

QFBT: Ulises
Merino Orozco

“ANÁLISIS COMPARATIVO DE DOS METODOS DE MODIFICACIÓN DEL
CISPLATINO”

2017



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias en Biomedicina



“ANÁLISIS COMPARATIVO DE DOS METODOS DE MODIFICACIÓN DEL CISPLATINO”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en
Ciencias en Biomedicina

Presenta:

QFBT: Ulises Merino Orozco

Dirigido por:

Dr. Francisco Quintanilla Guerrero



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias en Biomedicina

“ANÁLISIS COMPARATIVO DE DOS MÉTODOS DE MODIFICACIÓN DEL CISPLATINO”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestría en Ciencias en Biomedicina

Presenta:

QFBT. Ulises Merino Orozco

Dirigido por:

Dr. Francisco Quintanilla Guerrero

Dr. Francisco Quintanilla Guerrero
Presidente

Dra. Susana Vargas Muñoz
Secretario

Dr. Ma. Guadalupe Zaldivar Lelo de Larrea
Vocal

Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreyra
Suplente

Dr. José Rogelio Rodríguez Talavera
Suplente

Dr. Javier Ávila Morales
Director de la Facultad de Medicina, UAQ

[Firma]
Firma

[Firma]
Firma

[Firma]
Firma

[Firma]
Firma

[Firma]
Firma

[Firma]
Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Julio 2017

RESUMEN

Introducción: La pegilación comúnmente se realiza de forma química aumentando el peso y tamaño de la molécula con lo que evita la ultrafiltración renal. Además, se caracteriza por presentar una gran velocidad de absorción. En el mercado existen medicamentos que han sido modificados químicamente con Polietilenglicol (PEG), la modificación de estos fármacos han presentado un incremento en la semivida, lo que se traduce a una disminución en la dosis para alcanzar el efecto terapéutico. Dentro de las modificaciones que existen a polímeros hay un método físico donde utiliza reacciones ionizantes con el fin de modificar estructuras poliméricas formando reticulaciones, es decir, al transferir energía inducida por rayos x o gama el polímero abre sus cadenas permitiendo la unión hacia otras cadenas de polímeros para poder formar redes, de tal manera que hay un incremento en su estructura y existe un cambio físico-químico en el material irradiado. **Objetivo:** Comparar por Dispersión de luz e IR el desarrollo de un método físico de pegilación al cisplatino con la modificación Química del cisplatino utilizando PEG **Metodología:** Se realizó una modificación Química y Física a tres diferentes concentraciones de cisplatino con PEG de peso molecular 400 Da dando como resultado un mayor peso molecular y tamaño de partícula del medicamento, llevando a cabo pruebas de caracterización por Dispersión de Luz Dinámica (DLS) e Infrarrojo (IR). **Resultados:** El espectro de IR muestra los grupos funcionales característicos del acoplamiento fármaco-polímero sin alterar su sitio activo del Cisplatino y un incremento de tamaño de partícula por ambos métodos de Pegilación caracterizados por DLS, dando un mejor rendimiento utilizando el método de pegilación de forma física. **Conclusiones:** Al ser pegilado el Cisplatino por ambos métodos de pegilación aumenta el tamaño de partícula en comparación con el cisplatino sin pegilar. Al comparar el pegilado tradicional con el método físico se observó que existe un mayor número de moléculas pegiladas. El PEG es escindible lo cual no afectara el incremento de tamaño y tampoco su sitio de unión fármaco-PEG para realizar su acción terapéutica ya que se cuidó que fuera en sitios específicos esta modificación en la molécula de cisplatino.

Palabras clave: (Polietilenglicol, Pegilación, Cisplatino Pegilado)



SUMMARY

Introduction: Pegylation is commonly carried out chemically increasing the weight and size of the molecule, thus avoiding renal ultrafiltration. In addition, it is characterized by a high absorption speed. In the market there are drugs that have been chemically modified with polyethylene glycol (PEG), the modification of these drugs have shown an increase in the half-life, which translates into a decrease in the dose to achieve the therapeutic effect. Within the modifications that exist to polymers there is a physical method where ionizing reactions are used to modify polymeric structures forming reticulations, that is to say, when transferring energy induced by x-rays or gamma, the polymer opens its chains allowing the union towards other polymer chains to be able to form networks, in such a way that there is an increase in its structure and there is a physical-chemical change in the irradiated material. **Objective:** Compare by light scattering and IR the development of a physical method of pegylation to cisplatin with the chemical modification of cisplatin using PEG **Methodology:** A chemical and physical modification was made to three different concentrations of cisplatin with PEG of molecular weight 400 Da giving as a result, a greater molecular weight and particle size of the drug, carrying out characterization tests by Dynamic Light Dispersion (DLS) and Infrared (IR). **Results:** The IR spectrum shows the functional groups characteristic of the drug-polymer coupling without altering its active site of Cisplatin and an increase in particle size by both PEGylation methods characterized by DLS, giving a better performance using the PEGylation method. **Conclusions:** Cisplatin pegylated by both pegylation methods increases the particle size compared to non-pegylated cisplatin. When comparing the traditional pegilado with the physical method it was observed that a greater number of pegylated molecules exists. The PEG is cleavable which will not affect the increase in size and neither its drug-PEG binding site to perform its therapeutic action since it was taken care that this modification in the cisplatin molecule was at specific sites.

Keywords: (Polyethylene glycol, Pegylation, Pegylated cisplatin)



AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por su apoyo en la beca para poder seguir con mis estudios de posgrado y hacer posible este trabajo de investigación y producto de tesis. A la Universidad Autónoma de Querétaro FMUAQ y a la Universidad Autónoma de México, CFATA, representada por el Dr. Francisco Quintanilla Guerrero y José Rogelio Rodríguez Talavera respectivamente, por haber sido mi Alma Mater durante estos dos últimos años, por aceptarme como tesista en el Departamento de Ingeniería Molecular de Materiales, por haberme motivado el interés de la investigación y por sus valiosas enseñanzas y consejos, les agradezco su importante contribución, su activa participación, constante apoyo, confianza y amistad durante todo el desarrollo de la parte experimental del trabajo.

A la Dra Susana Vargas Muñoz, Co-Directora de esta tesis de Maestría, por sus valiosas enseñanzas, interesantes consejos, excelentes recomendaciones y su permanente guía y orientación en el diseño, desarrollo y realización de este trabajo experimental.

Al Dr. Maykel González Torres, por sus apreciadas enseñanzas en la parte de modificación por radiación de rayos gamma en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM así como sus oportunos comentarios y apoyo constante que permitieron la materialización de este trabajo de tesis.

A mis padres Abdon Merino Torreblanca Y Rosa Orozco Padilla por enseñarme con su ejemplo el valor del trabajo responsable, meticulado, ordenado y serio.

A mi hermano Alberto Merino por su constante motivación a lo largo de la maestría y a mis compañeros de clase que con sus risas, bromas y apoyo en mi investigación hicieron que este camino fuera más ameno.

A todos mil gracias



ÍNDICE

RESUMEN-----	I
SUMMARY-----	II
AGRADECIMIENTOS-----	III
ÍNDICE-----	IV
ÍNDICE DE FIGURAS -----	VI
ÍNDICE DE TABLAS -----	VII
CAPITULO I-----	1
I-1 INTRODUCCIÓN-----	1
I-2 JUSTIFICACIÓN-----	3
I-3 HIPÓTESIS -----	4
I-4 OBJETIVOS -----	5
I-4-1 OBJETIVOS ESPECIFICOS-----	5
CAPITULO II MARCO TEÓRICO-----	6
II-1 INTRODUCCIÓN A LA PEGILACIÓN-----	6
II-2 PEG Y PEGILACIÓN DE FORMA QUÍMICA-----	7
II-3 RADIACIÓN Y PEGILACIÓN POR MÉTODO FÍSICO -----	11
II-3-1 RADIACIÓN IONIZANTE ESCASAMENTE-----	12
II-3-2 LAS TRANSFORMACIONES QUÍMICAS-----	12
II-3-3 LA ALTA DENSIDAD DE IONIZACIÓN-----	14
II-3-4 DAÑOS EN LOS POLÍMEROS PRODUCIDOS POR HACES DE IONES-----	14
II-3-5 FORMACIÓN DE TRAZAS DE MATERIALES POLIMÉRICOS-----	15
II-3-6 ESTADO DE CARGA DEL PROYECTIL-----	15
II-4 CISPLATINO-----	17
II-4-1 BREVE HISTORIA DEL CISPLATINO-----	17
II-4-2 CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS-----	18
II-4-3 MECANISMO DE ACCIÓN DEL CISPLATINO-----	20
II-4-4 POSOLOGÍA Y ELIMINACIÓN -----	22
II-4-5 REACCIONES ADVERSAS -----	23
CAPITULO III METODOLOGÍA -----	28
III-1 MATERIALES Y MÉTODOS-----	28
III-1-1 REACTIVOS -----	28

III-1-2 EQUIPOS -----	28
III-1-3 METODOLOGÍA-----	28
III-1-3-1 PEGILACIÓN QUÍMICA-----	28
III-1-3-2 PEGILACIÓN FÍSICA -----	30
CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	32
CAPITULO V CONCLUSIONES-----	36
CAPITULO VI BIBLIOGRAFÍAS -----	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cambios químicos en la molécula irradiada-----	13
Figura 2. Mecanismo de hidrolisis del cisplatino -----	19
Figura 3. Mecanismo de acción del cisplatino -----	21
Figura 4. Ataque nucleofílico de Polietilenglicol Activado con cloruro cianúrico hacia el cisplatino----- -----	29
Figura 5. Esquema de la activación de metoxipolietilenglicol con Cloruro Cianúrico -----	30
Figura 6. Grafica comparativa por concentración de muestras modificadas química y físicamente con mPEG 400 -----	34
Figura 7. Espectro de FTIR del polietilenglicol y cis-[Pt(NH ₃) ₂ Cl] Pegilado -----	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos actualmente en el mercado	10
--	----

CAPITULO I

I-1 INTRODUCCIÓN

Existen modificaciones químicas y estructurales que se llevan a cabo en fármacos, con el fin de optimizar su actividad y su toxicidad, o bien para desarrollar una nueva actividad farmacológica sobre la molécula (Seoane et al., 2004). La pegilación es un método usado frecuentemente en la modificación de los fármacos, consiste en la unión de un polietilenglicol (PEG) a un fármaco generando un derivado estable, con el fin de mejorar el potencial terapéutico (Harris et al., 2001).

La pegilación se realiza de forma química, aumentando el tamaño de la molécula con lo que se evita la filtración renal. Además, se caracteriza por presentar una gran velocidad de absorción (Ivens et al., 2015). En el mercado existen medicamentos que han sido modificados químicamente con (PEG), la modificación de estos fármacos han presentado una semivida de eliminación aumentada, lo que se traduce a una disminución en la dosis para alcanzar el efecto terapéutico (Veronese et al., 1997). Sin embargo, la pegilación actualmente utilizada y denominada pegilación química presenta desventajas, por ejemplo las soluciones utilizadas generan impedimento estérico, disminuyendo el número de moléculas pegiladas. Además, de los elevados costos en los reactivos utilizados para pegilar (Webster et al., 2007).

