



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

**CONJUGACIÓN DE FÁRMACOS
ANTITUMORALES A SISTEMAS
MACROMOLECULARES
BASADOS EN
POLISACÁRIDOS**

Claudia Rodríguez Villamor



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Farmacia

**CONJUGACIÓN DE FÁRMACOS ANTITUMORALES A
SISTEMAS MACROMOLECULARES BASADOS EN
POLISACÁRIDOS**

Tutores: D. Juan Antonio Galbis Pérez y D^a Elsa Galbis Fuster

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Tipología del trabajo: REVISIÓN BIBLIOGRÁFIA

ÍNDICE	Pág.
Resumen	1
Palabras clave	1
1. Objetivos	2
2. Metodología	2
3. Introducción	3
4. Química de la conjugación polisacárido-fármaco	8
5. Conjugados de fármacos basados en polisacáridos	12
5.1 Conjugados de fármacos basados en Dextrano	12
5.2 Conjugados de fármacos basados en Quitita y Quitosano	17
5.3 Conjugados de fármacos basados en Ácido hialurónico	22
5.4 Conjugados de fármacos basados en Heparina	25
5.5 Conjugados de fármacos basados en Pululano	27
6. Conclusiones y perspectivas	29
7. Bibliografía	31

ÍNDICE DE SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracilo
6-MP	6-Mercaptopurina
Ara-C	1-β-D-Arabinofuranosilcitosina
ASGPs	Asialoglicoproteínas
BSA	Albúmina de suero bovino
CDDP	Cisplatino
CFA	Ácido fólico catiónico
CLSM	Microscopía confocal de barrido láser
CM	Carboximetil
CPT	Camptotecina
Cur	Curcumina
DA	Ácido desoxicólico
DCCI	<i>N,N'</i> -d ciclohexilcarbodiimida
DCM	Dicarboximetil
DEAE	Dietilaminoetanol
Dex	Dextrano
DMN	Daunomicina
DOX	Doxorubicina
ECM	Matriz extracelular
EPR	Aumento de la permeabilidad y retención
FGF	Factor de crecimiento
HA	Ácido hialurónico
LHRH	Hormona liberadora de gonadotropina
LMWC	Quitosano de bajo peso molecular
MMA	Metacrilato de metilo
MMC	Mitomicina C
MTX	Metotrexate
Ns	Nanosistemas
ONCOFID	Conjugados de fármacos basado en HA
PDCs	Conjugados polímero-fármaco
PEMs	Multicapas de polielectrolitos
PM	Peso molecular
PTX	Paclitaxel
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

RESUMEN:

Dado que el cáncer es la segunda causa de muerte más frecuente en el mundo actual, el desarrollo de estrategias de quimioterapia alternativas resulta de un interés especial para su tratamiento. Una de estas estrategias consiste en la conjugación de los fármacos antitumorales a portadores macromoleculares, para formar así profármacos basados en polímeros. Dichos polímeros terapéuticos se diseñan con la finalidad de aumentar la hidrosolubilidad de los fármacos, así como para mejorar su biodisponibilidad. Los polisacáridos resultan polímeros ideales para formar dichos conjugados al poseer una variedad de grupos funcionales que facilitan su conjugación química con los fármacos antitumorales.

El objetivo principal de estas terapias consiste en el direccionamiento específico del fármaco, aumentando de esta forma su eficacia terapéutica y disminuyendo los efectos secundarios asociados. Se debe tener en cuenta que la eficacia en este direccionamiento y por tanto el éxito de la terapia depende de varios factores, tales como el tipo de polímero, el tipo de enlace fármaco-polímero, el uso o no de espaciador entre fármaco y polímero y la presencia de un grupo de direccionamiento. La elección de un espaciador adecuado para la síntesis de estos conjugados puede resultar un paso crítico en el diseño de estos conjugados.

Entre los conjugados de fármacos basados en polisacáridos caben destacar los basados en:

- Dextrano: Se han descrito con éxito conjugados de Dextrano (Dex) con distintos fármacos, tales como Doxorubicina (DOX), Mitomicina C (MMC), Paclitaxel (PTX) y Cisplatino (CDDP), de forma que variando el espaciador, los ligandos o incluso la carga asociada al Dex suponen estrategias con características diferentes.
- Quitina y quitosano: Estos conjugados, además de solucionar problemas propios de ciertos medicamentos, han demostrado ser buenos portadores de fármacos.
- Ácido hialurónico: Su importancia radica principalmente en su afinidad e interacción con distintos receptores de la superficie celular.
- Heparina: Los conjugados se diseñan siempre intentando optimizar sus funciones fisiológicas y reducir su actividad anticoagulante.
- Pululano: Ofrece distintas alternativas de derivatización que le aportan diferentes propiedades químicas y biológicas.

PALABRAS CLAVE: polisacáridos; conjugados macromoleculares; sistemas de liberación controlada; quimioterapia del cáncer; profármacos antitumorales.

1. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo consiste en realizar una revisión bibliográfica que pretende ofrecer una idea general de los principales polisacáridos usados en la conjugación de fármacos antitumorales, con la finalidad de dirigir eficazmente estos últimos al tejido de interés.

Se revisa tanto la química de conjugación de estos polímeros a los fármacos antitumorales más usados, así como su afinidad por distintos receptores tumorales como consecuencia de su estructura química, proponiéndose de igual forma distintas estrategias de modificación química que mejorarían el rendimiento de dichos conjugados.

Del mismo modo, se describen los ensayos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* con conjugados a base de los polisacáridos más usados, para demostrar su eficacia tanto de direccionamiento como de liberación del fármaco, bajo distintas condiciones fisiológicas y patológicas, que nos ayuden a entender mejor el comportamiento de los mismos.

Se trata por tanto, de ofrecer una breve recopilación de la forma más completa posible a cerca del desarrollo del conocimiento en cuanto a los conjugados macromoleculares basados en polisacáridos y a sus distintas aplicaciones en el campo de la quimioterapia oncológica.

2. METODOLOGÍA

Este trabajo bibliográfico se ha realizado utilizando distintas páginas web, así como libros y enciclopedias de los fondos de la Biblioteca de la Universidad de Sevilla, y las bases de datos PubMed, Dialnet y Scopus.

En cada una de las distintas bases de datos se han introducido varias palabras claves para cada uno de los distintos apartados de que consta este trabajo y se han utilizado las herramientas disponibles para acotar la búsqueda en cuanto a fecha y tipo de publicación, centrándonos fundamentalmente en trabajos originales y revisiones bibliográficas.

Además, se ha empleado ChemDraw Professional 15.1 como herramienta de dibujo de las distintas estructuras que se han considerado necesarias para facilitar la comprensión del trabajo.

3. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, solamente precedida por las enfermedades cardiovasculares (Pérez-Herrero y Fernández-Medarde, 2015). Tumor es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades relacionadas. Todos los tipos de neoplasia se caracterizan porque algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse de forma descontrolada y a extenderse a tejidos cercanos. En condiciones normales, cuando una célula envejece o resulta dañada, muere, y es sustituida por nuevas células. Al desarrollarse un tumor las células anormales, viejas o dañadas, sobreviven cuando deberían morir, y se crean nuevas células cuando éstas no se necesitan. Por último es importante tener en cuenta a la hora de comprender el cáncer, que las células cancerígenas difieren de las normales en que, como ya hemos dicho, las primeras se dividen sin control, se vuelven invasivas, y además presentan una menor especialización que las sanas, de manera que no se diferencian en células con una función específica; ésta es una de las razones por las que las células tumorales se dividen indiscriminadamente (National Cancer Institute, 2016).

La quimioterapia es el método utilizado para el tratamiento de tumores metastásicos. Ésta se basa en la inhibición de la rápida división celular característica de las células tumorales. Por desgracia esta estrategia también afecta a las células sanas (Pérez-Herrero y Fernández-Medarde, 2015).

El desarrollo de la quimioterapia usando fármacos anticancerígenos tradicionales se encuentra cada vez más en desuso, debido a varios inconvenientes relacionados tanto con su baja hidrosolubilidad como con sus propiedades farmacocinéticas, produciendo de esta forma considerables efectos secundarios así como generando resistencia a múltiples fármacos por parte de los pacientes (Marchal y cols., 2015). De esta forma la mayoría de fármacos antitumorales debido a los inconvenientes ya mencionados, presentan limitaciones tanto a nivel de la eficacia como de la seguridad de la quimioterapia. Un enfoque prometedor para abordar los problemas de solubilidad de estos fármacos así como su selectividad, es la conjugación con vehículos poliméricos para formar profármacos basados en polímeros (Dragojevic y cols., 2015). El descubrimiento de permeabilidad y retención mejorada por Maeda (Maeda y col, 2000), junto con el modelo de Ringsdorf del conjugado polímero-fármaco (Ringsdorf, 1975), supusieron los primeros pasos en el uso de polímeros terapéuticos orientados hacia el tratamiento del cáncer (Sanchos y cols., 2010) (Figura 1). Estos profármacos basados en polímeros son portadores macromoleculares, diseñados para aumentar la solubilidad en agua de los fármacos antitumorales, además de mejorar su biodisponibilidad. Cabe destacar por otro lado que estos profármacos basados en polímeros aprovechan las características propias de la fisiología del tumor para facilitar la acumulación intratumoral del fármaco, y así mejorar la farmacocinética y las propiedades farmacológicas del mismo (Dragojevic y cols., 2015). En general los

conjugados consisten en transportadores poliméricos hidrosolubles, unidos al fármaco mediante un espaciador escindible, y un resto de direccionamiento complementario a un antígeno o receptor de la superficie de la célula diana (Saravanakumar y cols., 2012). Estos portadores farmacológicos no sólo facilitan el transporte de los agentes quimioterapéuticos a los tumores, evitando tejidos sanos y disminuyendo la toxicidad en el resto del organismo, sino que también protegen a los fármacos citotóxicos de la degradación, aumentando su vida media, la carga útil, y su solubilidad y disminuyendo la aclaración renal (Pérez- Herrero y Fernández-Medarde, 2015). Por otra parte, los conjugados actuales, se modulan para resultar termosensibles, sensibles al pH o fotosensibles y específicos para una célula diana concreta (Basu y cols., 2015).

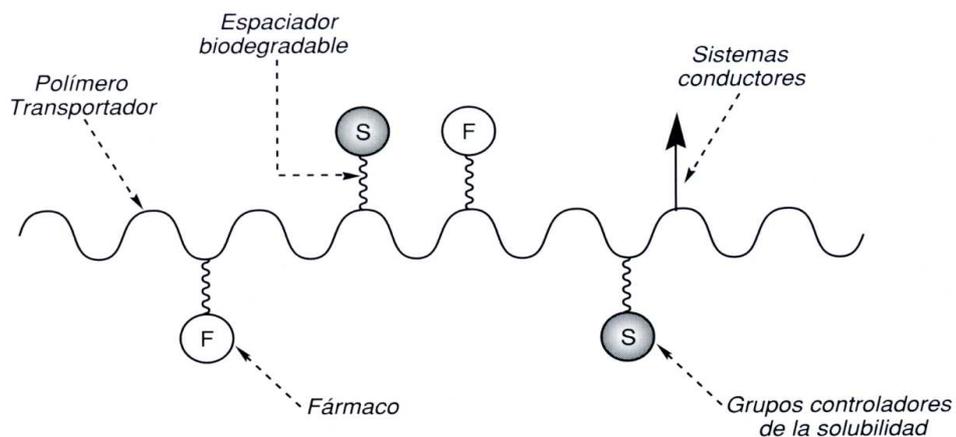


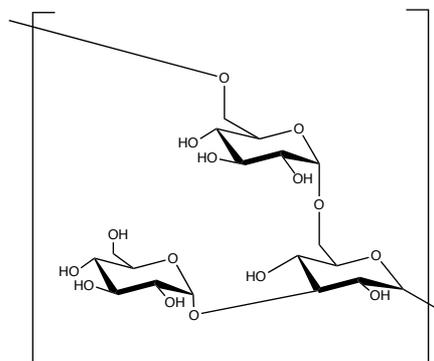
Figura 1. Modelo de Ringsdorf.

Varias macromoléculas, tales como polisacáridos, proteínas, anticuerpos, y polímeros sintéticos han sido usadas para la conjugación de fármacos antitumorales (Saravanakumar y cols., 2012). Los polisacáridos por su parte resultan ideales para la formación de conjugados al tener diversos grupos funcionales tales como hidroxilo, amino, grupos carboxílicos y grupos formilo que facilitan su conjugación química con diversas moléculas del fármaco (Basu y cols., 2015). Es importante además, tener en cuenta la ventaja que supone la amplia variedad de estructuras que encontramos por parte de los polisacáridos, así como sus características especiales y diversidad de fuentes (Tabla1) (Saravanakumar y cols., 2012).

Tabla 1.-Estructura, fuente y características principales de algunos polisacáridos usados para la conjugación de fármacos antitumorales.

