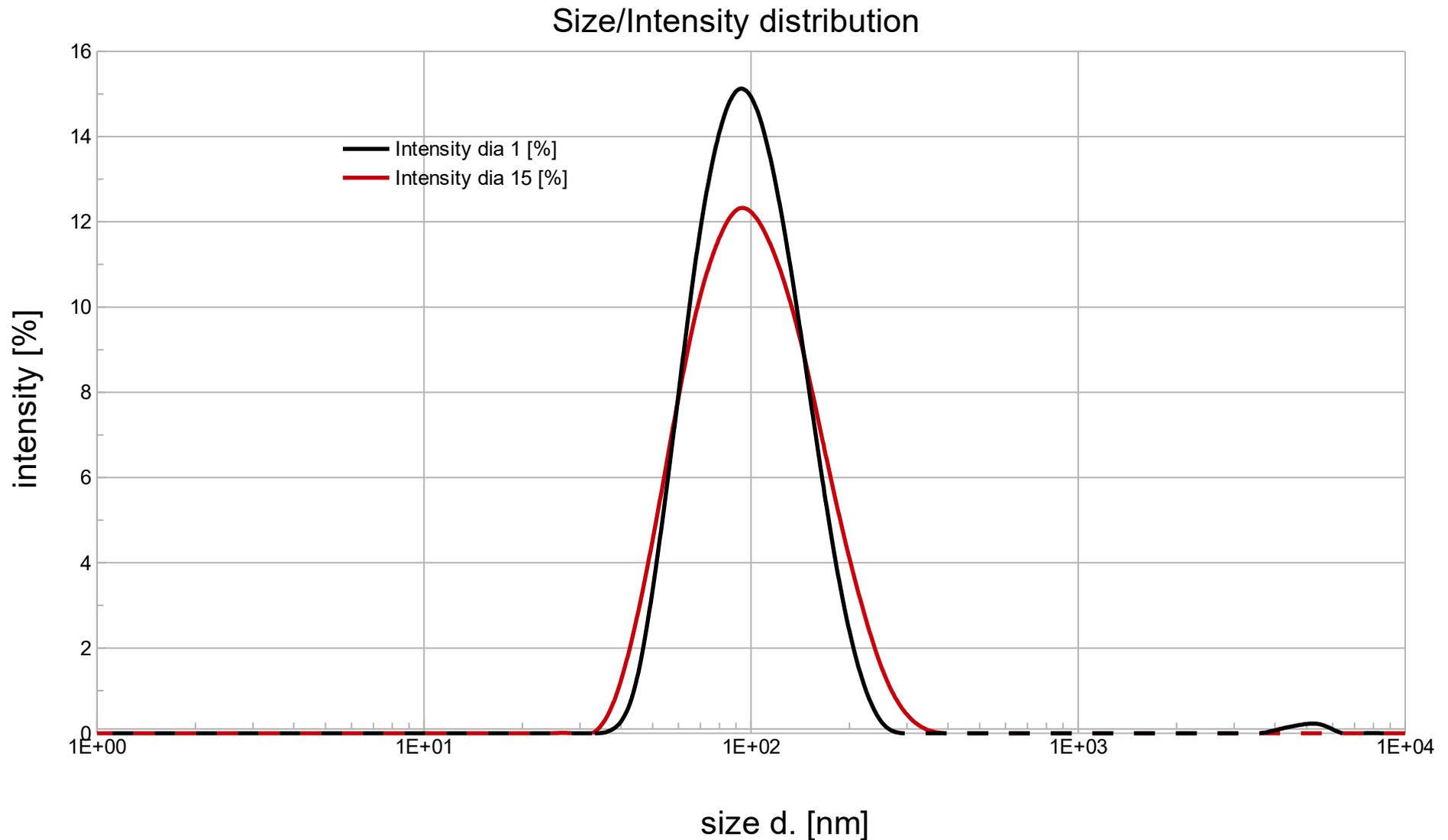
Desarrollo de liposomas. Microfluídica.

- Análisis de tamaño por DLS. Resultados



tiempo [días]	tamaño [nm]	Pdl
1	89,58 ± 0,94	0,176 ± 0,011
8	92,18 ± 0,50	0,189 ± 0,014
15	93,9 ± 1,77	0,212 ± 0,005

Desarrollo de liposomas. Microfluídica.



Desarrollo de liposomas.

Hidratación del film vs. Microfluídica.

	Técnica de hidratación del film	Técnica microfluídica
Recuperación de lípidos (final/inicial) [%]	~10	~35
Encapsulamiento (B/P)	2,4	3,5
Tamaño d. [nm]	144,4	89,6
Índice de Polidispersión (Pdl)	0,24	0,18
Tiempo total de proceso (sin diálisis) [h]	8	1,5
Tiempo de síntesis por muestra [h]	2,5	5 min

Desarrollo de liposomas. Hidratación del film vs. Microfluídica.

- Conclusiones:
 - Menor tamaño de liposomas y mejor distribución.
 - Mayor eficiencia de encapsulado de LCOB.
 - Mayor eficiencia del empleo de reactivos.
 - Menor tiempo de preparación y de síntesis por muestra.

- Referencias.
 - Levitzki and Klein. Mol Aspects Med (2010), 31(4):287-329.
 - Richards et al. Chem Sci (2017), 8:63-77.
 - Jezorka and Owar. Annu Rev Anal Chem (2008), 1:801-32.
 - Fang et al. Adv Drug Del Rev (2011), 63:136-51.
 - Torchilin. Nature Review (2005), 4:145-60.
 - Conde et al. Lab on a chip (2014), 14(23):4506-12.
 - Carugo et al. Sci Re (2016), 6:25876.
- Bibliografía.
 - Liposomas.
 - Liposomes. Methods and protocols, Vol. 1-2. Volkmar Weissig, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2010.
 - Methods in Enzimology, Vol. 367, Part A-E. Nejat Duzgunes, Academic Press 2003.
 - Anticuerpos.
 - Bioconjugate Technics. Greg T. Hermanson, Academic Press, 2013.
 - Monoclonal Antibodies: principles and practice. James W. Goding, Academic Press 1996.
 - Microfluídica.
 - Microfluidics and Nanofluidics, Theory and Selected Applications. Clement Kleinstreuer, John Wiley and Sons, 2014.
 - Theoretical Microfluidics. Henrik Bruus, Oxford University Press, 2008.

Contacto: mario.gadan@gmail.com; mgadan@cae.cnea.gov.ar