Debido a las desventajas observadas se buscan nuevos métodos que permitan mejorar la estabilidad del fármaco y la acción terapéutica. Las radiaciones ionizantes podrían ser una alternativa que permita pegilar fármacos a un bajo costo, y con un mayor rendimiento en el producto pegilado. Las radiaciones ionizantes son radiaciones con la energía suficiente para ionizar la materia mediante la extracción de electrones (Chapiro et al., 1995). La pegilación mediante irradiación ionizante utiliza radiación gamma, penetrando con un haz de electrones que depositan una altísima densidad de energía dando como resultado el rompimiento de cadenas lineales, obteniendo radicales libres de manera que una molécula vecina pueda

acoplarse a ella. Debido a este hecho se inducen cambios físico-químicos muy complejos en la superficie del material irradiado. De esta manera podría realizar la pegilación del fármaco (Tretinnikov et al., 1999; Shen et al., 1996). La comparación de la pegilación química y de la pegilación mediante radiaciones ionizantes se llevó a cabo en el cisplatino. El cisplatino es un complejo hidrosoluble, con un núcleo cuadrado que contiene dos átomos de cloro y dos grupos amino en posición cis. Este une en forma bifuncional los anillos de los átomos de nitrógeno de las purinas y piridinas, perdiendo sus iones cloro y siendo reemplazados por la base subligante; este puente de unión y la formación de puentes reversibles en el DNA es similar a la acción de los agentes alquilantes bifuncionales (Lippert et al., 1999). Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de DNA y, en menor grado, la de RNA y proteínas. Es un fármaco utilizado en varios tipos de cáncer, entre los que se incluyen sarcomas, algunos carcinomas (p.ej. cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de ovario), linfomas y tumor de células germinales (Howell et al., 2013).

La comparación de estos métodos permitirá determinar el método con mayor rendimiento, así como la obtención de un medicamento con menor riesgo de toxicidad.

I-2 JUSTIFICACIÓN

Debido a la demanda ejercida por la industria farmacéutica sobre la elaboración de fármacos con características deseables, y en la mejora de la generación de tratamientos eficaces, se ha orillado al desarrollo de metodologías más apropiadas con la finalidad de mejorar los fármacos ya disponibles.

Actualmente en el mercado existen más 10 fármacos pegilados que han sido probados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y hasta la fecha se cuenta con más de 20 en ensayos clínicos. La inversión de estos productos por muchas compañías farmacéuticas tiene una tendencia exponencial, lo que potencializa que la pegilación mantenga el futuro de desarrollo de fármacos (Swierczewska, 2015).

La pegilación es una de las tecnologías que pretenden la extensión de la vida media, frecuentemente utilizada en el área clínica, contando con la aprobación de seguridad por parte de la FDA en seres humanas por aproximadamente desde hace más de dos décadas. Teniendo como finalidad impulsar la demanda en el mercado de menores dosis y terapias de acción más prolongada. Sin embargo, presenta diversas desventajas; principalmente los costos requeridos para realizar esta metodología, además, de un menor porcentaje de moléculas pegiladas.

Por lo que se ha propuesto el uso de nuevas metodologías, que permitan una mejor eficacia de la pegilación, descartando las desventajas de la pegilación convencional. Uno de ellas es la metodología nombrada reacciones ionizantes, método propuesto en este trabajo; el cual tiene como finalidad mejorar el rendimiento de material pegilado.

I-3 HIPÓTESIS

El desarrollo de un nuevo método de modificación por medio de reacciones ionizantes puede ser capaz de utilizarse como un método en las modificaciones de cualquier medicamento y poder utilizarse como terapia farmacológica sin tener impedimento de sus sitios activos del medicamento y rechazo del mismo ya que tiene una alta compatibilidad con el organismo, de esta manera el medicamento responderá de igual forma en cuanto a su reconocimiento del sitio blanco obteniendo una mayor biodisponibilidad.

I-4 OBJETIVO GENERAL

Comparar por técnicas de caracterización el acoplamiento del cisplatino al polietilenglicol con procedimientos físicos y procedimientos químicos.

I-4-1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el acoplamiento del cisplatino con PEG por métodos físicos y métodos químicos.
- Caracterizar la modificación química y física del cisplatino con técnicas de Dispersión de Luz Dinámica e Infrarrojo.

CAPITULO II MARCO TEÓRICO

II-1 INTRODUCCIÓN A LA PEGILACIÓN

El uso de proteínas y péptidos como agentes terapéuticos en humanos se ha ampliado en los últimos años (Giralt, 2004) debido a: (1) el descubrimiento de nuevos péptidos y proteínas, (2) una mejor comprensión de los mecanismos de acción *in vivo*, (3) mejoras en la expresión o síntesis de proteínas y péptidos que se asemejan a las proteínas y péptidos humanos, y (4) las mejoras en formulación para síntesis de fármacos, proteínas y péptidos que se ven alteradas en sus estructuras moleculares para tener la capacidad de entregar nuevos polipéptidos *in vivo*, con la optimización de propiedades farmacocinéticas y farmacodinamias que los caracteriza. Se estima que en el año 2000, (Walsh, 2000) hasta 500 productos biofarmacéuticos fueron sometidos a ensayos clínicos, y las tasas de crecimiento anual estimada de productos de proteínas (glicoproteínas, proteínas no glicosiladas y anticuerpos) van desde 10 a 35%.

Aunque más productos biofarmacéuticos se encuentran en desarrollo, muchos de ellos tienen problemas ya que algunos son típicos de la terapia con polipéptidos, incluyendo la corta vida media de circulación, la inmunogenicidad, la degradación proteolítica, y la baja solubilidad. Varias estrategias se han convertido en formas de mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinamias de los productos biofarmacéuticos, que incluyen: (1) la manipulación de la secuencia de aminoácidos para disminuir la inmunogenicidad y la escisión proteolítica, (2) la fusión o conjugación a inmunoglobulinas y proteínas de suero, tales como albúmina, (3) la incorporación a los vehículos de suministro de fármacos para la protección y liberación lenta, y (4) la conjugación de polímeros naturales o sintéticos.

Los biotecnólogos y farmacéuticos se han familiarizado con las propiedades farmacológicas y biológicas mejoradas de polipéptidos terapéuticamente útiles que

tienen unido covalentemente al poli (etilenglicol) o PEG. Por ejemplo, la conjugación con PEG protege epítomos antigénicos del polipéptido, reduciendo el espacio libre reticuloendotelial (RES) y el reconocimiento por el sistema inmune y la reducción de la degradación por proteasas. La conjugación con PEG también aumenta el tamaño del polipéptido o fármaco utilizado, lo que reduce la filtración renal y altera la biodistribución. Los factores que afectan las propiedades anteriores son: (1) el número de cadenas de PEG unidas al polipéptido, enzima o fármaco, (2) el peso molecular y la estructura de las cadenas de PEG unidas al polipéptido, enzima o fármaco y (3) la ubicación de los sitios de unión del PEG que son utilizados para unir el polipéptido, enzima o fármaco. La importancia en la calidad de reacción con PEG acoplado a péptidos proteínas o fármacos sólo se ha realizado en los últimos años a medida que más y más fármacos modificados con PEG han alcanzado los ensayos clínicos de fase tardía.

II-2 PEG Y Pegilación de forma química

El PEG es un poliéster de peso molecular elevado (5000 Da usado comúnmente para pegar) formado por varias unidades de óxido de etileno (etilenglicol), es decir, su fórmula química corresponde con $H(OCH_2CH_2)_nOH$. El PEG puede ser lineal o ramificado con un grupo hidroxilo en cada extremo, no inmunogénico y extremadamente soluble en agua y varios solventes orgánicos. Cada molécula de PEG puede formar puentes de hidrogeno con 100 moléculas de agua. Las moléculas de PEG no son toxicas, porque no interactúan con las estructuras biológicas, con los tejidos ni con los órganos, además son fácilmente desechadas por el cuerpo a través del riñón (pesos moleculares del polímero menores a 20 kDa), o del hígado (pesos moleculares arriba de 20 kDa). EL PEG está aprobado, por la Agencia Regulatoria de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en ingles), para su uso en humanos ^[7-10]. La conjugación de péptidos y proteínas con diversos polímeros constituye actualmente un área de gran interés, especialmente en la terapia oncológica, a la que se han incorporado proteínas antitumorales, enzimas, citocinas, etc. La conjugación con polímeros produce cambios significativos en el perfil farmacocinético de las macromoléculas,

permitiendo superar algunas de las limitaciones que presentaban para su utilización clínica. El principal cambio es un incremento en la semivida de eliminación con un aumento de la captación celular por endocitosis. Una vez en sangre, se produce la liberación del conjugado a los compartimentos endosómicos y lisosómicos de la célula, con descenso del pH (5,5-6,0). Una vez alcanzado el lisosoma se produce la degradación metabólica por acción de las hidrolasas intracelulares.

La pegilación de proteínas con una o varias cadenas de polietilenglicoles (PEG) es, posiblemente, el mecanismo de conjugación más desarrollado. La reacción de pegilación más frecuente implica al grupo ϵ -amino de la lisina o grupos amino terminales de las proteínas. Las biomoléculas conjugadas presentan propiedades fisicoquímicas diferentes de las proteínas originales, como cambios en la conformación, impedimento estérico, capacidad de unión electrostática, valores de pK locales de la lisina, hidrofobia, punto isoeléctrico, etc. Estos cambios pueden quedar reflejados, en principio, por variaciones en la actividad, detectada mediante ensayos *in vitro*, y en la eficacia, establecida con ensayos *in vivo*. La fijación a receptores se reduce progresivamente al aumentar la masa molecular del polímero, lo que produce un descenso de la actividad *in vitro* con tiempos de incubación cortos. Sin embargo, la eficacia de la proteína se incrementa como consecuencia de los siguientes mecanismos:

- Retraso en el aclaramiento renal de la proteína, que produce un incremento en la semivida de eliminación y en el valor del área bajo la curva de niveles séricos. Este último parámetro refleja el «periodo de exposición» y se relaciona, en ocasiones, con la eficacia en modelos pK-pD.
- Mayor estabilidad frente a las enzimas responsables de la degradación de péptidos y proteínas, frecuentemente como consecuencia del impedimento estérico.
- Menores efectos adversos debido a que el PEG reduce significativamente la inmunogenicidad y antigenicidad de las proteínas.

Desde 1990, 12 productos biofarmacéuticos pegilados han sido introducidos en el mercado como fármacos para uso humano (Tabla 1). Once son productos biofarmacéuticos proteicos pegilados y uno es un aptámero pegilado (Macugen,

2003) administrado intravenosamente. Los componentes de PEG de estos productos biofarmacéuticos varían ampliamente en cuanto al tamaño de la estructura de ramificación, y el tipo de acoplamiento. Adagen ®, Krystexxa ®, Neulasta ®, Oncaspar ®, PEG-Intron ®, Somavert ® y Plegridy ® se pegilan con moléculas de polietilenglicol que tienen un peso molecular entre 5-20 KDa. Cimzia ®, Macugen ®, Mircera ®, Omontys ® y Pegasys ® están pegiladas con moléculas de PEG de 30 ó 40 KDa para un mayor aumento de vida media, pero en este trabajo se utiliza PEG de 400 Da. La diferencia entre los pegilados de las moléculas actualmente en el mercado con pesos moleculares de más de 5000 Da al pegilado en este trabajo que utiliza 400 Da es porque las moléculas del cisplatino tienen que entrar en el núcleo de la célula y no acoplarse a las membranas de alguna bacteria o célula como distintos fármacos pegilados mencionados anteriormente. El cisplatino tiene un peso molecular de 300.06 g/mol, es una molécula muy pequeña que puede introducirse fácilmente dentro del núcleo de la célula.