Dextrano (Dex)

Estructura:

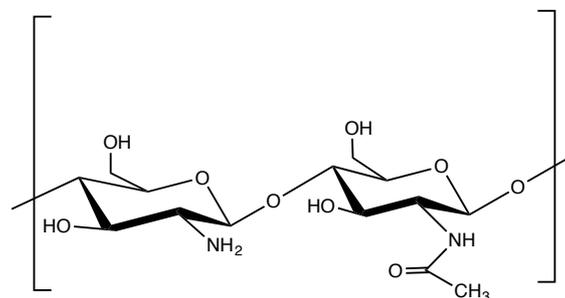


Fuente: Bacteriana (*Streptococcus mutans* y *Leuconostoc mesenteroides*).

Comentarios: Tanto el grado de ramificación, longitud de las cadenas, y distribución del peso molecular pueden afectar a las propiedades fisicoquímicas del Dex; el Dex de bajo peso molecular es eliminado de la circulación a través de los riñones, mientras que el Dex de alto peso molecular presenta una vida media más larga y es degradado por el sistema del retículo endotelial; el Dex con un peso molecular entre 40 y 70 kDa es usado como portador en los conjugados de fármacos; el mecanismo más plausible para la absorción de los conjugados de Dex es a través de endocitosis; el Dex es metabolizado por distintas exo- y endodextransasas presentes en varias partes del cuerpo, incluyendo hígado, bazo y colon.

Quitosano

Estructura:



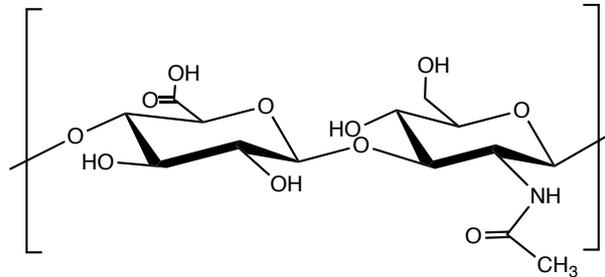
Fuente: Exoesqueleto de crustáceos (tales como cangrejos y camarones).

Comentarios: Sus características fisicoquímicas están fuertemente influenciadas por su grado de desacetilación y su peso molecular; su muco-adhesión y su absorción se ven incrementadas en

su forma protonada, esto aumenta el tiempo de residencia *in vivo* de las formas de dosificación.

Ácido Hialurónico (HA)

Estructura:

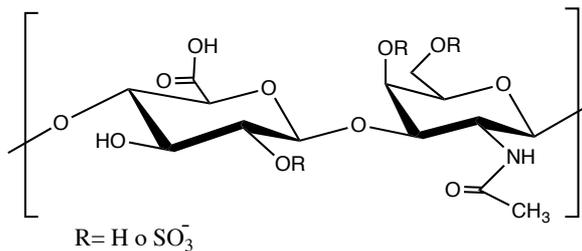


Fuente: Humanos y animales (encontrado en la matriz extracelular (ECM), especialmente en tejidos conectivos blandos).

Comentarios: Glicosaminoglicano no sulfatado con un amplio rango de pesos moleculares (1-10.000 kDa), juega un papel crucial en la adhesión celular, crecimiento y migración; HA se ha visto implicado en procesos de enfermedades metastásicas; varios tumores sobre expresan los receptores del HA tales como CD44 y RHAMM; CD44 podría interactuar con una longitud mínima de HA de seis u ocho sacáridos; HA es degradado por hialuronidasa; la principal desventaja de los portadores basados en HA es su rápida aclaración de la circulación sanguínea, por medio del reconocimiento de los receptores de HA del sistema del retículo endotelial de hígado y bazo.

Sulfato de Condroitina

Estructura:

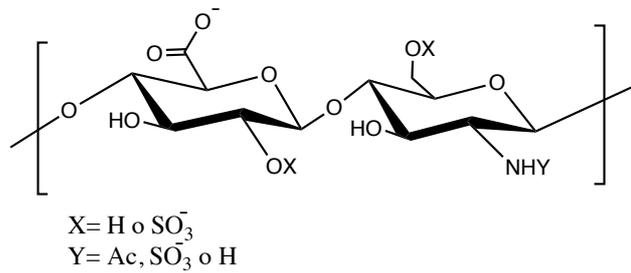


Fuente: Humanos, mamíferos e invertebrados (comercialmente se obtiene del cartílago de tiburón o de la quilla de gallina).

Comentarios: Involucrado en la señalización intracelular, orientación celular, y conexión entre ECM y células; puede ser usado como portador para la liberación direccionada al colon.

Heparina

Estructura:

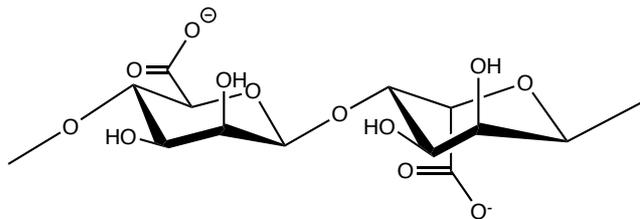


Fuente: Mamíferos (tejido de la mucosa).

Comentarios: Glicosaminoglicano altamente sulfatado con un rango de peso molecular entre 15-40 kDa, y una carga negativa promedio de aproximadamente -75 mV; ampliamente usado como fármaco anticoagulante, está también involucrado en otros procesos fisiológicos, incluyendo proliferación celular, diferenciación, e inflamación; influencia también la progresión del cáncer y la metástasis; presenta fuertes interferencias con la actividad de los factores de crecimiento (FGF), inhibiendo de este modo la angiogénesis que resulta esencial para la progresión tumoral; su uso se ve limitado por su fuerte actividad anticoagulante y efectos colaterales indeseados, tales como complicaciones hemorrágicas y trombocitopenia inducida por la heparina.

Alginato

Estructura:

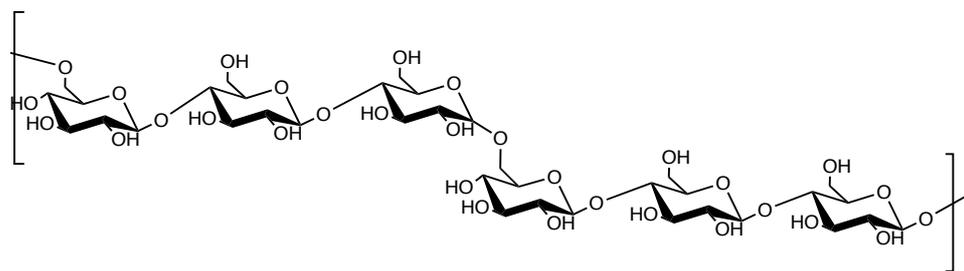


Fuente: Algas marrones marinas o bacterias del suelo

Comentarios: Presenta una amplia variedad de pesos moleculares (10-1000 kDa) dependiendo de la fuente y el procesamiento; con cationes divalentes tales como, Ca^{2+} , los alginatos podrían formar una red de gel; estimulan la producción de citoquinas factor de necrosis tumoral- α , interleuquina-1 e interleuquina-6 de los monocitos humanos; presenta una actividad antitumoral inherente contra modelos de tumores murinos; existe una falta de evidencia clara de degradación enzimática y aclaramiento *in vivo* en el caso de alginatos de alto peso molecular

Pululano

Estructura:



Fuente: Producido a partir del almidón por ciertos hongos polimórficos, *Aureobasidium pullulans*.

Comentarios: Polisacárido no iónico, con un rango de peso molecular de 1.000 Da a 2.000 kDa dependiendo de las condiciones de crecimiento del organismo; puede unirse de forma selectiva a los receptores de asialoglicoproteínas (ASGPs), que se expresan exclusivamente en la superficie de células parenquimales del hígado.

4. QUÍMICA DE LA CONJUGACIÓN POLISACÁRIDO-FÁRMACO

El tratamiento de tejidos tumorales sin afectar a células sanas mediante el uso de conjugados polímero-fármaco (PDCs) es un tema que lleva muchos años en desarrollo, cuya novedad reside en la utilización de un mecanismo físico llamado aumento de la permeabilidad y retención (EPR) intensificando la orientación del fármaco hacia las células tumorales. El EPR es por tanto un fenómeno fisiológico por el cual ciertas moléculas tienden a acumularse en la zona tumoral más de lo que lo hacen en células sanas. Una vez que el PDC se encuentra en tejido tumoral, entra en la célula mediante difusión simple o por endocitosis mediada por receptor (Modi y cols., 2006). Sin embargo, la eficacia del direccionamiento de PDCs dependerá tanto del fármaco, como del polímero, así como del tipo de enlace, espaciador y la presencia de grupos de direccionamiento (Wadhwa y Mumper, 2015).

El éxito de la quimioterapia está limitado tanto por la falta de selectividad de fármacos activos como por la aparición de resistencia por parte del tumor. Los PDCs combinan dos estrategias para lograr una alta concentración de fármaco selectivamente en el sitio del tumor: (a) la acumulación elevada en el tumor por direccionamiento pasivo basado en el efecto de EPR y (b) la liberación del fármaco específicamente en el sitio del tumor, al ser sensible al pH del microambiente tumoral ácido (Heinrich y cols., 2016).

En este apartado discutiremos algunas de las metodologías más utilizadas en la preparación de los conjugados polisacárido-fármaco. Existen numerosos métodos de síntesis para la

modificación de polisacáridos, dependiendo tanto de la función de la cadena principal del mismo, como del fármaco que va a ser conjugado.

Un requisito previo de los polímeros para formar conjugados es la disponibilidad de grupos funcionales reactivos, adecuados para la fijación química de los fármacos terapéuticos. Como ya hemos indicado, los polisacáridos poseen un gran número de grupos funcionales reactivos (ej. hidroxilo, amino, carboxilo) en su esqueleto, que pueden usarse como sitios activos de conjugación de fármacos, ya sea directamente o a través de espaciadores. Un grupo espaciador entre la cadena del polisacárido y el fármaco puede ser crítico para la eficacia terapéutica del conjugado. A su vez, el espaciador puede ser elegido de tal forma que nos permita controlar la velocidad de liberación del fármaco. Es importante también, que los espaciadores sean estables en la sangre pero susceptibles a la escisión en el lugar de destino (Soyez y cols., 1996; Christie y Grainger, 2003).

Dependiendo del grupo funcional, se han descrito varios métodos para la síntesis de PDCs. Sin embargo, es importante elegir un método fácil de conjugación, que se realice en condiciones de reacción suaves que no alteren la estructura y la actividad biológica del fármaco original. En la mayoría de los casos, los fármacos se han conjugado a polisacáridos que contienen grupos amino o carboxilo, ya sea directamente o a través de espaciadores, mediante la formación de un enlace amida por la reacción de acoplamiento mediada por carbodiimidas. Este método incluye la activación de los grupos carboxílicos usando agentes de reticulación, para formar una *O*-acilisourea, intermedio que es capaz de acilar aminas (Figura 2). Algunos de los agentes representativos para las reacciones de conjugación son: clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC; carbodiimida hidrosoluble) (**I**), *N,N'*-diciclohexil carbodiimida (**II**), o *N,N'*-diisopropil carbodiimida (**III**) (Nichifor y Mocanu, 2006; Torato y cols., 2016).

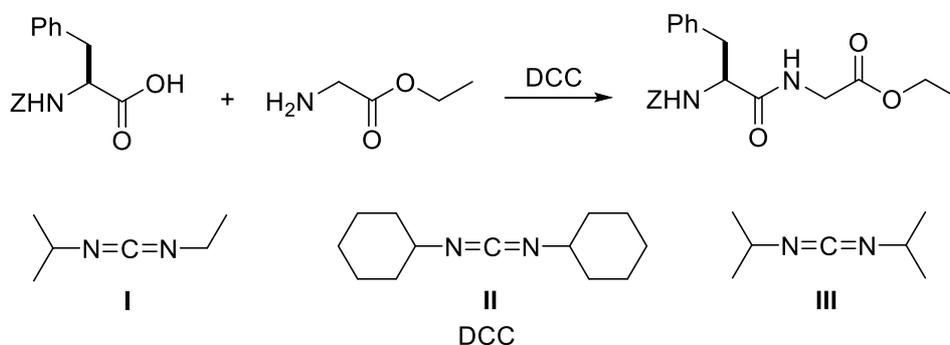


Figura 2. Formación enlace peptídico entre aminoácidos *N*-protegidos y *C*-protegidos usando diimidas como agentes condensantes.

En el caso de polisacáridos que contienen únicamente grupos hidroxilo pueden conjugarse directamente a fármacos con un grupo carboxílico, para producir ésteres. Por otro lado, los grupos hidroxilo de los polisacáridos se pueden transformar en otros grupos funcionales para facilitar la conjugación de los fármacos (Figura 3). Por ejemplo podemos introducir un grupo aldehído en el polisacárido, por oxidación con periodato, y hacerlo reaccionar con un grupo amino del fármaco, para formar la base de Schiff (imino-conjugados), que es relativamente inestable y puede liberar el fármaco rápidamente por hidrólisis. La reducción de la base de Schiff con cianoborohidruro de sodio da lugar a conjugados hidrolíticamente estables. Por estos métodos, los polisacáridos han sido conjugados con varios fármacos anticancerígenos como Doxorubicin (DOX), Daunomycin (DMN) y Metotrexate (MTX) (Levi-Schafter y cols., 1982). Este método es también muy útil para la conjugación de proteínas a polisacáridos sin que sufran una pérdida significativa de sus actividades biológicas (Takakura y cols., 1989).