Tabla 1. Fármacos actualmente en el mercado

Brand Name, Generic Name	Molecular Weight of Drug (kDa)	PEG Size (kDa) [Number of PEGs per Drug Molecule]	Patient Dose	Indication (Year Approved)	Human Route of Administration/ Duration of Treatment
Adagen®, pegadamas	96-126	5 [11-17]	Patient dependent (approximately 15 IU/kg/wk)	Severe combined immunodeficiency (1990 US)	IM/chronic
Oncaspar®, pegaspargase	483-548	5 [69-82]	2500 IU/m ²	Leukemia (1994 US)	IV or IM
Somavert®, pegvisomant	42-52	5 [4-6]	Maximum daily SC dose: 30 mg. Not intended for pediatric population.	Acromegaly (2002 EU, 2003 US)	SC/chronic
Krystexxa®, pegloticase	540	10 [9 per homotetramer (4)]	8 mg/2 wk	Chronic gout (2010 US; 2013 EU)	IV infusion/once every 2 wk
Peg-Intron®, PEG-interferon alpha 2b	31	12 [1]	0.5-1.0 µg/kg SC 1×/wk (1.5 µg/kg SC 1×/wk in combo w/ribavirin)	Hepatitis C (2001 US; 2000 EU)	SC/6 mo or 1 y
Neulasta®, pegfilgrastim	39	20 [1]	6 mg/ Q 3 weeks	Neutropenia (2002 US, EU)	SC
Mircera®, CERA; PEG-EPO	60	30 [1]	0.6 µg/kg once every 2 weeks	Anemia/chronic renal failure (2007 US, EU)	IV and SC/chronic
Omontys®, voluntary recall reported 2/24/2013	45	40 [1 branched]	0.04 mg/kg body weight, once a month	ESA: anemia/chronic renal failure (voluntary recall)	IV or SC
Macugen®, pegaptanib	50	40 [1 branched]	Intravitreal 1.6 mg	Wet form of age-related macular degeneration (2004 US, 2006 EU)	Intravitreal/repeated treatment
PEGASYS®, PEG-interferon alpha 2a	60	40 [1 branched]	2.7 and 3.6 µg/kg 1× week for 48 (cycle repeated)	Chronic hepatitis C, B (2002 US, EU)	SC/chronic
Cimzia®, certolizumab pegol	91	40 [1 branched]	400 mg up to 1× per month (after loading dose)	Chronic, moderate to severe RA, Crohn's disease, axial spondyloarthritis and psoriatic arthritis (2008/2009 US; 2008 EU)	IV and SC/chronic
Plegridy®, peginterferon beta-1	44	20 [1]	125 µg every 14 days (after loading dose)	Relapsing forms of multiple sclerosis (2014 US, EU)	SC

En los últimos años se ha incrementado considerablemente el uso de biofármacos para el tratamiento de diferentes enfermedades. Sin embargo, éstos pueden poseer una serie de desventajas, entre las cuales pueden mencionarse su corta vida media, la posibilidad de reconocimiento y ataque por parte del sistema inmune y la digestión proteolítica. Esto hace que sea necesaria una administración frecuente para alcanzar el efecto terapéutico deseado de manera sostenida. Con el propósito de superar estas limitaciones, en este trabajo se ha propuesto un técnica innovadora para el acoplamiento de un polímero biocompatible a un fármaco usado comúnmente para el tratamiento contra diversos tipos de cáncer (Cisplatino) usando dos métodos de modificación estructural al fármaco, el primero método y que es el más usado en la actualidad es haciendo reaccionar químicamente el polímero con el fármaco, esta técnica es la que se lleva a cabo comúnmente entre los fármacos que actualmente están en el mercado. Hay diversas metodologías que sugieren una pegilación por métodos químicos pero nunca por métodos físicos. En este trabajo se propone otra técnica la cual es por medio de reacciones ionizantes en donde se

ataca a la molécula de PEG para formar radicales libre por medio de una radiación a la molécula para que de esta manera el fármaco pueda unirse a ella.

II-3 RADIACIÓN Y PEGILACIÓN POR MÉTODO FÍSICO

La irradiación de polímeros con el objetivo de producir materiales avanzados, los cuales responden a distintos requerimientos, es un campo en permanente desarrollo. Por ejemplo, las irradiaciones utilizando radiación gamma o electrones de altas energías constituyen actualmente técnicas convencionales utilizadas a nivel comercial. No así es la aplicación de iones pesados con estos mismos fines ya que obtener y manipular haces de iones es más complejo y por lo tanto más costoso. A diferencia de las radiaciones gamma, que afectan el material como un todo, o la irradiación con un haz de electrones, los cuales penetran unos pocos milímetros de profundidad en la muestra con una dirección errática, los iones pesados depositan una altísima densidad de energía en un rango de sólo unos pocos micrones. Debido a este hecho se inducen cambios físico-químicos muy complejos en la superficie del material irradiado.

Tipos de radiación

La radiación se puede dividir en dos grupos.

1. Radiación de baja densidad de ionizante (baja transferencia de energía lineal (LET)) tales como los rayos x y rayos γ .
2. Radiación densamente ionizante (alta LET) producida por los iones pesados de alta energía.

Estos dos grupos se diferencian por la dosis suministrada y por la producción de diversos fenómenos físicos y químicos inducidos por la radiación.

II-3-1 Radiación escasamente ionizante

Este tipo de radiación es el más usado en el campo de radiación de los polímeros. Las muestras irradiadas son de gran espesor porque el rango de radiación utilizada es de algunos centímetros para rayos X y γ . La deposición de energía se produce de forma homogénea sobre todo el volumen de la muestra, esto hace que sea posible definir exactamente la dosis absorbida de la misma. Las reacciones químicas que se producen con este tipo de radiación han sido bien estudiadas, especialmente en términos de cambios físicos y químicos, ya que algunas de estas transformaciones se utilizan en aplicaciones industriales.

II-3-2 Cambios químicos producidos

Los cambios químicos causados por efecto de la radiación dependen en gran medida del peso molecular del polímero. Se observó que la energía depositada requiere para producir ionización primaria y de excitación (20-30 eV) es mucho mayor que la energía de enlace de muchas sustancias orgánicas simples (3-5 eV). Por ejemplo, hidrocarburos lineales las uniones C-H se rompen más frecuentemente que las uniones C-C, a pesar de baja energía de unión. Además los cambios físico químicos dependen también del lugar en la molécula donde ocurre la interacción.

Los cambios químicos más comunes en moléculas orgánicas irradiadas son:

- Desprendimiento de gas, donde el hidrógeno es el más importante porque es el más ligero.
- Creación de dobles enlaces.
- Corte de uniones C-C, para formar compuestos de menor peso molecular.
- Reacciones radical-radical para formar moléculas de mayor tamaño.

Estos mismos procesos se observan en la irradiación de polímeros. Por ejemplo, el desprendimiento de gas, la presencia de dobles enlaces y corte de cadenas. Este último efecto destruye el material, ya que al cortar las macromoléculas reduce su peso molecular y por lo tanto su resistencia mecánica. Además, la combinación de radicales que unen una cadena con otra, genera el fenómeno de reticulación, lo que

aumenta el peso molecular del material. Esta reticulación eleva el punto de fusión del polímero y hace que sea insoluble en los solventes que normalmente suelen atacarlo. Hay polímeros en los cuales la irradiación produce más cortes de cadena que entrecruzamiento y otros en los que ocurre lo contrario. Los polímeros en los cuales el mecanismo predominante es el corte de cadenas, son denominados como de revelado "positivo". Las zonas irradiadas se disuelven más rápidamente que las zonas no afectadas por la radiación. Mientras que los polímeros donde predomina el entrecruzamiento se denominan de revelado "negativo". En estos últimos las zonas irradiadas son menos solubles y son más resistentes al ataque químico del disolvente.

Los procesos mencionados en el párrafo anterior se producen si la irradiación se lleva a cabo en una atmósfera inerte. En presencia de oxígeno prevalece la degradación efecto oxidativo. Esto se puede resumir con las siguientes reacciones:

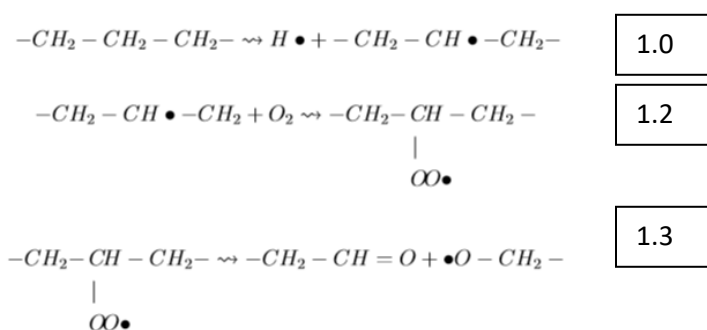


Figura 1. Cambios químicos en la molécula irradiada. El símbolo \bullet representa un radical libre

Los polímeros que tienden a realizar entrecruzamiento son irradiados en presencia de aire y puede producir cortes de cadena sin que se entrecrucen. El radical peróxido formado en la reacción (1.2) puede conducir a la aparición de peróxidos, que inician un proceso lento después de daño por irradiación. Estos peróxidos se pueden utilizar para producir copolímeros de injerto.

II-3-3 La alta densidad de ionización

Este es el campo de varios estudios específicos tales como la detección de partículas de alta energía (ya sea en el espacio o las producidas por un acelerador de partículas), la formación de agujeros micrométricos de tamaño controlado (membranas), micrografías y otros. El rango de esta radiación es muy pequeño y existe una gran dificultad para caracterizar los cambios químicos que ocurren en el material a causa de la pequeña porción de material afectado. La energía depositada en cada trayectoria es característica del tipo de ión y su energía. El radio efectivo de la traza afectada no está claramente definido por lo tanto no se puede hablar de una dosis absoluta depositada en términos de Grays sino de una dosis promedio. Es por ello que la magnitud relevante aquí, es la influencia del haz de iones. Una característica muy importante es que la dosis local real responsable de los cambios químicos y estructurales inducidas, son varios órdenes de magnitud más alta que la utilizada en las radiaciones convencionales.

II-3-4 Daños en los polímeros producidos por haces de iones

Los efectos producidos por la irradiación son una consecuencia de la transferencia de energía de los proyectiles al material. Si la energía T transferida a un núcleo atómico en una colisión nuclear es menor que su energía de ligadura E_b , éste comenzará a oscilar alrededor de su posición de equilibrio. Este movimiento se transfiere a los átomos vecinos en forma de fonones y finalmente se disipa como calor.

Si $T \approx E_b$, los átomos del material pueden ser removidos de su sitio original, pero retornarán luego mediante un proceso de difusión formando un radical, es decir, un átomo ligado excitado.

Para $T \gg E_b$ el átomo del blanco queda libre para moverse distancias mayores que en el caso anterior y puede colisionar con otros átomos, formando así una subcascada. Al aumentar T la probabilidad de que el átomo difunda y se recombine decrece, por lo tanto lo que se genera es un daño permanente (cortes de la cadena polimérica). En los polímeros E_b es del orden de 15 eV (un par de iones producido cada 30 eV).

La transferencia de energía a los electrones del medio genera una excitación o ionización de los átomos del blanco. Para energías transferidas bajas los electrones más externos, responsables de las uniones atómicas, se ven afectados, y para energías altas son los electrones internos los que puede ser excitados o expulsados (electrones Auger). Los detalles de los procesos de excitación electrónica en polímeros son muy complejos y están íntimamente relacionados con la estructura química del mismo. La naturaleza de los defectos formados en estos materiales debido a la radiación son completamente diferentes a los formados en metales, semiconductores y cristales iónicos.

II-3-5 Formación de trazas de materiales poliméricos

Se denominan *trazas iónicas* a las zonas de un material que como consecuencia del impacto del ion son perturbadas y sus efectos permanecen en el tiempo. Un ion es considerado rápido o veloz si su velocidad es mayor que la velocidad de Bohr (0,22 cm/ns). Aunque hay varios modelos que describen los mecanismos de formación de las trazas, aun no existe un consenso general con respecto a los detalles de dichos procesos. Sin embargo, hay acuerdo en que la pérdida de energía electrónica $Se = (dE/dx)_e$ juega un papel dominante, que la densidad de ionización debe ser muy elevada, y que la energía de excitación electrónica debe ser dispersada suficientemente despacio para que la traza se forme. La extensión radial de las trazas queda determinada por los electrones secundarios (rayos δ) creados por el paso del ion.

II-3-6 Estado de carga del proyectil

Estado de carga del proyectil La interacción entre el proyectil y el blanco depende de la velocidad del primero v_p , pues determina cómo se frena al atravesar el material. Un ion rápido pierde todos o casi todos sus electrones en los primeros nm de penetración, y conserva sólo aquellos cuya velocidad orbital es mayor que v_p .

Dependiendo de esta velocidad, el proyectil presenta una carga efectiva Z_{ef} dada por la relación empírica

$$Z_{ef} = \gamma Z_p$$

Donde:

$$\gamma^2 = 1 - \exp(-v_p / (v_0 Z_p^{2/3})) = 1 - \exp(-125 \beta / Z_p^{2/3})$$

Donde Z_p es la carga original del ion, v_0 la velocidad de Bohr, $\beta = v_p / c$ y c la velocidad de la luz. La energía del proyectil por nucleon [MeV/uma] se denomina energía específica. Los iones que tienen la misma energía específica tienen la misma velocidad. Generalmente el proyectil tiene una carga menor que la carga de equilibrio, luego de entrar en el blanco. Esto hace que se frene menos en los primeros pocos nm de su trayectoria, y por lo tanto que el daño en el material sea menor. Sin embargo no queda claro por qué las zonas de menor daño observadas en general se extienden más allá de lo esperado. Es posible que se deba a procesos de difusión dentro del polímero dañado.

Dentro de la conjugación de biomoléculas a polímeros ha sido muy estudiada y se ha demostrado que bioconjugación de metoxi-polietilenglicol (mPEG) con biomoléculas es una de las estrategias de elección. Esta estrategia se conoce con el nombre de pegilación. Al transcurrir los años, se han desarrollado una gran cantidad de biofármacos pegilados, algunos de los cuales han recibido la aprobación de las autoridades sanitarias, siendo rutinariamente empleados como agentes terapéuticos. En el presente trabajo se utiliza como medicamento el cisplatino ya que este medicamento es muy importante en el área clínica se utiliza comúnmente para tratar diversos tipos de cáncer.

II-4 CISPLATINO

II-4-1 BREVE HISTORIA DEL CISPLATINO

De los fármacos anticancerosos más utilizados hoy en día es el cisdiamminedichloroplatinum (II) o cisplatino, originalmente conocido como cloruro de Peyrone, se preparó por primera vez en 1844 por el químico italiano Michele Peyrone. Más tarde desempeñó un papel central en la obra ganadora del Premio Nobel del químico suizo Alfred Werner (1866-1919) sobre la isomería en complejos inorgánicos. La actividad citostática del cisplatino fue descrita por primera vez por Barnett (Barney) Rosenberg (1926-2009) y compañeros de trabajo en 1965, y progresó rápidamente hacia la clínica la incorporación del cisplatino a los liposomas parece que impide que el fármaco alcance eficazmente el lugar de acción imposibilitando que establezca los aductos DNA-platino. Barnett Rosenberg en la Universidad del Estado de Michigan descubrió que la electrólisis de electrodos de platino genera un complejo de platino soluble que inhibe la fisión binaria en las bacterias *Escherichia coli*. Aunque el crecimiento de la célula bacteriana continúa, la división celular fue tomada, las bacterias que crecen en forma de filamentos de hasta 300 veces su longitud normal. El complejo octaédrico Pt cis PtCl₄2, pero no el isómero *trans*, se encontró que era eficaz en forzar el crecimiento filamentos de las células de *E. coli*. El plano complejo Pt cuadrado, cis PtCl₂2 resultó ser aún más eficaz en forzar el crecimiento filamentos. Este hallazgo condujo a la observación de que cis PtCl₂2 era de hecho muy efectivo en la regresión de la masa de los sarcomas en ratas. La confirmación de este descubrimiento, y la extensión de las pruebas para otras líneas de células tumorales en marcha las aplicaciones medicinales de cisplatino. A partir de 1971, esta droga fue introducida en el tratamiento de varios tipos de neoplasias en el hombre, añadiéndose al arsenal quimioterapéutico y consiguiéndose un importante incremento de respuestas terapéuticas en gran variedad de tumores sólidos, con especial efectividad en neoplasias genitourinarias y de ovario. El cisplatino fue aprobado para su uso en el

cáncer de testículo y ovario en los EE.UU. por la Food and Drug Administration, el 19 de diciembre de 1978.

II-4-2 CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

El cisplatino es un complejo hidrosoluble, con un núcleo cuadrado que contiene dos átomos de cloro y dos grupos amino en posición *cis*. Este une en forma bifuncional los anillos de los átomos de nitrógeno de las purinas y piridinas, perdiendo sus iones cloro y siendo reemplazados por la base subligante; este puente de unión y la formación de puentes reversibles en el DNA es similar a la acción de los agentes alquilantes bifuncionales. Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de DNA y, en menor grado, la de RNA y proteínas.

Es un polvo amarillo cristalino, ligeramente soluble en agua, escasamente soluble en dimetilformamida y prácticamente insoluble en alcohol. Sus soluciones acuosas presentan un alto grado de inestabilidad con rápida degradación del complejo. El rango de pH de las soluciones es entre 3.5 y 6.5.

Se encontró que la descomposición es primordialmente debida a la formación reversible de *cis*-diaminoacuocloroplatino, con la extensión de dependiente que es la descomposición en el fármaco de la concentración del ion cloruro.

El cisplatino es estable en una disolución de NaCl 0,9 % a 25 °C, durante al menos 24 h. Sin embargo, en disolución acuosa, se hidroliza fácilmente (**Figura 2**), estableciéndose un equilibrio entre aproximadamente el 30 % del cisplatino inicial y los productos $\text{cis-[PtCl(H}_2\text{O)(NH}_3\text{)}_2\text{]}^+$ (monoacuo cisplatino), $\text{cis-[Pt(H}_2\text{O)}_2\text{(NH}_3\text{)}_2\text{]}^{2+}$ (diacuo cisplatino) y los complejos hidroxilo $\text{cis-[PtCl(OH)(NH}_3\text{)}_2\text{]}$ ($\text{pK}_a = 6,56$), $\text{cis-[Pt(OH)}_2\text{(NH}_3\text{)}_2\text{]}$ ($\text{pK}_a = 7,3$) y $\text{cis[Pt(OH)(H}_2\text{O)(NH}_3\text{)}_2\text{]}^+$ ($\text{pK}_a = 5,6$).

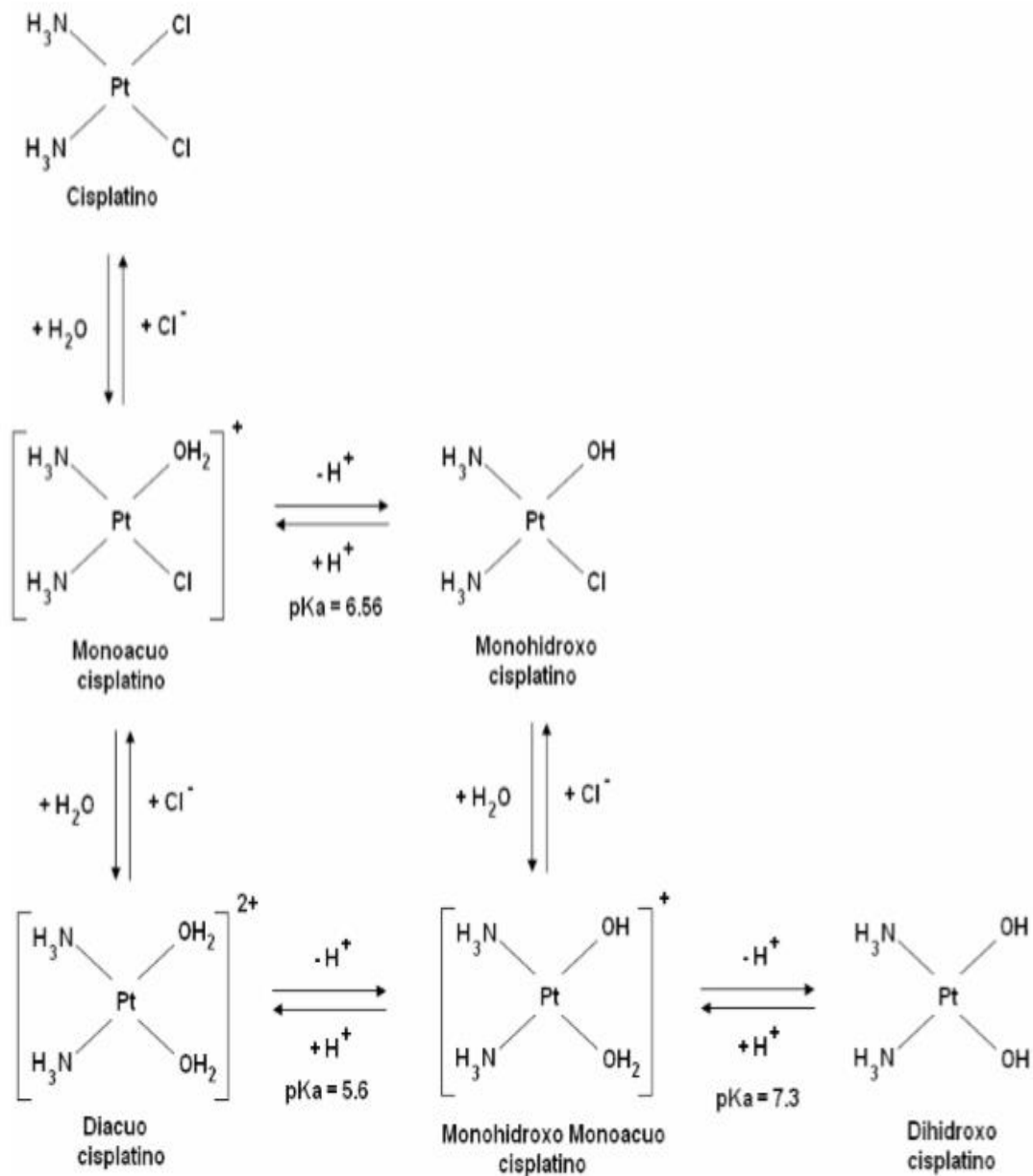


Figura 2. Mecanismo de hidrolisis del cisplatino

El cisplatino está indicado para el tratamiento paliativo en tumores testiculares y de ovario metastásicos, cáncer de mama, cáncer avanzado de vejiga y carcinoma de células escamosas de cabeza, cuello. Puede utilizarse en monoterapia o en asociación con otros agentes citostáticos en gran variedad de esquemas posológicos y combinación con otros fármacos según los diversos tipos de tumores. Entre las combinaciones quimioterapéuticas con otro antineoplásico las más

frecuentes son con ciclofosfamida, bleomicina, doxorubicina o vinblastina. En otros tumores como los del área de cabeza y cuello, esófago, osteosarcoma, cáncer microcítico y no microcítico de pulmón se han logrado significativos avances.

El producto terminado aparece como oficial en la BP 2010 como solución estéril en vehículo acuoso, así como en la USP en forma de liofilizado.