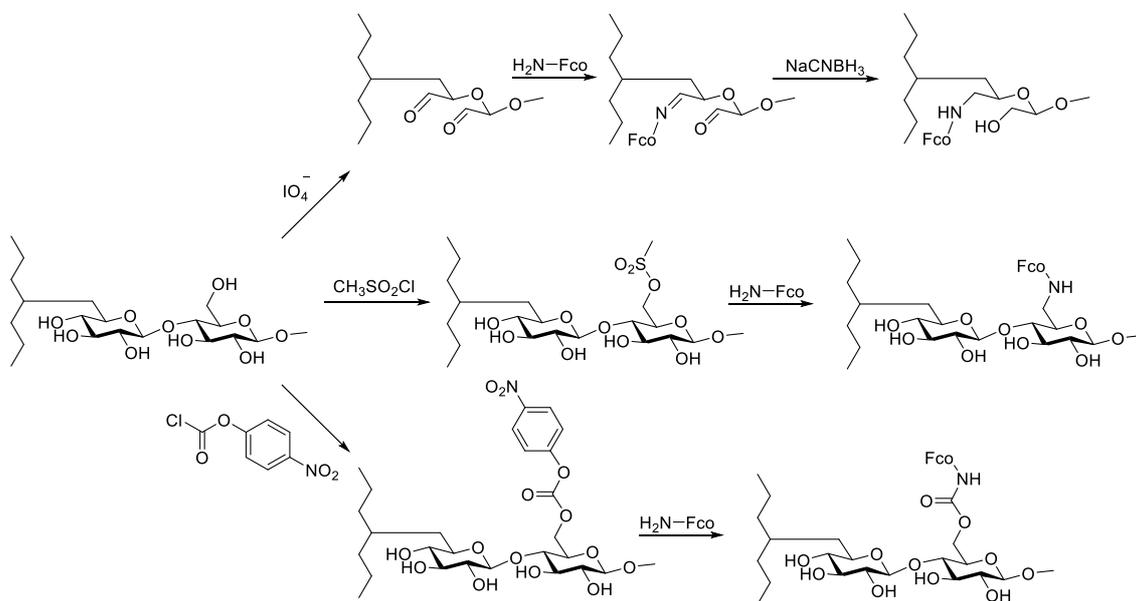
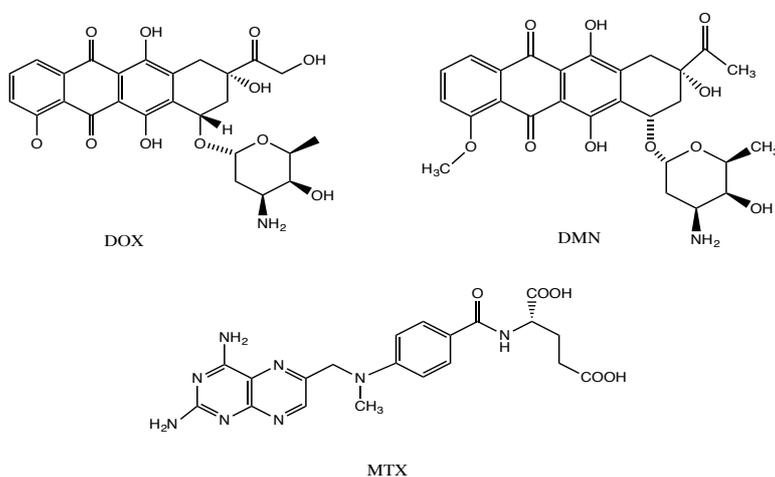


Figura 3. Síntesis de conjugados de fármacos basados en polisacáridos.



Los grupos hidroxilo de los polisacáridos también se han modificado como tosilatos o mesilatos, formando ésteres de estos ácidos sulfónicos, que constituyen buenos grupos salientes en reacciones de sustitución nucleofílica y pueden ser desplazados por fármacos que contengan grupos amino (Figura 3). Las condiciones de reacción para la activación son importantes en este proceso, ya que pueden determinar la naturaleza de los productos resultantes. Por ejemplo, la reacción de pululano con cloruro de mesilo en piridina produce *O*-mesil-pululano, mientras que se obtiene clorodesoxi pululano como producto principal en *N,N*-dimetilfolmamáida (Mocanu y cols., 1996). Para obtener ésteres carbonato reactivos, los grupos hidroxilo del polisacárido se hacen reaccionar con cloroformiato de *p*-nitrofenilo, y los carbonatos resultantes pueden reaccionar con los grupos amino presentes en los fármacos con formación de enlaces carbamato estables (Figura 3).

Los grupos hidroxilo de los polisacáridos también pueden convertirse en grupos carboxílicos usando anhídrido succínico (Figura 4). Los polisacáridos carboxilados resultantes pueden conjugarse a continuación con grupos amino o hidroxilo contenidos en los fármacos por formación de amidas o ésteres, respectivamente. Una amplia gama de polisacáridos, tales como el dextrano, pululano, y quitosano, han sido activados de esta manera.

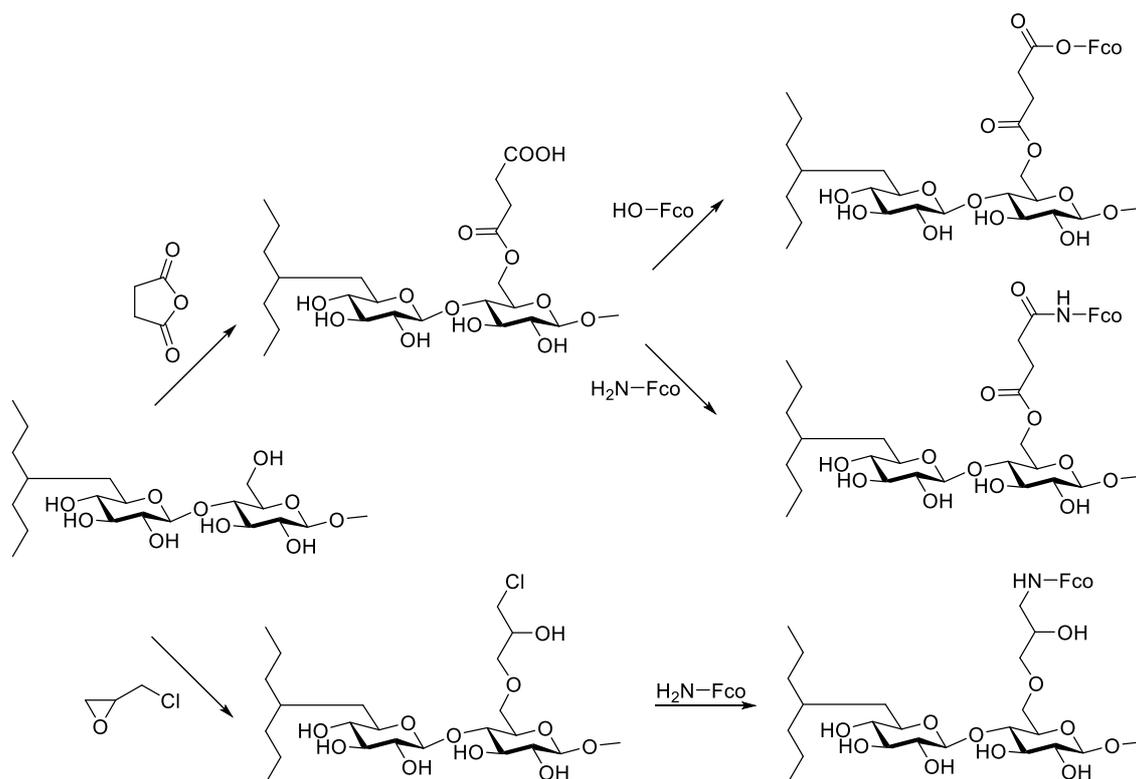
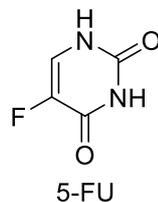
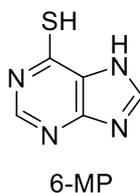


Figura 4. Síntesis de conjugados de fármacos basados en polisacáridos.

La reacción del polisacárido con epiclorhidrina bajo fuertes condiciones alcalinas o con Zn(BF₄)₂ como catalizador, se ha utilizado para producir 3-cloro-2-hidroxipropil derivados, útiles para el acoplamiento de fármacos que contienen grupos amino (Figura 4). Usando este

método, fármacos como 6-Mercaptopurina (6-MP) y 5-Fluorouracilo (5-FU) han sido conjugados al Dextrano (Mora y Pató, 1990).



5. CONJUGADOS DE FÁRMACOS BASADOS EN POLISACÁRIDOS

A continuación hablaremos de forma individual de los conjugados de fármacos basados en polisacáridos en la terapia del cáncer, refiriéndonos exclusivamente a los fármacos de bajo peso molecular.

5.1.- CONJUGADOS DE FÁRMACOS BASADOS EN EL DEXTRANO

El Dextrano es un polisacárido microbiano hidrosoluble compuesto por una cadena lineal de α -1,6-glucopiranososa con algunas ramificaciones 1-3 (Aspinall, 1982). El grado de ramificación depende de la fuente del Dextrano y varía desde el 0.5% al 60%. El Dextrano es uno de los más prometedores candidatos para la preparación de fármacos conjugados, ya que presenta una estructura química bien definida, está disponible en distintos pesos moleculares, presenta buena solubilidad en agua, alta estabilidad, poca toxicidad intrínseca y posee numerosos grupos hidroxilo para derivatización. A continuación se describen distintos conjugados a base de Dex, así como sus aplicaciones en la terapia oncológica.

Los conjugados Dextrano-Mitomicina C (Dex-MMC) han sido ampliamente estudiados para su aplicación en la terapia cancerígena (Figura 5). Estos conjugados liberan MMC de forma sostenida, y es posible controlar su rango de liberación variando la longitud del espaciador (Hashida y cols., 1983; Yoshinobu y cols., 1989). Estos conjugados mostraron una actividad antitumoral significativa en ratones con leucemia P388 o melanoma B16 (Kojimay cols., 1980; Hashida y cols., 1983). Se han investigado también, otros conjugados a base de MMC, sintetizados usando como espaciador un péptido bio-degradable y un resto terminal de galactosamina que puede usarse para dirigir los conjugados poliméricos al hepatoma (Cao y cols., 2011). El Dex aniónico-MMC administrado de forma sistemática en ratones, mostró una mayor concentración tanto en plasma como en el sitio del tumor con respecto al fármaco libre. Recientemente un estudio ha demostrado que cuando los conjugados son administrados intratumoralmente, el Dex catiónico-MMC es retenido en mayor proporción en el tumor que el Dex aniónico-MMC y que el fármaco libre (Nomura y cols., 1998). Por otro lado, cuando el Dex catiónico-MMC es administrado en ratas mediante inyecciones intramusculares, los conjugados son retenidos en el sitio de inoculación durante 48 horas antes de pasar al sistema

linfático (Takakura y cols., 1984). Los resultados indicaron que los conjugados Dex catiónicos de alto peso molecular presentan un prometedor potencial para el tratamiento de metástasis ganglionares.

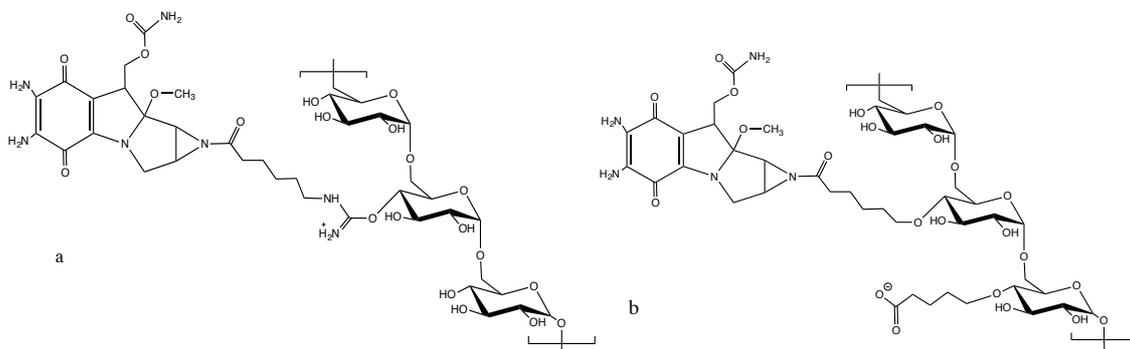


Figura 5. Estructura química de conjugados de fármacos basados en Dex: (a) Dex catiónico-MMC y (b) Dex aniónico-MMC.