II-4-3 MECANISMO DE ACCIÓN DEL CISPLATINO

El cis- diaminodicloroplatino(II) o cisplatino es un fármaco capaz de dañar al ADN, formando aductos que incluyen entrecruzamientos entre proteínas del ADN, monoaductos y entrecruzamientos inter e intracatenarios. Estos aductos inhiben las ADN y ARN polimerasas, interfieren con la división celular y la muerte celular programada.

La reactividad del cisplatino está influenciada por la concentración de cloruros al interior y exterior de la célula. Al exterior de la célula hay una concentración 100 mM y el cisplatino es relativamente menos reactivo; en contraste en el interior de la célula hay una concentración de 2 a 30 mM, elevando la actividad del cisplatino. El cisplatino se administra por vía intravenosa, una vez en la circulación sanguínea, una fracción se une a proteínas plasmáticas, principalmente por aquellas que poseen grupos tioles; el cisplatino que queda de manera libre se internaliza a la célula por medio de difusión pasiva. Ya dentro de la célula al haber una baja concentración de cloruros, uno de sus átomos de cloro es sustituido por una molécula de agua formando el catión $[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+}$, esta especie diaquo, es muy reactiva hacia los centros nucleofílicos de biomoléculas por ejemplo las purinas del ADN, debido a que el H_2O es mejor grupo saliente que el Cl^- (**figura 3**). El sitio de interacción para la unión de cisplatino al ADN corresponde a dos bases guaninas adyacentes en la posición N7 del anillo imidazolio (Gómez-Ruiz et al., 2012), debido a su gran nucleofilia. El cisplatino se une entre ambas hélices de la cadena del ADN, formando aductos Adenina-Guanina o Guanina-Guanina. Estas uniones hacen que

la cadena de ADN se distorsione, siendo reconocida dicha distorsión por una o más proteínas unidas a la cadena de ADN. Estas proteínas son las encargadas de iniciar la reparación del ADN dañado o causar la muerte celular (apóptosis).

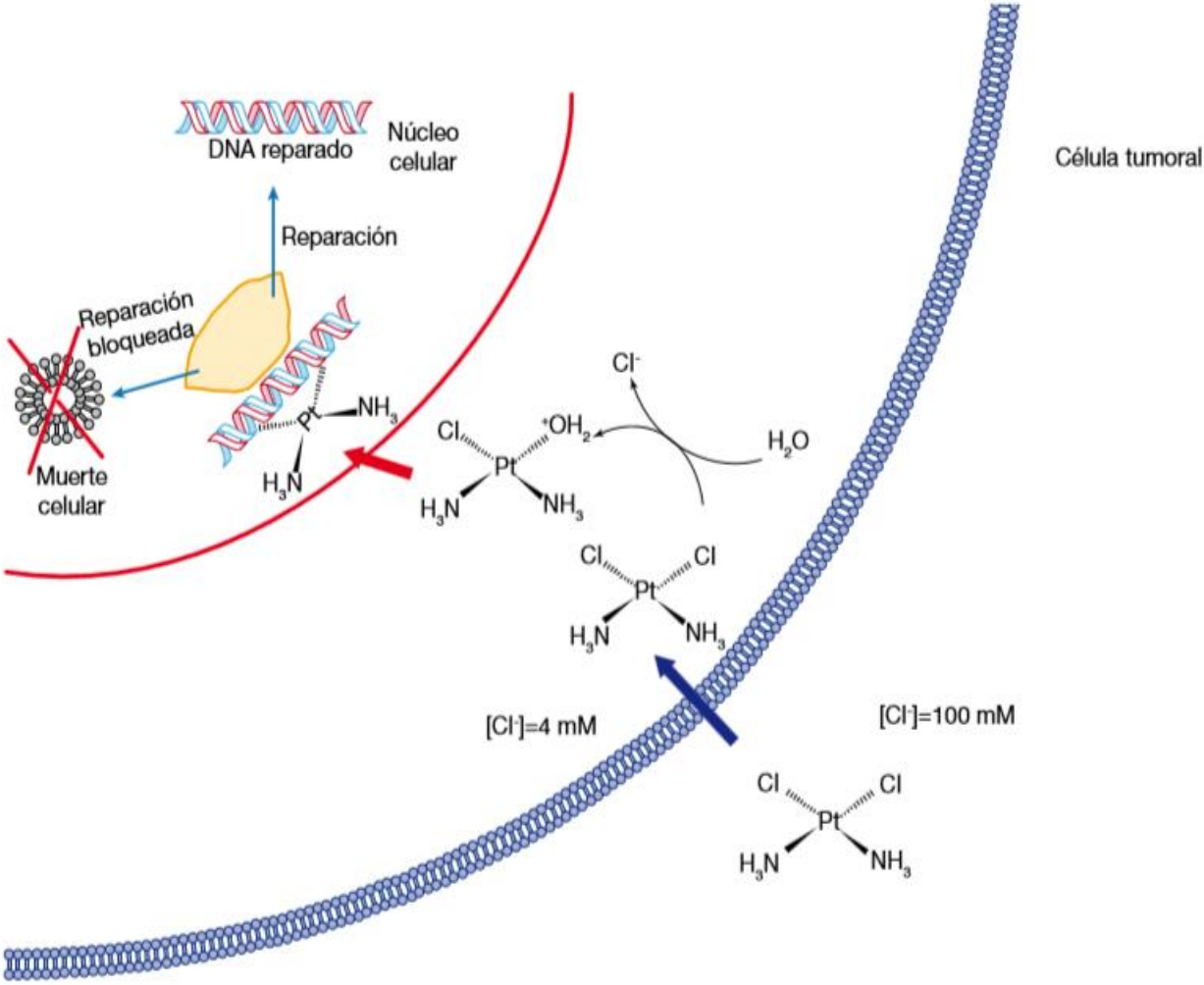


Figura 3. Mecanismo de acción del Cisplatino

II-4-4 POSOLOGIA Y ELIMINACIÓN

La administración de cisplatino está indicada en tumores metastásicos de testículo y ovario, cáncer avanzado de vejiga, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, en carcinoma de pulmón (microcítico y no microcítico) y mama. Entre las pautas posológicas de cisplatino más empleadas en monoterapia está la administración intravenosa de 50-100 mg/m² cada 3 semanas en perfusión de 2 a 7 horas de duración. Las pautas posológicas empleadas en combinación con otros agentes varían según protocolo y oscilan entre 75-100 mg/m² cada 3 o 4 semanas. En el caso de tumor testicular metastásico, el esquema habitual de cisplatino en combinación con otros antineoplásicos es de 20 mg/m² en perfusión intravenosa de 30 minutos cada 24 h durante 5 días consecutivos. Este esquema se repite cada 3 semanas durante un mínimo de 3 ciclos.

A las dosis habitualmente empleadas en clínica, las mayores concentraciones de platino se alcanzan en hígado, próstata y riñón, son algo menores en vejiga, músculo, testículo, páncreas y bazo, y las concentraciones más bajas se alcanzan en intestino, cápsulas suprarrenales, corazón, pulmón, cerebro y cerebelo. Por tanto, cisplatino presenta un elevado volumen de distribución que en estado de equilibrio estacionario es aproximadamente 63,7 L. El volumen de distribución determinado en compartimento central oscila alrededor de 20 L, con una variabilidad interindividual cercana al 50%. Tras la administración intravenosa, las concentraciones plasmáticas disminuyen de forma biexponencial como consecuencia de su amplia distribución a tejidos y de su excreción renal. Su semivida en la fase rápida de disposición (fase alfa) es de 10-40 minutos y se estima que el aclaramiento renal está alrededor de 0,7 L/h, con una variabilidad interindividual que varía entre el 16 y el 54%. No obstante, cisplatino se une a diversas proteínas (glutación y albúmina), aminoácidos (metionina y cisteína) y nucleótidos formando complejos de peso molecular superior a 50 KDa. La unión a proteínas es >90% y la fase de eliminación beta es prolongada. De hecho, tan solo entre el 27 y el 45% de la dosis administrada se elimina en un período de 84 a 120

hora. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que pacientes tratados con una dosis estándar de cisplatino presentan concentraciones detectables en plasma y tejidos años después de su administración. Cisplatino también es excretado en una pequeña proporción en la bilis y en saliva.

II-4-5 REACCIONES ADVERSAS

Nefrotoxicidad: la insuficiencia renal dosis-dependiente y acumulativa es la principal toxicidad limitante de dosis. Se ha observado toxicidad renal en el 28-36 % de los pacientes tratados con una dosis única de 50 mg/m^2 . Los primeros signos aparecen durante la segunda semana tras la administración de la dosis, y se manifiestan por elevaciones en el BUN y creatinina, ácido úrico sérico y/o disminución del aclaramiento de creatinina. La toxicidad renal se hace más prolongada y grave tras la repetición de ciclos de tratamiento. Antes de iniciar un nuevo tratamiento con CISPLATINO deberá comprobarse que la función renal se ha normalizado.

La alteración de la función renal se asocia con la lesión del túbulo renal. La perfusión de cisplatino de 6 a 8 horas, por hiperhidratación intravenosa y manitol, puede reducir la nefrotoxicidad. No obstante, puede aparecer nefrotoxicidad aún después de utilizar estos procedimientos.

Ototoxicidad: se ha observado ototoxicidad en hasta el 31% de los pacientes tratados con una dosis única de 50 mg/m^2 de cisplatino, que se manifiesta por tinnitus y/o pérdida de audición en las frecuencias altas (4.000 a 8.000 Hz). Ocasionalmente puede aparecer disminución auditiva en los tonos normales de conversación. Los efectos ototóxicos pueden ser más graves en niños tratados con cisplatino. La pérdida auditiva puede ser unilateral o bilateral, y tiende a ser más frecuente y grave con la repetición de las dosis. Sin embargo, en raras ocasiones tras la dosis inicial de cisplatino se ha descrito sordera. La ototoxicidad puede potenciarse por irradiación craneal previa o simultánea y puede estar relacionada

con la concentración plasmática máxima de cisplatino. No está claro si la ototoxicidad inducida por cisplatino es reversible. Deben realizarse pruebas audiométricas antes y durante el tratamiento. También se ha descrito toxicidad vestibular.

Hematológicas: el 25-30% de los pacientes tratados con cisplatino presenta mielosupresión. Los nadires de plaquetas y leucocitos circulantes se presentan entre los días 18 y 23 (intervalo de 7,5 a 45), recuperándose la mayoría de los pacientes alrededor del día 39 (intervalo de 13 a 62). La leucopenia y trombocitopenia son más acusadas a dosis más elevadas ($> 50 \text{ mg/m}^2$). La anemia (descenso de 2 g hemoglobina/100 ml) aparece con la misma frecuencia y al mismo tiempo que la leucopenia y trombocitopenia. Cisplatino tiene un efecto sensibilizante sobre los eritrocitos, produciendo en ocasiones, un resultado positivo en el test de Coombs directo de anemia hemolítica. No se ha establecido la incidencia, gravedad e importancia relativa de este efecto, en relación con otras toxicidades hematológicas, pero debe considerarse la posibilidad de un proceso hemolítico en cualquier paciente en tratamiento con cisplatino y que haya presentado un descenso inexplicable de hemoglobina. Los procesos hemolíticos revierten con la interrupción de la terapia. En raras ocasiones se ha descrito el desarrollo de leucemia aguda coincidiendo con el uso de cisplatino. En estos casos, cisplatino estaba siendo administrado en combinación con otros agentes leucemógenos.

Gastrointestinales: en la mayoría de los pacientes tratados con cisplatino se producen vómitos y náuseas intensos, siendo ocasionalmente tan graves que precisen discontinuar el tratamiento. Las náuseas y vómitos se manifiestan, habitualmente, dentro de las 4 horas siguientes al inicio del tratamiento con una duración de hasta 24 horas. Vómitos, náuseas y/o anorexia de diferente intensidad, pueden mantenerse hasta una semana después de iniciado el tratamiento. La aparición de náuseas y vómitos tardíos (comienzo o mantenimiento durante 24 horas o más después de la quimioterapia) se ha observado en pacientes que habían

alcanzado el control emético total el día de la administración de la terapia con cisplatino. También se ha descrito la aparición de diarrea.

Alteraciones de los electrolitos séricos: se ha comunicado la aparición de hipomagnesemia, hipocalcemia, hiponatremia, hipopotasemia e hipofosfatemia en pacientes tratados con cisplatino y que están posiblemente relacionados con la lesión de los túbulos renales. En ocasiones se han descrito casos de tetania en aquellos pacientes con hipocalcemia e hipomagnesemia. Generalmente, los niveles normales de electrolitos séricos, se recuperan con la administración suplementaria de electrolitos y tras la interrupción del tratamiento con cisplatino. También se ha descrito el Síndrome de secreción inadecuada de la hormona antidiurética.

Hiperuricemia: se ha descrito hiperuricemia con una frecuencia similar al aumento de BUN y creatinina sérica. Es más acusada con dosis superiores a 50 mg/m² y los niveles máximos de ácido úrico aparecen generalmente entre los días 3-5 de la administración de la dosis. El tratamiento de la hiperuricemia con alopurinol resulta efectivo en la reducción de los niveles de ácido úrico.

Neurotoxicidad: Se ha observado en algunos pacientes neurotoxicidad, habitualmente caracterizada por neuropatías periféricas. Las neuropatías suelen aparecer tras tratamientos prolongados (4 a 7 meses); no obstante, se han descrito síntomas neurológicos tras una dosis única. Aunque los signos y síntomas normalmente se desarrollan a lo largo del tratamiento, raramente comienzan después de la última dosis de cisplatino. La neuropatía puede progresar después de la interrupción del tratamiento. También se han descrito el signo de Lhermitte, mielopatía de la columna dorsal y neuropatía autonómica. Si se observa algún síntoma, el tratamiento con cisplatino debe interrumpirse. Los datos preliminares indican que la neuropatía periférica podría ser irreversible en algunos pacientes. Asimismo, se han descrito calambres musculares de rápida aparición y corta duración. Se han observado en pacientes que habían recibido una dosis acumulada relativamente elevada de cisplatino, y en aquellos que presentaban neuropatía

periférica relativamente avanzada. También se han descrito pérdida del gusto y convulsiones.

Toxicidad ocular: en raras ocasiones se han comunicado neuritis óptica, papiledema y ceguera cerebral en pacientes que recibían las dosis recomendadas de cisplatino. Después de la interrupción del tratamiento con cisplatino se produce normalmente una mejoría y/o la recuperación total. Se han utilizado esteroides, con o sin manitol; sin embargo no se ha establecido su eficacia. Se han comunicado visión borrosa y alteración en la percepción de los colores en pacientes tratados con una intensidad de dosis superior a la recomendada. La alteración en la percepción de los colores se manifiesta como pérdida en la discriminación del color, particularmente en el rango azul-amarillo. En el examen de fondo de ojo, la única evidencia es una pigmentación irregular en la retina del área macular.

Reacciones anafilácticas: en ocasiones se han descrito reacciones anafilácticas en pacientes expuestos previamente a cisplatino. Las reacciones se manifestaron como edema facial, sibilancias, taquicardia e hipotensión a los pocos minutos de la administración del fármaco. Estas reacciones pueden controlarse por posibles reacciones anafilácticas, los pacientes que están recibiendo cisplatino de administración intravenosa de adrenalina, corticosteroides y antihistamínicos. Debido a las posibles reacciones anafilactoides, los pacientes que están recibiendo cisplatino deben ser cuidadosamente vigilados y deberá disponerse del material y medicación adecuados para tratar esta complicación. Hepáticas: a las dosis recomendadas de cisplatino pueden producirse elevaciones transitorias de los enzimas hepáticos y bilirrubina.

Otras toxicidades: en raras ocasiones se han comunicado toxicidades vasculares, que coinciden con el uso de cisplatino en combinación con otros agentes antineoplásicos. Los eventos son clínicamente heterogéneos y pueden incluir infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, microangiopatía trombótica (síndrome hemolítico urémico) o arteritis cerebral. Se han propuesto varios mecanismos para

estas complicaciones vasculares. También se han comunicado casos de fenómeno de Raynaud en pacientes tratados con la combinación de bleomicina, vinblastina con o sin cisplatino. Se ha sugerido que el desarrollo de hipomagnesemia, que coincide con la utilización de cisplatino, puede ser un factor añadido, aunque no esencial, a este evento. Sin embargo, se desconoce si la causa del fenómeno de Raynaud en estos casos es la propia enfermedad, un compromiso vascular subyacente, la bleomicina, la vinblastina, la hipomagnesemia, o la combinación de alguno de estos factores.

En raras ocasiones se han comunicado anomalías cardíacas, hipo, elevaciones de la amilasa sérica y rash. También se ha descrito alopecia. En raras ocasiones se ha descrito toxicidad local en tejidos blandos como consecuencia de la extravasación de cisplatino. La infiltración de soluciones de cisplatino puede producir celulitis, fibrosis y necrosis tisular

El aclaramiento del cisplatino pegilado liposomal (medido como platino total en plasma) es unas 100 veces inferior al del cisplatino tradicional y se ha observado que el número de aductos DNA-platino en las células tumorales es entre 10 y 100 veces menor que cuando el cisplatino se administra en forma no liposomal. Estos datos hicieron que no progresara el desarrollo clínico de esta preparación (Blower P, 2005)

CAPITULO III METODOLOGÍA

III-1 MATERIALES Y MÉTODOS

III-1-1 REACTIVOS

Fármaco Cisplatino en polvo, adquirido de Sigma- Aldrich Chemistry, Inc, USA. Metoxi-Polietilenglicol (mPEG) de tamaño 400 Daltons adquirido de Sigma- Aldrich Chemistry, Inc, USA, Cloruro cianúrico adquirido de Sigma- Aldrich Chemistry, Inc, USA. Todos los demás reactivos químicos fueron de grado analítico para análisis.

III-1-2 EQUIPOS

Equipo de dispersión de luz dinámica (Brookhaven 90 Plus), espectrómetro de mediano y cercano infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) Bruker Vector 33, con los accesorios de Reflectancia Difusa (RD) y Reflectancia Total Atenuada (RTA) y Equipo de reactor nuclear gammacell 200 utilizando como radiación gamma cobalto 60.

III-1-3 METODOLOGÍA

III-1-3-1 Pegilación Química

Se realizó la estandarización de la reacción del fármaco para pegilar por método químico, haciendo reaccionar metoxipolietilenglicol en un tubo de ensaye y agregando la solución molar del Fármaco a pegilar, esto para llevarse a cabo un ataque nucleofílico a la molécula del cisplatino y de esta manera poderse unir en los extremos de los grupos amino de la molécula (figura 2). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en un rotador para tubos de ensaye en un tiempo de 3 horas y después se dejó en reposo aproximadamente 20 minutos para proceder al ultracongelamiento. Después de llevar a cabo el ultracongelamiento procedió su

concentración por medio de una liofilización para cada muestra obtenida (**figura 5**). Como paso final se procedió a su caracterización por medio de la técnica dispersión de luz dinámica para comparar los tamaños de cada muestra obtenida en la reacción y los que no fueron modificados, también se hizo un análisis en los grupos funcionales de la estructura molecular del cisplatino por medio de Infrarrojo (IR).

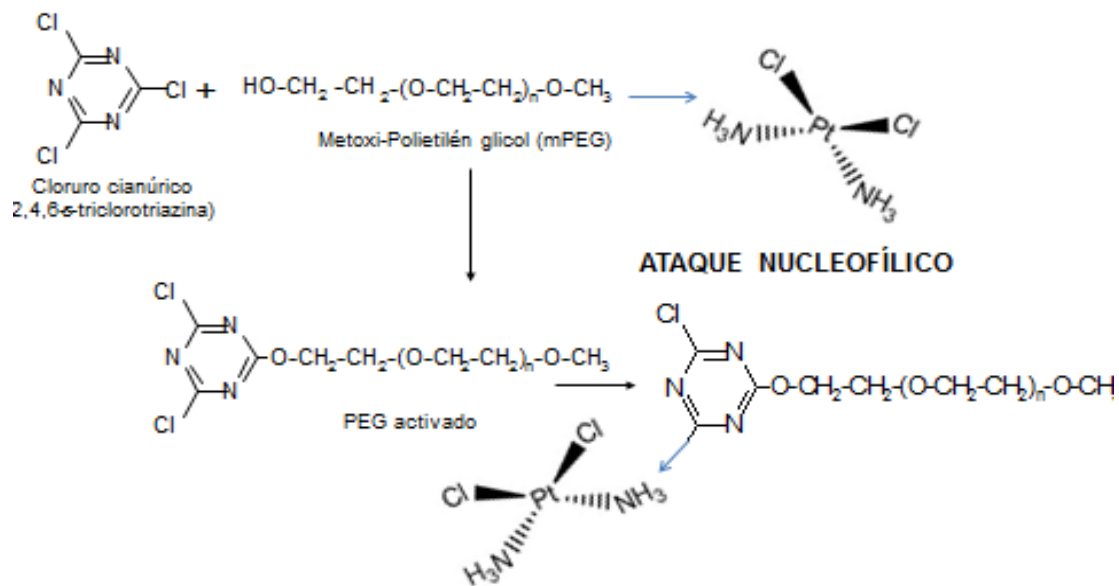


Figura 4. Ataque nucleofílico de polietilenglicol activado con cloruro cianúrico hacia el cisplatino

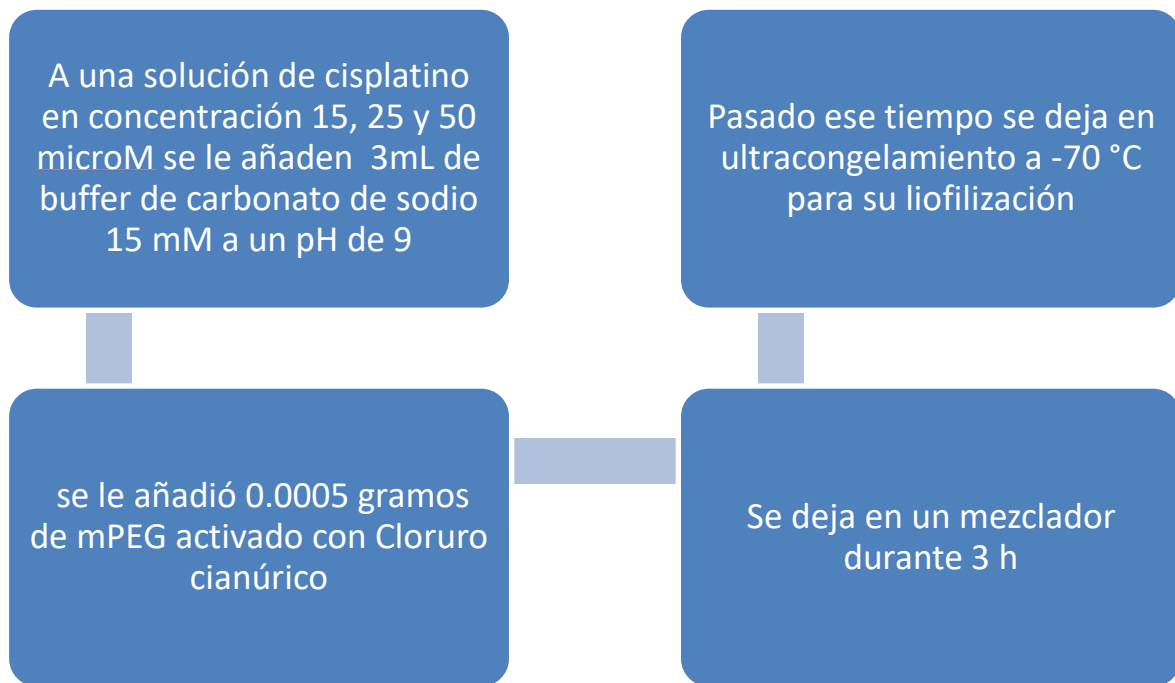


Figura 5. Esquema de la pegilación de metoxipolietilenglicol activado con cloruro cianúrico