Se han descrito asimismo conjugados Dextrano-Doxorubicín (Dex-DOX) a partir de dextranos oxidados, mediante la formación de bases de Schiff que no fueron posteriormente reducidas (Ueda y cols., 1989) y que, por lo tanto, pueden liberar hidrolíticamente el fármaco en el entorno ácido de los compartimentos lisosomales de las células. Estos conjugados presentan una mayor actividad antitumoral y una menor toxicidad que la DOX libre. Al tratar varios modelos tumorales, incluyendo carcinoma de pulmón de Lewis y carcinosarcoma Walker 256, con este complejo se observó una inhibición en el crecimiento tumoral (Ueda y cols., 1989; Munechika y cols., 1994). Lam et al. también demostraron que los conjugados Dex-DOX ejercían mayor actividad que la DOX libre en líneas celulares resistentes a múltiples fármacos, debido a una disminución en la tasa de eliminación de la DOX por la glicoproteína-P (Lam y cols., 1999). Resultados similares fueron obtenidos para los conjugados Dex-DOX contra la sublínea resistente a múltiples fármacos del carcinoma epidérmico humano (Sheldon y cols., 1989).

Estudios toxicológicos preclínicos llevados a cabo en ratones, ratas y perros demostraron que el valor de DL_{50} era 5 veces mayor para los conjugados, en comparación con la DOX libre. En ratones y ratas, los niveles en el tumor y en plasma del conjugado eran mayores que los de la DOX libre (Ueda y cols., 1989; Munechika y cols., 1994; Kikukawa y cols., 1990). Sin embargo, un ensayo clínico en fase I realizando una administración intravenosa del conjugado, mostró una significativa toxicidad clínica, así como trombocitopenia y hepatotoxicidad, presumiblemente debido a la absorción del conjugado por las células del Retículo Endotelial (Dauhauser y cols., 1993).

Un estudio realizado en los últimos años, basado en la sensibilidad que muestran tanto el tejido tumoral como el microambiente intracelular del tumor hacia los conjugados polímero-DOX,

demuestra la eficacia de los mismos para mejorar la actividad antitumoral del DOX y reducir sus efectos secundarios. En este trabajo se tuvieron en cuenta dos tipos de conjugados que se sintetizaron de forma muy similar. Por un lado encontramos el conjugado Dex-DOX sensible a los ácidos (Dex-O-DOX), y por otro el insensible, Dex-b-DOX. En esta investigación se demostró que la liberación de DOX del conjugado sensible era dependiente del pH y aumentaba conforme disminuía el mismo. Además este conjugado mostró una buena liberación de DOX intracelular en las células del hepatoma humano HepG2, y más importante aún, en comparación con Dex-b-DOX, Dex-O-DOX mostraba mayor actividad antitumoral y menor toxicidad, lo que se confirmó por análisis histológicos e inmunoquímicos (Xu y cols., 2015).

Otros conjugados a base de ácido desoxicólico (DA) y Dex (DexDA) fueron investigados en otro estudio, y se prepararon nanopartículas encapsuladas de DOX usando dichos conjugados, que presentan propiedades anfipáticas, mostrando un comportamiento de autoagregación en medio acuoso. Ensayos de citotoxicidad *in vitro* usando células de carcinoma de colon CT26 resistentes a DOX, mostraron una mayor actividad antitumoral usando DOX incorporado en nanopartículas que usando DOX libre. Observaciones con microscopía de fluorescencia verificaron este resultado, es decir, las nanopartículas se introdujeron correctamente en células tumorales y se mantuvieron más tiempo en comparación con la DOX libre. Estos resultados sugieren que las nanopartículas DexDA con DOX incorporado son vehículos prometedores para la administración de fármacos antitumorales (Jeong y cols., 2011).

Por otro lado, se han sintetizado nanopartículas autoorganizadas conteniendo ácido fólico para el direccionamiento al receptor folato de las células cancerosas. Así, la DOX se conjugó al grupo carboxílico del Dex modificado por anhídrido succínico (DexSU-DOX), y se prepararon nanopartículas cargadas de DOX mediante la formación de un complejo a base de quitosano injertado con ácido fólico (ChitoFA) y DexSU-DOX. En el estudio de cultivo celular con células KB, las nanopartículas recubiertas con ChitoFA revelaron una folato endocitosis mediada por los receptores de las células cancerosas y la viabilidad celular cambió de forma significativa por el direccionamiento al receptor folato (Lee y cols., 2014).

El Paclitaxel (PTX), se ha conjugado al carboximetil-Dex (CM-Dex) a través de un tetrapéptido Gly-Gly-Phe-Gly (GGFG) como espaciador (Sugahara y cols., 2007) (Figura 6). Los experimentos de liberación del fármaco *in vitro* mostraron que más del 80% del PTX es liberado tras 24-48 horas en plasma o suero. PTX mostró una amplia citotoxicidad contra una gama de línea celular tumoral humana, mientras que CM-Dex-GGFG-PTX era inactivo *in vitro*. Sin embargo la eficacia antitumoral del CM-Dex-GGFG-PTX era superior a aquella del PTX libre, contra carcinoma de colon 26 en ratones portadores, lo que probablemente se debe a una más eficaz liberación del fármaco activo en el sitio de destino. Además la dosis máxima tolerada de CM-Dex-GGFG-PTX era mayor del doble de la del PTX libre.

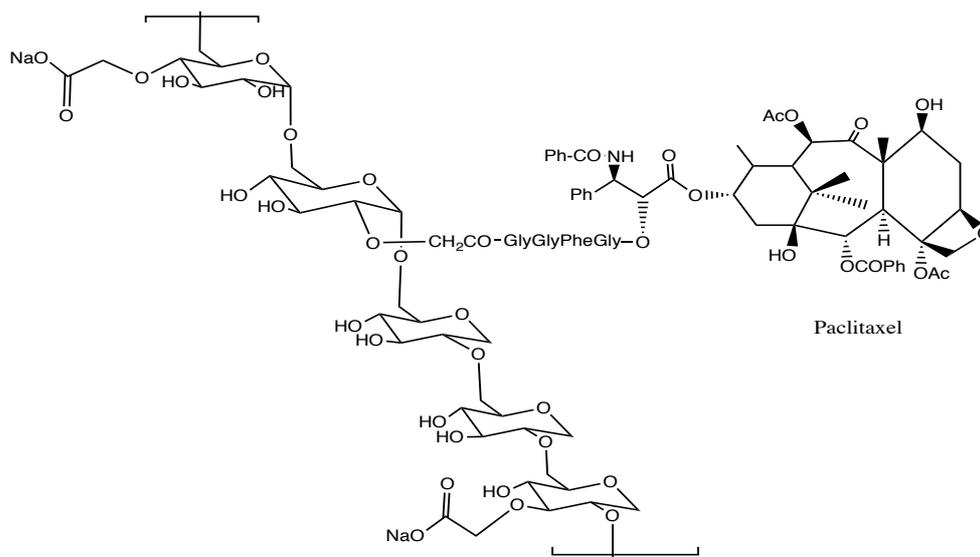


Figura 6. Estructura química del conjugado CM-Dex-GGFG-PTX.

Por otra parte, en el estudio de la resistencia de las células del melanoma B16F10 al PTX, se investigó acerca de un complejo formado por un copolímero macromolecular a base de dietilaminoetanol (DEAE), Dextrano y metacrilato de metilo (MMA) conjugado con PTX (DDMC/PTX), con el cual no se observaba resistencia celular en experimentos *in vitro* y mostraba una actividad antitumoral mucho mayor a la del PTX libre *in vivo* en experimentos realizados con ratones. De esta forma los análisis histoquímicos indicaron que la administración de este complejo disminuía la metástasis y aumentaba la supervivencia por parte de los ratones. Como resultado se concluyó que la acción médica del complejo DDMC/PTX suprime la acción asociada al tumor de los macrófagos M2 y controla la metástasis de las células cancerosas (Eshita y cols., 2015).

Otra forma de administración del PTX al ser un fármaco hidrofóbico es su inclusión dentro de unos conjugados de albúmina de suero bovino (BSA) y Dextrano de distintos pesos moleculares y en distinto grado de conjugación. Estas emulsiones resultan estables en suero sanguíneo y a largo plazo. Estudios de citotoxicidad *in vitro* verificaron que las emulsiones sin cargar resultaban biocompatibles, y que las emulsiones cargadas con PTX tenían una actividad antitumoral similar a la disolución de PTX. Investigaciones *in vivo* con ratones portadores de hepatoma ascético H22 demostraron que las emulsiones cargadas con PTX y con un Dex más denso y corto en la superficie, ofrecían una mejor inhibición tumoral y una mayor supervivencia que la inyección comercial de PTX (Qi y cols., 2013).

El Cisplatino [CDDP; *cis*-diaminodicloroplatino (II)] uno de los más poderosos complejos antitumorales fue complejado, asimismo, con CM-Dex (Schechter y cols., 1999). Los complejos eran menos tóxicos y resultaban más efectivos en tumores sensibles a CDDP que el fármaco libre *in vivo*. CDDP fue también conjugado a Dex oxidado (OX-Dex) y a dicarboximetil Dex

(DCM-Dex) por Nakashima et al. (Nakashima y cols., 1999). Éstos encontraron que DCM-Dex-CDDP mostraba una actividad antitumoral más larga en suero comparada con OX-Dex-CDDP. Estudios *in vivo* también revelaron que la retención de DCM-Dex-CDDP en la circulación sanguínea era mucho mayor que la de OX-Dex-CDDP.

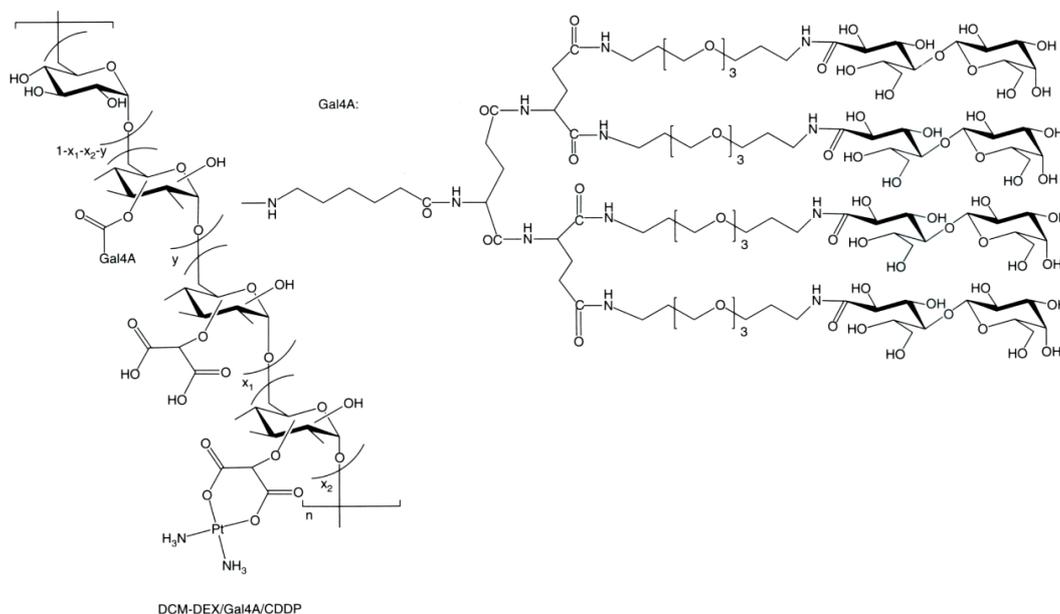


Figura 7. Estructura química del conjugado DCM-Dex-Gal4A-CDDP.

Con el fin de dirigirlo a las células del hepatoma, el CDDP se conjugó a DCM-Dex con unidades de galactosa ramificadas (Gal 4A) para obtener así un profármaco macromolecular (DCM-Dex-Gal4A-CDDP) (Ohya y cols., 2001) (Figura 7). Los estudios realizados *in vitro* frente a células del hepatoma humano HepG2, llevaron a la conclusión de que los conjugados con ramificaciones de galactosa presentan mayor afinidad por las células del hepatoma, lo que mejoraría los efectos terapéuticos del conjugado. Un trabajo encaminado a inhibir el crecimiento primario del tumor así como metástasis a órganos específicos se llevó a cabo en el modelo de metástasis de tumor mamario ortotópico 4T1 planteando el uso de cisplatino cargado con nanopartículas de LHRH (hormona liberadora de gonadotropina) modificado con Dex (Dex-SA-CDDP-LHRH). Con el sitio de conjugación racionalmente diseñado para el ligando LHRH, las nanopartículas de Dex-SA-CDDP-LHRH mantienen la función de direccionamiento del LHRH y facilitan la unión específica a los receptores de LHRH que se encuentran sobre expresados en la superficie de las células del cáncer de mama 4T1. Por tanto, las nanopartículas de Dex-SA-CDDP-LHRH mostraron una mejora en la captación celular y de la citotoxicidad, al compararlo con las nanopartículas de Dex-SA-CDDP no direccionadas. Cabe destacar que tanto las nanopartículas direccionadas como las no direccionadas disminuyen la toxicidad sistémica

de CDDP y aumentan la dosis máxima tolerada de CDDP de 4 a 30 mg/Kg. Es importante destacar que Dex-SA-CDDP-LHRH aumenta significativamente la acumulación de CDDP en el tumor primario y en los órganos metastásicos y disminuye de forma significativa la nefrotoxicidad del CDDP (Li y cols., 2015).

5.2.- CONJUGADOS DE FÁRMACOS BASADOS EN QUITINA Y QUITOSANO

El quitosano, compuesto por D-glucosamina y N-acetil glucosamina, es un aminopolisacárido lineal, obtenido por la desacetilación de la quitina, un polisacárido natural encontrado en el exoesqueleto de crustáceos como el cangrejo y el camarón (Kumar y cols., 2004; Rinaudo, 2006). Las características fisicoquímicas del quitosano, están fuertemente influenciadas por su grado de desacetilación y su peso molecular, y sus propiedades mucoadhesivas aumentan el tiempo de resistencia *in vivo* de las formas de dosificación en el tracto gastrointestinal y mejoran la biodisponibilidad de varios fármacos. En condiciones fisiológicas, el quitosano puede ser fácilmente digerido por enzimas tales como lisozimas o quitinasas que pueden ser producidas por la flora normal en el intestino humano (Aiba, 1992). Por tanto el quitosano ha sido investigado como un portador para la liberación específica de fármacos en el colon. Los grupos funcionales reactivos en el esqueleto del quitosano ofrecen posibilidades de síntesis de varios derivados, los cuales tienen propiedades únicas para aplicaciones específicas. Por ejemplo, la tiolación del quitosano mejora las propiedades mucoadhesivas, mientras la succinilación prolonga *in vivo* la vida media de los polímeros tras la administración intravenosa (Leitner y cols., 2003; Kato y cols., 2000). Estas propiedades fisicoquímicas y biológicas han justificado su uso como sistemas de liberación controlada de varios agentes terapéuticos (Park y cols., 2010; Amidi y cols., 2010). Además de conjugados, películas preparadas usando quitina o quitosano se han desarrollado como apósitos para heridas, mucoadhesivos orales, y adhesivos resistentes al agua, en virtud de sus características de liberación y adhesión (Kato y cols., 2003).

En los últimos años, los vehículos de administración de fármacos basados en quitosano se han convertido en algunos de los más atractivos para su estudio ya que, en contraste con otros polisacáridos, el quitosano ha demostrado unas características únicas para las plataformas de administración de fármacos, incluyendo sus grupos amino primarios, que pueden ser activados para la modificación química, y la posibilidad de ser utilizado, mediante métodos simples y suaves, en la encapsulación de biomoléculas o fármacos (Hu y cols., 2013). De esta forma, recientemente se han realizado avances en la quimioterapia contra el cáncer a través del desarrollo de conjugados de fármacos anticancerosos basados en quitosano. Éstos solucionan problemas propios de ciertos medicamentos, tales como mala estabilidad, insolubilidad en agua, baja selectividad, alta toxicidad y distintos efectos secundarios. Estos conjugados mostraron

además ser buenos portadores de fármacos debido a su biocompatibilidad, capacidad de biodegradación y facilidad de modificación. Los conjugados de medicamentos anticancerosos con quitosano muestran de esta forma efectos anticancerígenos eficaces con una disminución de los efectos adversos del fármaco original, debido a una distribución predominante en el sitio del tumor y una liberación gradual del fármaco libre (Kandra, 2015). Por ejemplo, la Doxifluridina y la 1-β-D-arabinofuranosilcitosina (Ara-C) (Figura 8) se conjugaron con quitosano utilizando ácido glutárico como espaciador. Los conjugados de Ara-C con quitosano, en particular, mostraron un buen efecto antitumoral en ratones portadores de leucemia P388. Por otro lado, los derivados glicol-quitosano (G-Chi) se distribuyen principalmente en la circulación sistémica y en el riñón tras su administración intravenosa en ratones normales. El efecto terapéutico de los conjugados de Mitomicina C (MMC) con G-Chi no se ve mejorado en comparación con la del fármaco libre, pero los efectos secundarios tóxicos propios de la MMC parecen disminuir con los conjugados (Kato y cols., 2005).

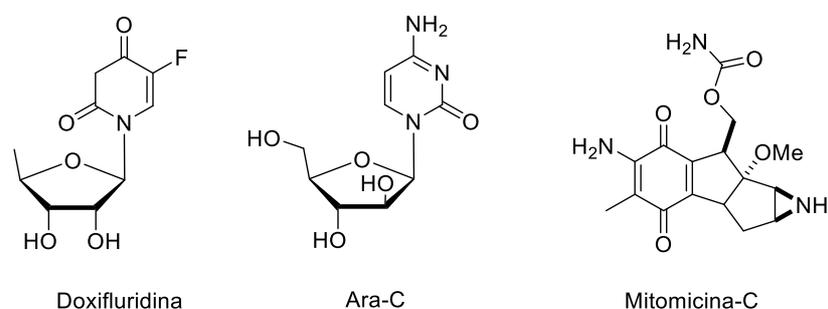


Figura 8. Estructuras químicas: Doxifluridina, Ara-C y Mitomicina-C.

Conjugados de quitina fueron sintetizados por la unión química de DOX a 6-O-carboximetilquitina (CM-Chit) a través de un tetrapéptido bio-degradable a nivel lisosomal Gly-Phe-Leu-Gly (CM-Chit-GFLG-DOX) o de un espaciador alquílico pentametilénico (CM-Chit-C₅-DOX) (Ohya y cols., 1994) (Figura 9). La velocidad de liberación de DOX de CM-Chit-GFLG-DOX aumenta en presencia de la catepsina B, mientras no se observa un cambio significativo en la liberación de CM-Chit-C₅-DOX. Los conjugados mostraron ser eficaces en el tratamiento de la leucemia P388 en ratones y mostraron menor citotoxicidad que la DOX libre (Ohya y cols., 1995).

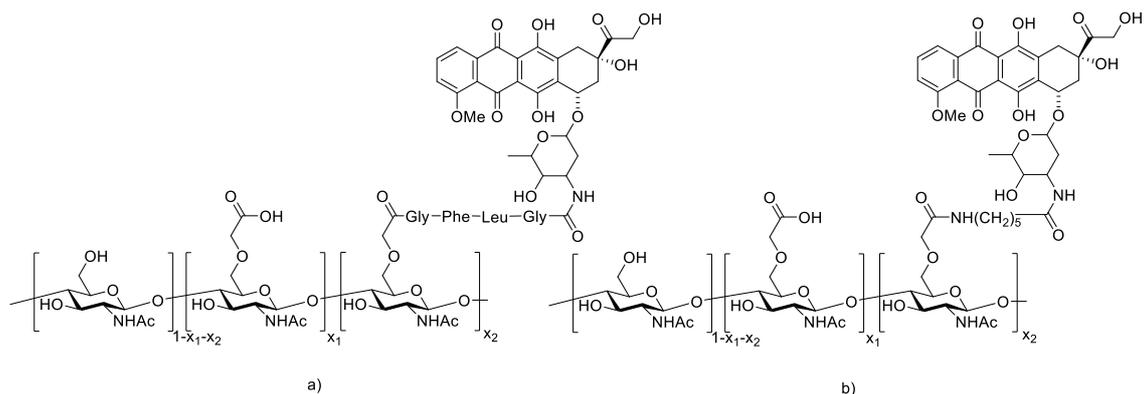


Figura 9. Estructura química de conjugados basados en quitina: (a) CM-Chit-GFLG-DOX y (b) CM-Chit-C₅-DOX.

La conjugación de fármacos hidrofóbicos a polímeros hidrofílicos conduce a profármacos con características anfílicas, algunos de los cuales se autoensamblan en nanopartículas (Davis y cols., 2008). Kwon et al. prepararon glicol quitosano-DOX con un espaciador Z-aconitoilo (GC-DOX) y estudiaron el comportamiento de autoensamblaje bajo condiciones fisiológicas (Son y cols., 2003; Park y cols., 2006) (Figura 10). Además, encapsularon DOX libre en conjugados autoensamblados con alta eficiencia de carga (97%). Los conjugados con un 2-5 wt% DOX formaron nanopartículas autoensambladas en condiciones acuosas, mientras que aquellos conjugados con más de un 5,5% de DOX precipitaban debido a su alta hidrofobicidad. La carga contenida de DOX podría aumentarse a 38,9% por encapsulación física de DOX en nanopartículas. La liberación de DOX estaba significativamente influida por el pH del medio, ya que el espaciador Z-aconitoilo es fácilmente hidrolizable a un pH bajo. Los estudios de biodistribución *in vivo* demostraron que la distribución de nanopartículas en el tumor aumentaba gradualmente conforme aumentaba el tiempo de circulación sanguínea, mientras que una cantidad despreciable de nanopartículas fueron encontradas en el corazón y los pulmones.

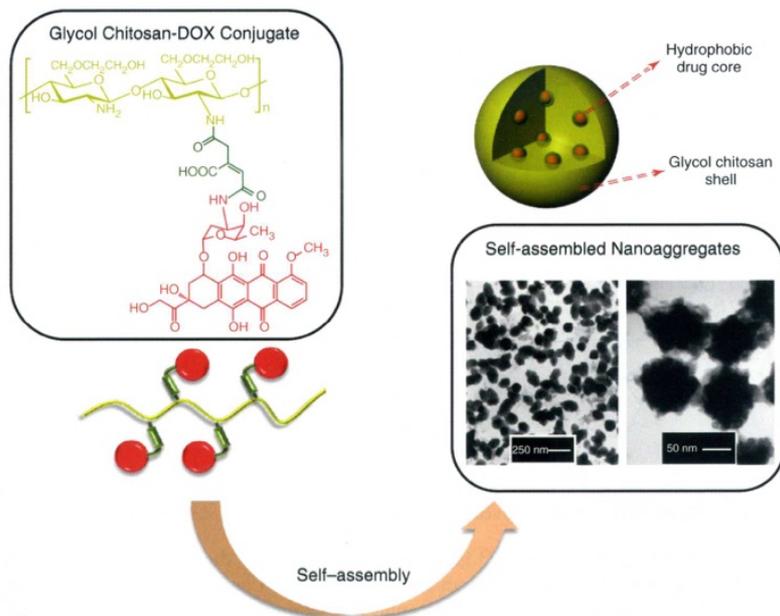


Figura 10. Nanoagregados autoensamblados de conjugado GC-DOX con enlaces *cis*-aconitil.

Puesto que el uso de DOX como fármaco anticancerígeno se encuentra limitado por sus efectos secundarios y por su insuficiente captación celular, un estudio reciente ha descrito un profármaco basado en la conjugación de DOX y quitosano mediante un enlace hidrazona ácido-escindible. Los conjugados obtenidos resultaron muy estables y no mostraron liberación de DOX a pH neutro; además presentaban unas excelentes propiedades de absorción celular y una acumulación notable del fármaco en células tumorales (Chen y cols., 2014).

Otros profármacos a base de DOX han sido estudiados con éxito. Éste es el caso de un conjugado de DOX a base de quitosano injertado con ácido esteárico (CSO-SA), a través de puentes disulfuro. El conjugado resultante (DOX-SS-CSO-SA) (Figura 11) puede autoensamblarse para formar micelas de tamaño nanométrico en medio acuoso con una baja concentración micelar crítica. En ambientes reductores DOX-SS-CSO-SA presentaba una alta captación celular y una rápida liberación de DOX, debido a la degradación reductiva de los puentes disulfuro. Ensayos de actividad antitumoral *in vitro* mostraron que DOX-SS-CSO-SA presentaba mejor citotoxicidad contra células resistentes al DOX que la DOX libre. DOX-SS-CSO-SA además alteraba la distribución del fármaco *in vivo*, lo que suponía una acumulación específica en el sitio del tumor y una baja acumulación en el corazón. Estudios antitumorales *in vivo* mostraron que DOX-SS-CSO-SA causaba una supresión en el crecimiento tumoral y aliviaba las lesiones cardíacas inducidas por DOX. Por lo tanto, DOX-SS-CSO-SA es un sistema de administración de fármaco potencial para el tratamiento del cáncer seguro y eficaz (Su y cols., 2015).