III-1-3-2 Pegilación Física (Reacciones Ionizantes)

La pegilación del medicamento se realiza utilizando un reactor nuclear gammacell 200 con radiación gamma cobalto 60. Se realiza la irradiación con un haz de electrones, que penetran a pocos milímetros con una dirección específica a concentraciones de cisplatino 15, 25 y 50 μM . Los iones pesados depositarán una alta densidad de energía. Estas perturbaciones de iones a 10 eV inducidos cortarán dichas cadenas (escisión), producirán la unión entre las cadenas poliméricas (reticulación) con el medicamento. Este proceso de pegilación propuesto por la forma física se lleva a cabo en un reactor nuclear gammacell 200 utilizando como radiación gamma Cobalto 60. El acoplamiento molecular del cisplatino con el polímero se llevó a cabo con proporciones estequiométricas en una solución con

buffer para mantener las mismas condiciones y con las mismas concentraciones con las que se realizaron el método Químico con una duración de 1 horas el producto fue una solución de color amarillenta y se dejó a temperatura ambiente para después proceder a la caracterización por dispersión de luz e IR.

Para la caracterización de ambos métodos de pegilación, se tomaron 0.001 gramos en un vial con 10 mL de agua destilada para su caracterización en DLS para el método Químico y 1mL para el método Físico.

Para la caracterización por IR se tomaron en estado sólido y se midieron en el espectro en un rango de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron las modificaciones de 3 diferentes concentraciones de cisplatino (15, 25 y 50 μM) por un método tradicional de forma química en donde se llevó a cabo hacer primero el acoplamiento de grupo metoxi al polietilenglicol y después la activación con cloruro cianúrico. Este proceso se realizó en un mezclador con buffer de carbonatos con una duración de 3 horas dejando reposar 20 minutos. Al terminar la reacción el producto se ultracongeló a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un dos días, al finalizar este proceso se procedió a una liofilización en donde el producto fue un polvo de color amarillento donde se encuentra el medicamento y el polímero acoplados y se conservó en refrigeración hasta su utilización para la caracterización en Dispersión de luz e IR. El proceso de pegilación propuesto por la forma física se lleva a cabo en un reactor nuclear gammacell 200 utilizando como radiación gamma cobalto 60. El acoplamiento molecular del cisplatino con el polímero se llevó a cabo con proporciones estequiométricas en una solución con buffer para mantener las mismas condiciones y con las mismas concentraciones que se realizaron por el método químico con una duración de una hora, el producto fue una solución color amarillenta y se dejó a temperatura ambiente para después proceder a la caracterización por dispersión de luz. Se tomó 0.001 gr en un vial con 10 mL de agua destilada para su caracterización por Dispersión de luz dinámica para el caso del método tradicional y 1 ml para el método físico.

Los histogramas representan el promedio de tamaño de partícula medida en Dispersión de Luz Dinámica (DLS) con un equipo marca Brookhaven modelo BI200SM con un correlador digital de alta velocidad PCI-BI9000AT que permite analizar muestras con un tamaño de partícula desde 5 nm hasta 2 micras. La fuente de luz del equipo de dispersión es un láser de He-Ne de 35 mW modelo 9167EB-1

marca Melles-Griot. Las muestras medidas se analizaron en un rango de 50 nm a 5000 nm. Los blancos medidos de cada una de las muestras no pegiladas tienen un tamaño de partícula similar de rango 200 a 238.34 nm mientras que en las diferentes concentraciones de cisplatino pegilado con peso molecular de 400 Daltons de polietilenglicol dan tamaños de partícula diferentes (**Figura 6**). Los espectros de infrarrojo (IR) se tomaron en estado sólido (pastillas de KBr) y se midieron en el espectrómetro de la casa Broker Tensor 27, en un rango de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} . Las bandas características del $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ están representadas con los picos de los grupos funcionales de las moléculas dependiendo de la excitación vibracional de los enlaces medidos en longitud de onda, el enlace representado por Pt-Cl con el número 4 y 5 (**figura 7**) dio una longitud de onda de 3500, 3230 cm^{-1} , para Pt-amina están en la zona de 700 cm^{-1} con el número 1, para C-N 1731 y 1667 (amina I y II) con número 8 y 3400 cm^{-1} para la amina secundaria unida el grupo Cl del cloruro cianúrico representadas con los números 7 y 8. En la **figura 7** (B y C) los picos que representan el acoplamiento de las pegilaciones están representadas con el número 7 y 8. Las muestras pegiladas por el método químico el cual es el método tradicional de modificación en las moléculas tienen tamaños menores al nuevo método medido en dispersión de luz propuesto que con este método se puede pensar que el número de moléculas modificadas es mayor al método tradicional esto es porque la energía de ionización se mantiene constante al abrir cadenas de polietilenglicol y al abrir el enlace de los grupos aminos del cisplatino mientras que en el método tradicional se necesita 5 veces exceso de mPEG en grupos amino para que se lleve a cabo un gran número de moléculas de cisplatino pegilado y esto hace que incremente el impedimento estérico de tal manera que moléculas de cisplatino quedan sin pegilar.

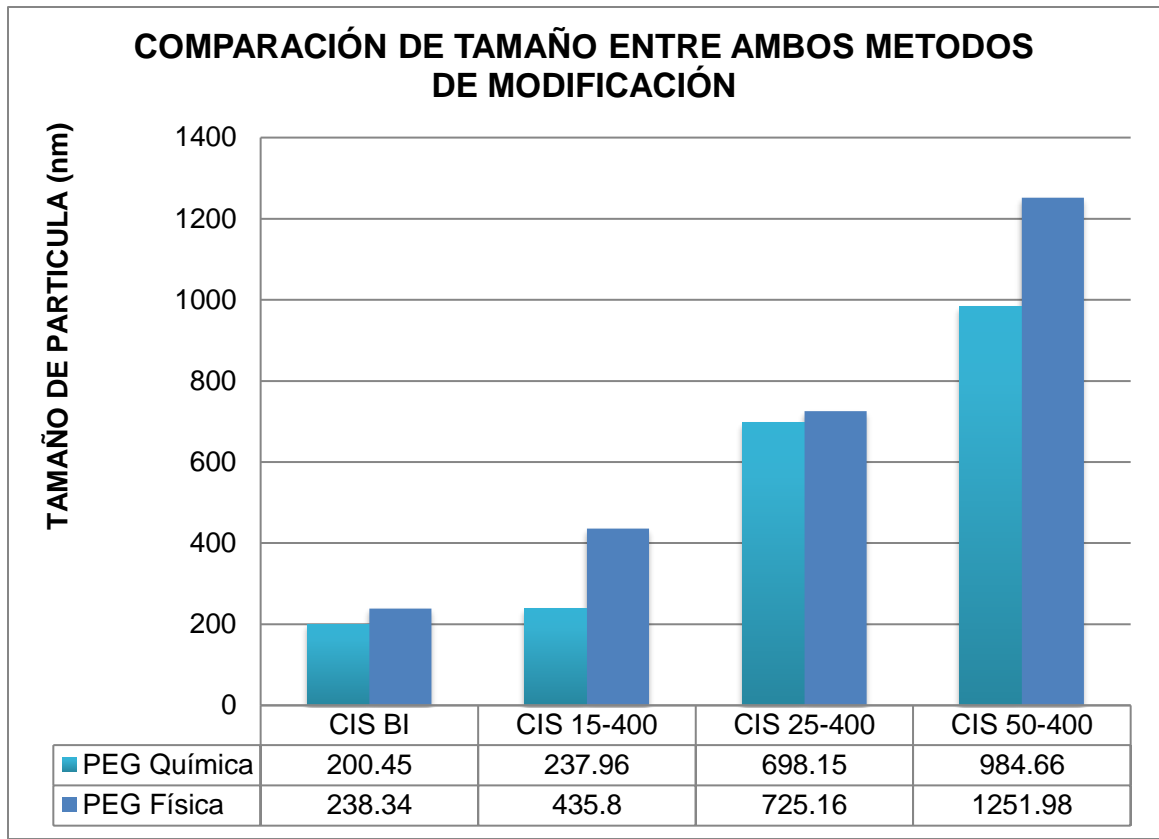


Figura 6. Gráfica comparativa por concentración de muestras modificadas química y físicamente con mPEG 400.

La grafica representada en la **figura 6** muestra los tamaños en comparación con los dos métodos de modificación la primera químicamente y la segunda físicamente. CIS BI es la muestra de cisplatino blanco pegilado tradicional e irradiada con tamaño de partícula 200.45 nm y 238.34 respectivamente, CIS 15-400 es la muestra pegilada por ambos métodos de modificación de cisplatino de concentración 15 μM con tamaños de partícula de 237.96 y 435.8, CIS 25-400 es la muestra pegilada de cisplatino de concentración 25 μM con tamaño de partícula de 698.15 y 725.16, por último CIS 50-400 es la muestra pegilada por ambos métodos de modificación de cisplatino con concentración de 50 μM con tamaño de partícula de 984.66 y 1251.98