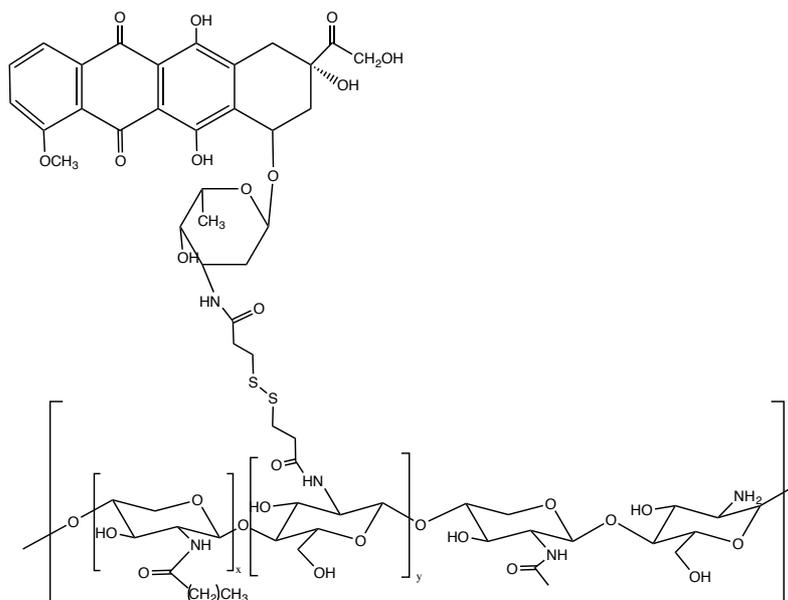


Figura 11. Estructura química del conjugado DOX-SS-CSO-SA.

La administración oral de fármacos antitumorales, está a veces obstaculizada por su hidrofobicidad extremadamente alta (Lipinski, 2002). Por tanto, el desarrollo de formas adecuadas de formulación es de gran importancia para mejorar la biodisponibilidad de los fármacos anticancerígenos poco hidrosolubles. Un conjugado de quitosano de bajo peso molecular con PTX (LMWC-PTX) se preparó y evaluó como portador para la administración oral de PTX (Lee y cols., 2008) (Figura 12). Comparado con el quitosano de alto peso molecular, el de bajo peso molecular (menos de 10 kDa) muestra características más favorables, como baja toxicidad y alta solubilidad. Estudios de biodistribución mostraron que LMWC-PTX era absorbido en el intestino delgado tras la administración oral, y permanecía en su forma conjugada hasta alcanzar la circulación sanguínea.

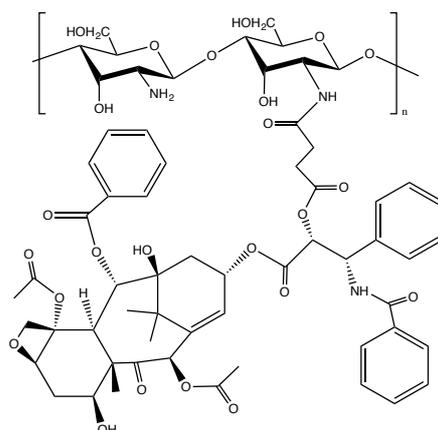


Figura 12. Estructura química del conjugado LMWC-PTX con enlaces succinato.

5.3.- CONJUGADOS DE FÁRMACOS BASADOS EN ÁCIDO HIALURÓNICO

El ácido hialurónico o hialuronano (HA) es un polisacárido polianiónico que encontramos en abundancia en la matriz extracelular (ECM) y fluidos sinoviales (Laurent y Fraser, 1992; Lapcik y cols., 1998). A diferencia de otros glicosaminoglicanos, HA no contiene grupos sulfato o residuos de ácido urónico epimerizado. HA juega un papel importante en la estructura y organización de ECM, y regula varias funciones celulares, tales como el crecimiento, diferenciación y migración celular (Toole, 2004). Cuando se aplican bajas concentraciones de hialuronano a las células madre, se mejora la actividad proliferativa. Sin embargo, en altas concentraciones, las células madre adquieren un estado latente e inducen un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos. Debido a la influencia de hialuronano en las células y la morfogénesis de tejidos, con respecto a la cardiogénesis, condrogénesis, la osteogénesis, y la neurogénesis, ahora se ha utilizado como un biomaterial para la regeneración de tejidos (Solis y cols., 2012). La principal función biológica de HA se atribuye a sus interacciones con varios receptores e unión del HA, tales como la glicoproteína CD44 de la superficie celular, un receptor para la motilidad mediado por HA (RHAMM), receptores de HA para endocitosis (HARE) y un receptor endocítico del vaso linfático (LYVE-1) (Toole, 2004). Además de su afinidad por estos receptores (sobre expresados en células tumorales) el uso de HA como técnica para el direccionamiento de fármacos a tejidos tumorales se debe a su biocompatibilidad y a su capacidad de biodegradación (Rao y cols., 2016). Varios tumores como el epitelial, el de colon, el cáncer de ovarios, son conocidos por sobre expresar los receptores de unión del HA (CD44 y RHAMM). Como consecuencia, estas células tumorales mejoran la unión y la internalización de HA. A pesar del hecho de que los actuales mecanismos de interacción CD44-HA no se comprenden por completo, estudios han demostrado, que el receptor CD44 contiene dominios específicos de unión (formado por 160 residuos de aminoácidos) para HA y su afinidad de unión aumenta conforme lo hace el PM de HA, debido a la posibilidad de múltiples interacciones (Platt y Szoka, 2008). Estudios de biodistribución de nanopartículas autoensambladas de HA demostraron que éstas pueden circular durante al menos dos días por el torrente sanguíneo y acumularse en el sitio del tumor mediante la combinación de mecanismos de direccionamiento activos y pasivos (Choi y cols., 2009; Choi y cols., 2010).

Para desarrollar de forma exitosa una nanomedicina basada en HA, los conjugados y nanopartículas a base de HA deben sintetizarse sin causar un deterioro significativo de las propiedades intrínsecas de HA, ya que la modificación química del mismo con fármacos o moléculas hidrófobas podría reducir la afinidad de unión de HA a sus receptores (Rao y cols., 2016).

El HA ha sido conjugado a varios fármacos incluyendo PTX, MMC, Epirubicina, antibióticos antraciclínicos (tales como DOX y DNM), y ácido urónico (ácido graso de cadena corta

conocido por inducir la diferenciación celular e inhibir el crecimiento de varias células tumorales) (Luo y Prestwich, 1999; Coradini y Perbellini, 2004). Un enfoque sintético reciente para la preparación de conjugados HA-PTX fue llevado a cabo por Prestwich et al. (Luo y Prestwich, 1999; Luo y cols., 2000). Los conjugados HA-PTX (Figura 13) mostraron *in vitro* una citotoxicidad selectiva contra células cancerígenas con CD44 sobre expresado, y varios estudios demostraron que las interacciones entre el conjugado y las células podrían ser bloqueadas mediante HA y anti-CD44 (Luo y cols., 2000). Esto sugiere que la toxicidad selectiva del conjugado se debe al receptor mediador de endocitosis. El aumento de citotoxicidad en células cancerígenas podría asociarse con la absorción celular del conjugado, seguida de la liberación hidrolítica del fármaco. Por otro lado, la conjugación de PTX a HA disminuye la solubilidad y altera la estructura del HA, lo que disminuye la afinidad de unión de HA al receptor, resultando también disminuida la toxicidad (Luo y Prestwich, 1999).

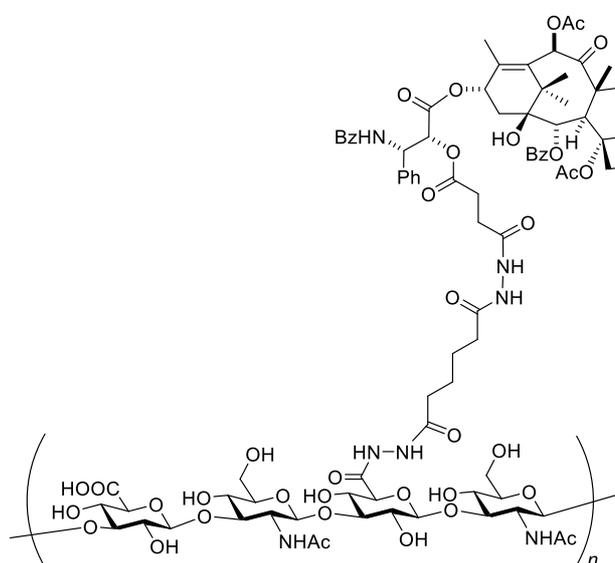


Figura 13. Estructura del conjugado HA-PTX preparado usando HA de bajo peso molecular modificado con la dihidrazida del ácido adípico.

Tabrizian et al. prepararon un profármaco macromolecular HA-PTX conjugando el derivado de PTX, 2'-hemisuccinoylato a amina-HA modificado y construyeron multicapas de polielectrolitos (PEMs) (Thierry y cols., 2005). Estos PEMs constituyen una estrategia para la encapsulación de moléculas bioactivas y la mejora de la farmacocinética del fármaco. La hidrofobicidad intrínseca y la baja solubilidad de HA en la mayoría de solventes orgánicos ha limitado una fácil conjugación de fármacos hidrofóbicos al esqueleto de HA. Recientemente, se llevó a cabo un método simple de nanocomplejación usando HA en una única fase orgánica para preparar HA-PTX con una carga de fármaco de un 10.8% (Lee y cols., 2008).

En los últimos años una serie de conjugados de fármacos basado en HA (ONCOFID™) se han desarrollados mediante la conjugación covalente de fármacos citotóxicos, tales como PTX,

CPT, DOX y Platino, al esqueleto de HA directamente, o a través de espaciadores. De esta manera se desarrolló un conjugado HA-PTX (ONCOFID-P) con un contenido en fármaco del 20% (Rosato y cols., 2006). La actividad inhibitora del conjugado *in vitro* resultó mucho mayor que la del PTX libre frente al receptor-CD44, en células de carcinoma de vejiga RT4 y RT112/84. Los conjugados eran estables en orina humana (pH 6.5) y no se detectó fármaco libre durante 6 horas de incubación. De forma similar la concentración de PTX en sangre era despreciable tras la instalación intra-vejiga del conjugado. Además, exámenes histológicos revelaron que los conjugados eran bien tolerados y no producían cambios morfológicos significativos en el epitelio urinario, mientras el PTX libre producía efectos tóxicos importantes en la vejiga (Banzato y cols., 2008). La biodistribución *in vivo* del conjugado fue evaluada tras la administración intravenosa, intravesical, oral o intraperitoneal en ratones BALB/c. Los resultados mostraron una mayor absorción en hígado y bazo para los conjugados inyectados por vía intravenosa, mientras que aquellos administrados localmente permanecían en el lugar de administración (Banzato y cols., 2009). Recientemente, la bioactividad del conjugado fue evaluada mediante dos modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* para el tratamiento intraperitoneal (IP) del cáncer de ovario. De esta forma se evaluó el efecto citotóxico *in vitro* del ONCOFID-P en líneas celulares de cáncer de ovario humano CD44 (+), OVCAR-3 y Skov-3. Los ensayos se realizaron con ratones hembra enfermos a los que se trató con ONCOFID-P IP y PTX libre de forma IP e intravenosa (IV) a su dosis máxima tolerada. Los resultados mostraron que la citotoxicidad del ONCOFID-P contra estas dos líneas celulares era un poco menos eficaz que la de el PTX libre en los ensayos *in vitro*, pero que por el contrario, en el tratamiento *in vivo* el ONCOFID-P IP resultaba en general más eficaz que el PTX libre tanto en la inhibición de la diseminación intraabdominal, en la producción de ascitis, en la prolongación de la supervivencia y en la curación de los ratones. De esta forma los datos actuales apoyan el uso de ONCOFID-P para el tratamiento locoregional del cáncer de ovario (De Stefano y cols., 2011). El ONCOFID-P está en fase II de evaluación para el tratamiento de cáncer de vejiga refractario y en la fase I para el tratamiento de cáncer peritoneal.

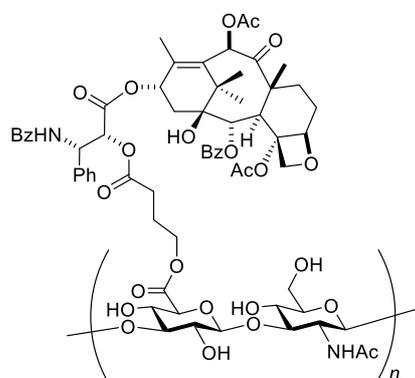


Figura 14. Estructura del ONCOFID-P.

Nanosistemas basados en profármacos es una de las estrategias más prometedoras en cuanto a aumentar la liberación de fármacos en el tratamiento de enfermedades. Un ejemplo de estos nanosistemas está basado en el conjugado HA-PTX (HA-PTX Ns), que penetra a través de las membranas celulares en el citosol, mejorando así la entrega de PTX. Es importante destacar que a diferencia de otros nanosistemas basados en profármacos, HA-PTX Ns consigue entrar en la célula sin quedar atrapado dentro del sistema lisosomal-endosomal, mediante el uso de varias vías, como endocitosis mediada por catrina, internalización asociada a microtúbulos, macropinocitosis y colesterol-dependiente. Debido a su acumulación en tejido tumoral HA-PTX Ns disminuía hasta 4 veces el volumen del tumor en 4 días en comparación con el PTX libre (Xu y cols., 2015).

Actualmente, conjugados a base de HA se están usando en una nueva estrategia conocida como quimioinmunoterapia, la cual combina la quimioterapia basada de fármacos anticancerígenos con inmunoterapia basada en activadores inmunológicos para eliminar o inhibir el crecimiento de células tumorales. De esta forma, se han realizado estudios, en los que el PTX insoluble en agua se dispersa usando HA para generar un antígeno asociado al tumor en el microambiente tumoral. Los resultados de dicho estudio sugieren que el tratamiento secuencial de las células cancerígenas con un agente quimioterapéutico y nanomateriales inmunomoduladores representa una estrategia prometedora para la terapia del cáncer de forma eficiente (Heo y cols., 2015).

5.4.- CONJUGADOS DE FÁRMACOS BASADOS EN HEPARINA

La heparina, un polisacárido altamente sulfatado, consiste en unidades repetitivas compuestas de unidades de glucosamina asociadas mediante uniones $\beta(1-4)$ a ácido glucurónico. La heparina presenta numerosas variaciones estructurales: tanto el ácido urónico como la glucosamina pueden estar sustituidos por grupos sulfatos en el anillo de piranosa. Además de su actividad anticoagulante, la heparina tiene muchas otras funciones fisiológicas asociadas a su interacción con diversas proteínas, tales como la inhibición del crecimiento de células del músculo liso, regulación del metabolismo lipídico, unión a factores de crecimiento ácidos y básicos del fibroblasto (FGFs), inducción de la apoptosis, e inhibición de la angiogénesis y metástasis tumoral (Casu y Lindahl, 2001; Garg y cols., 2000).

La angiogénesis —formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes— es un proceso fundamental en multitud de condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo el crecimiento tumoral, metástasis e inflamación. Este proceso abarca una intensa interacción entre células, factores solubles, y la matriz extracelular (ECM). Las células cancerosas producen numerosos factores de crecimiento angiogénico, tales como factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y FGF básico. Varios estudios han demostrado que la heparina es efectiva en la inhibición de VEGF y de la angiogénesis mediada por FGF básico (Norrby, 1993; Norrby y

Ostergaard, 1996). A pesar de los efectos beneficiosos de la heparina en la terapia contra el cáncer, su fuerte actividad anticoagulante limita sus aplicaciones terapéuticas a altas dosis y en tratamientos de larga duración. Por tanto, hay un alto interés en el desarrollo de derivados de heparina modificada químicamente para reducir su actividad anticoagulante y aumentar sus efectos inhibidores en el crecimiento tumoral y en la metástasis.

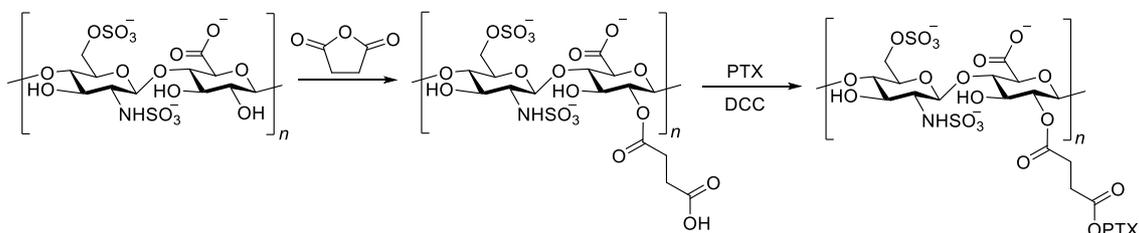


Figura 15. Esquema sintético para la preparación de conjugados de Heparina-PTX.

Xian et al. prepararon conjugados de heparina-PTX (Wang y cols., 2009) (Figura 15). La velocidad de liberación de PTX del conjugado con el espaciador ácido aumentaba progresivamente en presencia de la enzima esterasa, mientras que el conjugado sin espaciador era altamente más estable bajo condiciones fisiológicas y enzimáticas. Como resultado de la modificación química, la actividad anticoagulante del conjugado PTX-heparina era significativamente menor que la de la heparina, debido a que la unión del PTX a la heparina inducía un cambio conformacional en la estructura de la misma, reduciendo así la afinidad a la antitrombina III.

Recientemente se han realizado estudios a cerca de conjugados de fármacos basados en heparina, ya que ésta tiene la capacidad de autoensamblarse en agua, formando micelas esféricas. Dichas micelas pueden cargarse covalentemente conectando PTX a grupos hidroxilo de la heparina mediante un enlace aconítico como espaciador sensible al pH, o bien pueden cargarse con DOX·Cl y ácido fólico catiónico (CFA) mediante interacciones electrostáticas en disolución acuosa. A continuación se estudió la captación celular y la distribución intracelular de dichos conjugados mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM), de manera que se llegó a concluir que la heparina es una plataforma versátil para el diseño de portadores inteligentes de fármacos (Li y cols., 2016).

Se han desarrollado múltiples sistemas de administración de fármacos antitumorales basados en heparina buscando responder a la necesidad de un sistema de administración ideal que debería ser: biocompatible, responder a estímulos, multifuncional (incluyendo actividad antitumoral, antimetastásica y prevenir efectos angiogénicos). Una buena aproximación sería un sistema a base de DOX y heparina en nanopartículas que se autoensamblan mediante enlace hidrazona sensible al pH y grupos hidrófobos. Dicha nanopartícula micelar HD-DOX al contar con

heparina presenta funciones biológicas tales como antiangiogénesis y efecto antimetastásico, además de presentar una buena estabilidad y capacidad de liberación del fármaco mediada por el pH. Tras su administración sistémica se observó una mayor acumulación de DOX en zonas tumorales (Mei y cols., 2016).

Por último, cabe destacar de la heparina su aporte a la obtención de imágenes biomédicas. Esta técnica consiste en la administración de agentes de formación de imagen, como las nanopartículas de oro que forman nanopartículas con heparina, para la obtención de imágenes biomédicas no invasivas (Nurrunnabi y cols., 2012).

5.5.- CONJUGADOS DE FÁRMACOS BASADOS EN PULULANO

El pululano es un exopolisacárido producido a partir del almidón por un hongo polimorfo *Aureobasidium pullulans*. Su estructura química se compone de maltotriosa unida por enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 en proporción 2:1 (Leathers, 2002). El pululano se puede derivar químicamente dotándole de nuevas y útiles propiedades fisicoquímica con aplicaciones específicas. La introducción de un grupo carboxilo en el esqueleto del pululano aumenta su resistencia a la amilasa, lo que permite controlar su velocidad de degradación *in vivo* (Shingel, 2004). El derivado sulfatado del pululano tiene una función similar a los agentes anticoagulantes tales como la heparina y el Dex sulfato. La bioactividad del pululano sulfatado se ve influenciada por varios factores, tales como el peso molecular y el grado de sustitución de los grupos sulfato (Alban y cols., 2002). Además el pululano se une selectivamente a los receptores de las asialoglicoproteínas (ASGPs), que se expresan exclusivamente en la superficie de las células parenquimales del hígado (Kaneo y cols., 2001). Esta habilidad inherente al pululano ha sido ampliamente explotada para la liberación direccionada de fármacos y genes al hígado (Hosseinkhani y cols., 2002; Na y cols., 2003). Recientemente se han realizado ensayos con derivados del pululano para prevenir adherencias abdominales que se puedan dar como consecuencia de una inflamación, una cirugía o una lesión y que podrían llegar a causar complicaciones graves como dolor postoperatorio, obstrucción intestinal e infertilidad (Bang y cols., 2016).

Nosuga et al. investigaron el potencial del carboximetil-pululano (CM-Pul) como un portador de fármacos antitumorales (Nosuga y cols., 1995). Conjugaron el grupo amino de DOX a CM-Pul (Figura 16a) a través de varios espaciadores tetrapéptidos, incluyendo Gly-Gly-Phe-Gly (CM-Pul-DOX I), Gly-Phe-Gly-Gly (CM-Pul-DOX II) y Gly-Gly-Gly-Gly (CM-Pul-DOX III). Debido a su naturaleza anfipática, los conjugados se autoensamblaban en soluciones fisiológicas formando micelas. La cantidad de DOX liberada del conjugado CM-Pul-DOX I en presencia de enzimas lisosomales del hígado era de un 35% en 24 horas, mientras que no había liberación de DOX por parte de los conjugados sin espaciadores. Los efectos antitumorales de estos

conjugados en ratas portadoras de Walker 256 fueron estudiados monitorizando el peso del tumor tras una única inyección intravenosa a una dosis de 0,8 mg/Kg de DOX. Comparado al DOX libre, los conjugados de CM-Pul-DOX I y CM-Pul-DOX II suprimían significativamente el crecimiento del tumor, mientras que CM-Pul-DOX III mostraba menos efectos antitumorales que el DOX libre. Los conjugados sin espaciadores no mostraban efectos antitumorales *in vivo*, incluso a la dosis de 20 mg/Kg de DOX.

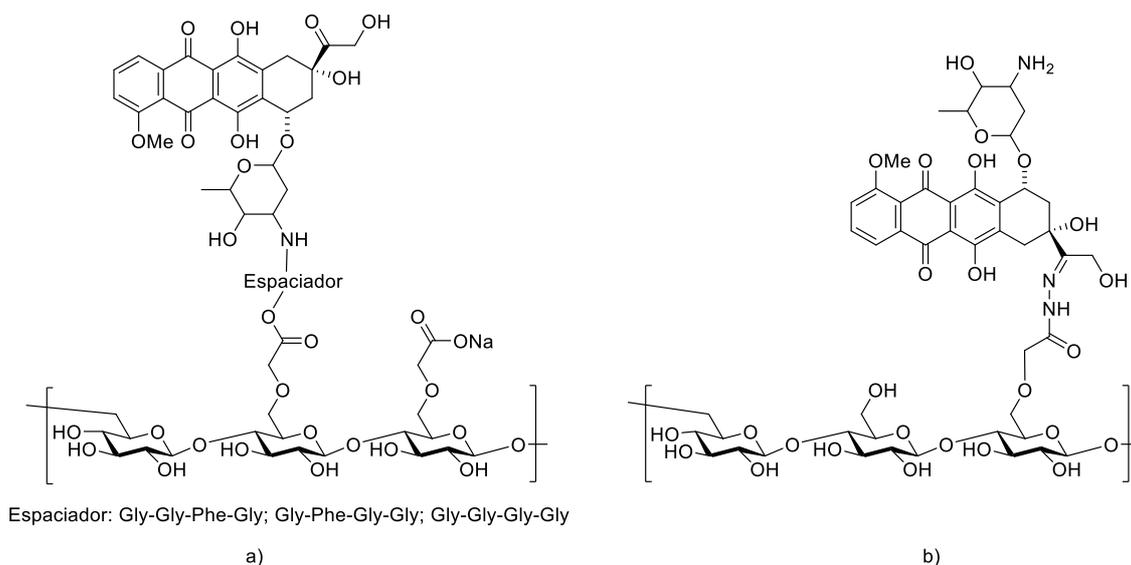


Figura 16. Estructura de: a) Conjugado CM-Pul-péptido-DOX y b) Conjugado Pululano-DOX sensible al pH.

De forma similar, se preparó un conjugado de pululano-fármaco sensible al pH, mediante la conjugación covalente de DOX a CM-Pul a través de un enlace hidrazona (Lu y cols., 2009) (Figura 16b). Los conjugados formaron nanopartículas con cargas negativas en sus superficies, lo que mostraba una baja toxicidad en las células de cáncer de mama de ratón 4T1. Debido a la presencia del enlazador sensible al pH la liberación *in vitro* de DOX de los conjugados a pH 5 era más rápida que a pH 7.

Otro conjugado interesante es el de pululano galactosilatado-curcumina (LANH2-Pull-Ald-Cur-SA), que se ha desarrollado con el objetivo de la liberación específica de la curcumina en las células de hepatocarcinoma. Dicho conjugado se ha sintetizado en 5 pasos: 1) oxidación del pululano (Pull-Ald), 2) introducción del grupo amino al ligando de direccionamiento (LANH2), 3) conexión de LANH2 a Pull-Ald, 4) modificación de la curcumina (Cur-SA) y 5) la conjugación de Cur-SA a pululano. El conjugado de pululano no galactosilatado-curcumina (Pull-Cur-SA) también se preparó para comparar la mejora en la citotoxicidad ofrecida por el grupo de orientación. Tanto LANH2-Pull-Ald-Cur-SA como Pull-Cur-SA podrían autoensamblarse en agua en micelas con diámetros hidrodinámicos de 355 ± 9 nm y 363 ± 10 nm, respectivamente. Ambos conjugados presentaban una estructura esférica y mejoraban la

estabilidad de la curcumina en pH fisiológico. En comparación con Pull-Cur-SA, LANH2-Pull-Ald-Cur-SA exhibe mayor toxicidad y mayor internalización por parte de las células HepG2. Esto indica una absorción mejorada por parte del conjugado LANH2-Pull-Ald-Cur-SA a través de endocitosis mediada por el receptor de las asialo-glicoproteínas en células HepG2 (Sarika y cols., 2015).