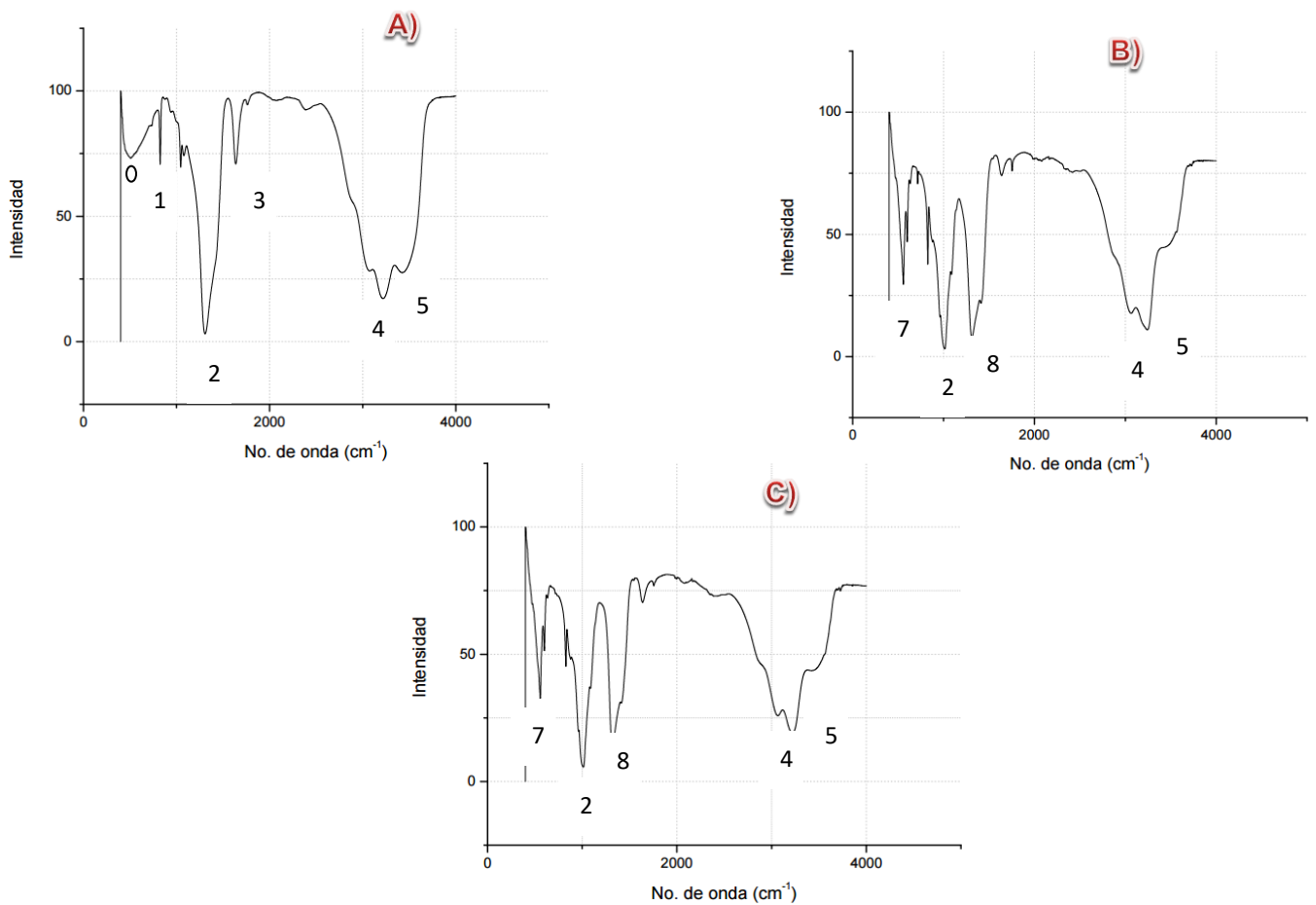


Figura 7. Espectro de FTIR del polietilenglicol y cis-[Pt (NH₃)₂Cl₂ Pegilado. El espectro A) representa el blanco de Cisplatino, B) representa el espectro de la modificación química y C) representa el espectro de la modificación Física.

CAPITULO V CONCLUSIONES

En los últimos años se ha incrementado considerablemente el uso de biofármacos para el tratamiento de diferentes enfermedades. Sin embargo, éstos pueden poseer una serie de desventajas, entre las cuales pueden mencionarse su corta vida media, la posibilidad de reconocimiento y ataque por parte del sistema inmune y la digestión proteolítica. Esto hace que sea necesaria una administración frecuente para alcanzar el efecto terapéutico deseado de manera sostenida. Con el propósito de superar estas limitaciones, se ha propuesto un técnica innovadora para el acoplamiento de un polímero biocompatible a un fármaco usado comúnmente para el tratamiento contra diversos tipos de cáncer (Cisplatino) usando dos métodos de modificación estructural al fármaco, el primero método y que es el más usado en la actualidad es haciendo reaccionar químicamente el polímero con el fármaco. La otra técnica propuesta es por medio de un método físico llevado a cabo por reacciones ionizantes acoplando el fármaco con el polímero. Dentro de la conjugación de biomoléculas a polímeros ha sido muy estudiada y se ha demostrado que bioconjugación de metoxi-polietilenglicol (mPEG) con biomoléculas es una de las estrategias de elección. Esta estrategia se conoce con el nombre de pegilación. Al transcurrir los años, se han desarrollado una gran cantidad de biofármacos pegilados, algunos de los cuales han recibido la aprobación de las autoridades sanitarias, siendo rutinariamente empleados como agentes terapéuticos.

Todas las metodologías informadas son complejas y emplean reactivos tóxicos y peligrosos. En el presente trabajo de tesis desarrollamos un innovador proceso de síntesis para la conjugación de PEG-cisplatino por reacciones ionizantes que se comparan con el mPEG-cisplatino pegilado tradicionalmente. Para el caso de PEG-cisplatino por reacciones ionizantes, se utiliza el bombardeo al fármaco con rayos gamma en un reactor nuclear. Para el caso de mPEG-cisplatino pegilado

tradicionalmente se utiliza el polímero activado con cloruro cianúrico de manera sencilla haciéndolo reaccionar con el fármaco teniendo como parámetros el tiempo de reacción y añadiendo 5 veces exceso del polímero al fármaco.

En este trabajo se desarrolló una modificación física y química a 3 diferentes concentraciones del cisplatino con polietilenglicol (PEG) con un peso de 400 Da dando como resultados un mayor peso molecular de la conjugación PEG-fármaco con un incremento de tamaño de partícula del medicamento llevado a cabo por una caracterización que mide el tamaño de partícula, Dispersión de luz dinámica (DLS) el cual se obtuvo un histogramas donde muestra el promedio de los diferentes tamaños de partícula para cada concentración representada en la **figura 6** que incluyen los blancos para cisplatino y la comparación entre ambos métodos de modificación de las diferentes concentraciones. **La figura 7** muestra el espectro de Infrarrojo obteniendo picos característicos del acoplamiento del fármaco-polímero en donde se puede observar que no interfiere estas modificaciones en los grupos cloro, ya que si existieran estas modificaciones en esos sitios el medicamento no podría realizar su función terapéutica. Al ser pegilado el cisplatino el tamaño de partícula aumenta y las medidas promedio por dispersión de luz nos dan como resultado el incremento del tamaño de partícula del cisplatino en comparación al fármaco sin pegilar. Esto conlleva a que las moléculas del Fármaco podrían incrementar el tiempo de vida media ya que al aumentar su radio hidrodinámico aumentara la vida media del medicamento y por ende tardara más tiempo en aclararse. El medicamento PEGilado es escindible lo cual no afecta el sitio blanco para realizar su función terapéutica.

CAPITULO VI BIBLIOGRAFÍA

ABUCHOWSKI, Abraham, et al. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 1977, vol. 252, no 11, p. 3582-3586.

Alcaide F, Pfyffer GE, Telenti A. 2007. Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 41: 2270–2273.

Alfonso Domínguez-Gil Hurlé. Farmacocinética de los medicamentos obtenidos por biotecnología. 9a edición del curso de Biotecnología Aplicada a la Salud Humana.

BARKAS, H. Nuclear Research Emulsions Vol. 1, Cap. 9, p. 371, Academic Press, New York, 1963.

BARRIO MERINO, A.; SORIA LÓPEZ, M.; TOMÉ NESTAL, C. Tratamiento del estreñimiento funcional con polietilenglicol: Nuevos fármacos. *Pediatría Atención Primaria*, 2010, vol. 12, no 45, p. 109-121.

Bauer C. G., Kuehn A., Gajovic N., Skorobogatko O., Holt P. J., Bruce N. C., Makower A., Lowe C. R. y Scheller F. W. (1999) New enzyme sensor form morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Journal of Analytical Chemistry*. 364: 179-183.

Beauchap C. (1983) A new procedure for synthesis of polyethylene glycol-protein: adducts, effects on function, receptor recognition and clearance of super oxide dismutase, lactoferrin y α -macroglobulin. *Analytical Biochemistry*. 131: 25-31.

Belanger A, Besra GS, Ford ME, Mikusova K, Belisle JT, Brennan PJ, et al. 2014. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:11919–24.

Beldarraín A. (2001) Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido al estudio de la estabilidad de las proteínas. *Biotecnología Aplicada*. 18: 10-16.

Bell G., Janssen A. E. M. y Halling P. J. (1997) Water activity fails to predict critical hydration level for enzymes activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities. *Enzyme and Microbial Technology*. 20: 471-477.

Blackstock, W. & Weir, M. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*. 17, 121–127 (1999)

Blower P, de Wit R, Goodin S, Aapro M. Drug-drug interactions in oncology: Why are they important and can they be minimized?. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2005; 55:117-142.

CHAPIRO, A. Chemical modifications in irradiated polymers. *Nucl. Inst. Meth. B* (1988); 32: 111-14.

CHAPIRO, A. General consideration of the radiation chemistry of polymers. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 1995, vol. 105, no 1, p. 5-7.

COHEN, Smadar, et al. Controlled delivery systems for proteins based on poly (lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharmaceutical research*, 1991, vol. 8, no 6, p. 713-720.

Colman, A. Dolly, Polly and other 'ollys': Likely impact of cloning technology on biomedical uses of livestock. *Genet. Anal. Biomol. Eng*. 15, 167–173 (1999).

David H. 1970 Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol.*;20:810–14.

Dyer, M. et al. Functional genomics: from genes to new therapies. *Drug Disc. Today* 4, 109–114 (1999).

GARCIA-QUETGLAS, Emilio. PK/PD y desarrollo de nuevas formulaciones en el campo de los antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap*, 2005, vol. 18, no 1, p. 65-69.

Giralt, E., Palomera, F. A., & Jiménez, J. C. (2004). Péptidos y la industria farmacéutica. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (No. 1, pp. 10-16). Real Sociedad Española de Química.

HENRY, Investigación Nuclear Emulsiones, Academic Press, Nueva York, 1963. Vol. 1, Cap. 9, p. 371

LYCZAK, J. B.; MORRISON, S. L. Biological and pharmacokinetic properties of a novel immunoglobulin-CD4 fusion protein. *Archives of virology*, 1994, vol. 139, no 1-2, p. 189-196.

MATEO, Cristina, et al. Removal of amphipathic epitopes from genetically engineered antibodies: production of modified immunoglobulins with reduced immunogenicity. *Hybridoma*, 2000, vol. 19, no 6, p. 463-471.

MAYOLO-DELOISA, K. P.; RITO-PALOMARES, M. Proteínas PEGiladas: producción, purificación y aplicaciones. *Revista mexicana de ingeniería química*, 2010, vol. 9, no 1, p. 17-27.

Mensa J, Gatell JMa , Azanza JR, Dominguez-Gil A, Garcia JE, Jiménez de Anta, Ma T, et al. 2007. Guía de terapéutica antimicrobiana, 17 ed. Barcelona: Elsevier Masson;

MILTON,ZalipskyS,editors. Poly(ethylene glycol): chemistry and biological applications.San Francisco (CA): American **Chemical** Society, 1997: 1–15

MORAR, A.S., Schrimsher, J.L. y Chavez, M.D. PEGylation of proteins: A structural approach. *BioPharm International*, 2006. Vol. 19, no 4, p. 34-49

Rohricht, P. Transgenic protein production: process economics. *Biopharm*, September (1999), pp. 52–54. 7.

Rohricht, P. Transgenic protein production; the technology and major players. *Biopharm*, March (1999), pp. 46–49. 6.

SYED, Summer, et al. Potent antithrombin activity and delayed clearance from the circulation characterize recombinant hirudin genetically fused to albumin. *Blood*, 1997, vol. 89, no 9, p. 3243-3252.

VALLET-REGÍ, María. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Transactions*, 2006, no 44, p. 5211-5220.

Walsh, G. (2000). Biopharmaceutical benchmarks. *Nature biotechnology*, 18(8), 831.

Wang, J. & Hewick, R. Proteomics in drug discovery. *Drug Disc. Today* 4, 129–133 (1999).

Zweiger, G. Knowledge based discovery in gene expression microarray data; mining the information output of the genome. *Trends Biotechnol.* 17, 429–436 (1999).