Cabe destacar por último el caso de un bioconjugado a base de pululano (Pull), diseñado para atacar selectivamente a metástasis óseas, utilizando un resto de bisfosfonato (alendronato, ALN). Para ello primero se conjugó covalentemente el PTX al Pull a través de un tetrapéptido sensible a la captasina-K, seguido de un espaciador autodestructivo alcohol aminobenzílico, para obtener Pull-(GGPNle- ϕ -PTX). A continuación ALN se conjugó al esqueleto polimérico de Pull-(GGPNle- ϕ -PTX) usando PEG como espaciador, obteniendo finalmente Pull-(GGPNle- ϕ -PTX)-(PEG-ALN), que forma estructuras coloidales esféricas que resultan física y químicamente estables bajo condiciones fisiológicas. Estudios *in vitro* mostraron que dicho bioconjugado poseía una gran afinidad hacia la hidroxipatita, que simula el tejido óseo. Por otro lado el PTX se liberaba rápidamente del bioconjugado por escisión por acción de la captasina-k bajo condiciones patológicas (Bonzi y cols., 2015).

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La conjugación de fármacos antitumorales a portadores macromoleculares ha resultado ser una estrategia efectiva a la hora de maximizar los efectos terapéuticos de estos fármacos evitando, al mismo tiempo, los efectos secundarios. Los polisacáridos naturales tienen un enorme potencial para el diseño de conjugados macromoleculares de fármacos debido a su hidrofília, biocompatibilidad, capacidad de biodegradación, fácil modificación química, y sus características fisicoquímicas. A lo largo de este trabajo hemos tratado las distintas estrategias de síntesis y el reciente desarrollo de numerosos conjugados de fármacos basados en polisacáridos, direccionados a distintos tipos de tumores. Comenzando con el direccionamiento pasivo de los fármacos antitumorales al tejido canceroso mediante la simple conjugación de dichos fármacos a polisacáridos, en los últimos años se ha investigado mucho a cerca de nuevos conjugados que pudieran liberar el fármaco en el tejido tumoral de forma selectiva gracias a un mecanismo de direccionamiento activo. La captación selectiva y activa de estos conjugados en las células tumorales podría lograrse tanto mediante la conjugación de una molécula bio-reconocible al esqueleto del polisacárido (ej. Conjugado folato-heparina-PTX), como mediante la conjugación directa de fármacos a polisacáridos que posean una capacidad inherente de reconocer receptores específicos de las células tumorales (ej. Conjugados HA-fármacos). También varios ligandos, como ligandos ácido-sensibles (ej. *Cis*-aconitil y enlaces hidrazona),

enlaces escindibles enzimáticamente o enlaces sensibles a reducciones, han sido utilizados para asegurar la liberación controlada del fármaco en el tejido diana.

Sin embargo, un funcionamiento exitoso de estos conjugados macromoleculares de fármacos requiere de la optimización de varios parámetros como, características del portador macromolecular, características de la molécula espaciadora entre fármaco y portador, estabilidad de dicho espaciador en la circulación vascular, liberación del fármaco en el tejido diana, y una comprensión más detallada del microambiente tumoral. Por ello, a pesar de todos los aspectos prometedores de esta terapia, en comparación con otros polímeros sintéticos (biodegradables), solo algunos conjugados de fármacos basados en polisacáridos han entrado en fase de ensayos clínicos. Recientemente, el conjugado OX-Dex-DOX ha mostrado una toxicidad significativa en los estudios de fase I, posiblemente debido a la toxicidad del portador OX-Dex. Por lo tanto, resulta importante el hecho de que la modificación de los polisacáridos no altere sustancialmente sus características fisicoquímicas o biológicas.

En los últimos años, la combinación de terapias utilizando conjugados portadores de dos agentes quimioterapéuticos ha ofrecido nuevas esperanzas a la hora de mejorar el potencial terapéutico, ya que pueden atacar las células tumorales a través de múltiples mecanismos e inhibir así de forma efectiva el crecimiento tumoral.

En conclusión, es evidente que los conjugados de fármacos basados en polisacáridos tienen un potencial muy prometedor en la terapia antitumoral y van a constituir una nueva vía muy importante en el camino a seguir para reducir la mortalidad asociada a esta enfermedad.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aiba SI. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *Int J Biol Macromol.* 1992; 14: 225-228.
- Alban S, Schauerte A, Franz G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydr Polym.* 2002; 47: 267-276.
- Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, Hennink WE. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62: 59-82.
- Aspinall G. *The Polysaccharides.* Academic Press, New York. 1982.
- Bang S, Lee E, Ko Y-G, Kim W Il, Kwon OH. Injectable pullulan hydrogel for the prevention of postoperative tissue adhesion. *Int J Biol Macromol.* 2016; 87: 155–62.
- Banzato A, Bobisse S, Rondina M, Renier D, Betella F, Esposito G et al. A paclitaxel-hyaluronan bioconjugate targeting ovarian cancer affords a potent in vivo therapeutic activity. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 3598- 3606.
- Banzato A, Rondina M, Meléndez-alafort L, Zangoni E, Nadali A, Renier D et al. Biodistribution imaging of paclitaxel-hyaluronan bioconjugate. *Nucl Med Biol.* 2009; 36: 525-533.
- Basu A, Kunduru KR, Abtey E, Domb AJ. Polysaccharide-Based Conjugates for Biomedical Applications. *Bioconjug Chem.* 2015; 26(8): 1396–412.
- Bonzi G, Salmaso S, Scomparin A, Eldar-Boock A, Satchi-Fainaro R, Caliceti P. Novel pullulan bioconjugate for selective breast cancer bone metastases treatment. *Bioconjug Chem.* 2015; 26(3): 489–501.
- Cao Y, Chen D, Zhao P, Liu L, Huang X, Qi C, et al. Intracellular delivery of mitomycin C with targeted polysaccharide conjugates against multidrug resistance. *Ann Biomed Eng.* 2011; 39(9): 2456–65.
- Casu B, Lindahl U. Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 2001; 57: 159-206
- Chau Y, Tan FE, Langer R. Synthesis and characterization of dextran-peptide-methotrexate conjugates for tumor targeting via mediation by matrix metalloproteinase II and matrix metalloproteinase IX. *Bioconjug Chem.* 2004; 15: 931-941.
- Chen C1, Zhou JL, Han X, Song F, Wang XL WY. A prodrug strategy based on chitosan for efficient intracellular anticancer drug delivery. *Nanotechnology.* 2014; 25(25): 255101.
- Choi KY, Chung H, Min KH, Yoon HY, Kin K, Park JH et al. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. *Biomaterials.* 2010; 31: 106-114.
- Choi KY, Min KH, Na JH, Choi K, Kim K, Park JH et al. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: synthesis, characterization, and in vivo biodistribution. *J Mater Chem.* 2009; 19: 4102-4107.
- Christie RJ, Grainger DW. Design strategies to improve soluble macromolecular delivery constructs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 55: 421-437.

Coradini D, Perbellini A. Hyaluronan: a suitable carrier for an histone deacetylase inhibitor in the treatment of human solid tumors. *Cancer Ther.* 2004; 2: 201-216.

Danhauser-Riedl S, Hausmann E, Schick HD, Bender R, Dietzfelbinger H, Rastetter J et al. Phase I clinical and pharmacokinetic trial of dextran conjugated doxorubicin (AD-70, DOX-OXD). *Invest New Drugs.* 1993; 11: 187-195.

Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7: 771-782.

De Stefano I, Battaglia A, Zannoni GF, Prisco MG, Fattorossi A, Travaglia D, et al. Hyaluronic acid-paclitaxel: effects of intraperitoneal administration against CD44(+) human ovarian cancer xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011; 68(1): 107–16.

Dragojevic S, Ryu JS, Raucher D. Polymer-Based Prodrugs: Improving Tumor Targeting and the Solubility of Small Molecule Drugs in Cancer Therapy. *Molecules.* 2015; 20(12): 21750–69.

Eshita Y, Ji R-C, Onishi M, Kobayashi T, Mizuno M, Yoshida J, et al. Medicinal facilities to B16F10 melanoma cells for distant metastasis control with a supramolecular complex by DEAE-dextran-MMA copolymer/paclitaxel. *Drug Deliv Transl Res.* 2015; 5(1): 38–50.

Garg HG, Thomson BT, Hales CA. Structural determinants of antiproliferative activity of heparin on pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 2000; 279: L779-L789.

Hashida M, Takakura Y, Matsumoto S, Sasaki H, Kato A, Kojima T et al. Regeneration characteristics of mitomycin C-dextran conjugate in relation to its activity. *Chem Pharm Bull.* 1983; 31: 2055-2063.

Heinrich A-K, Lucas H, Schindler L, Chytil P, Etrych T, Mäder K, et al. Improved tumor specific drug accumulation by polymer therapeutics with pH-sensitive drug release overcomes chemotherapy resistance. *Mol Cancer Ther [Internet].* 2016 Mar 3 [cited 2016 Mar 15]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26939698>

Heo MB, Kim S-Y, Yun WS, Lim YT. Sequential delivery of an anticancer drug and combined immunomodulatory nanoparticles for efficient chemoimmunotherapy. *Int J Nanomedicine.* 2015; 10: 5981–92.

Hosseinkhani H, Aoyama T, Ogawa O, Tabata Y. Liver targeting of plasmid DNA by pullulan conjugation based on metal coordination. *J Control Release.* 2002; 83: 287-302.

Hu L, Sun Y, Wu Y. Advances in chitosan-based drug delivery vehicles. *Nanoscale.* 2013; 5(8): 3103–11.

Jeong Y-I, Chung K-D, Choi KC. Doxorubicin release from self-assembled nanoparticles of deoxycholic acid-conjugated dextran. *Arch Pharm Res.* 2011; 34(1): 159–67.

Kandra P1 KH. Current understanding of synergistic interplay of chitosan nanoparticles and anticancer drugs: merits and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015; 99(5): 2055–64.

Kanao Y, Tanaka T, Nakano T, Yamaguchi Y. Evidence for receptor-mediated hepatic uptake of pullulan in rats. *J Control Release.* 2001; 70: 365-373.

Kato Y, Onishi H, Machida Y. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. *Curr Pharm Biotechnol.* 2003; 4(5): 303–9.

- Kato Y, Onishi H, Machida Y. Evaluation of N-succinyl-chitosan as a systemic long-circulating polymer. *Biomaterials*. 2000; 21: 1579-1585.
- Kikukawa A, Munechika K, Ueda Y, Yamanouchi K, Yokoyama K, Tsukagosh S. Tissue concentration of adriamycin and adriamycin-oxidized dextran conjugate in tumor bearing rats and mice. *Drug Deliv Syst*. 1990; 5: 255-260.
- Kojima T, Hashida M, Muranishi S, Sezaki H. Mitomycin C-dextran conjugate: a novel high molecular weight pro-drug of mitomycin C. *J Pharm Pharmacol*. 1980; 32: 30-34.
- Kumar MNVR, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, SashiwaH, Domb AJ. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev*. 2004; 104: 6017-6084.
- Lam W, Chan H, Yang M, Cheng S, Fong W. Synergism of energy starvation and dextran-conjugated doxorubicin in the killing of multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Anti-Cancer Drugs*. 1999;10: 171-178.
- Lapcik L, De Smedt S, Demeester J, Chabreck P. Hyaluronan: preparation, structure, properties and applications. *Chem Rev*. 1998; 98: 2663-2684.
- Laurent T, Fraser J. Hyaluronan. *FASEB J*. 1992; 6: 2397-2404.
- Leathers TD. Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes. En: Steinbüchel A, Vandamme EJ, De Baets S. *Biopolymers*. 6th ed. Weinheim; 2002. p.1-35.
- Lee E, Lee J, Lee IH, Yu M, Kim H, Chae SY et al. Conjugated chitosan as a novel platform for oral delivery of paclitaxel. *J Med Chem*. 2008; 51: 6442-6449.
- Lee H, Lee K, Park TG. Hyaluronic acid-paclitaxel conjugate micelles: synthesis, characterization and antitumor activity. *Bioconjug Chem*. 2008; 19: 1319-1325.
- Lee KD, Choi S-H, Kim DH, Lee H-Y, Choi K-C. Self-organized nanoparticles based on chitosan-folic acid and dextran succinate-doxorubicin conjugates for drug targeting. *Arch Pharm Res*. 2014; 37(12): 1546–53.
- Leitner VM, Walker GF, Bernkop-Schnürch A. Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins. *Eur J Pharm Biopharm*. 2003; 56: 207-214.
- Levi-Schaffer F, Bernstein A, Meshorer A, Arnon R. Reduced toxicity of danorubicin by conjugation to dextran. *Cancer Treat Rep*. 1982; 66: 107-114.
- Li M, Tang Z, Zhang Y, Lv S, Li Q, Chen X. Targeted delivery of cisplatin by LHRH-peptide conjugated dextran nanoparticles suppresses breast cancer growth and metastasis. *Acta Biomater*. 2015; 18: 132–43.
- Li Q, Gan L, Tao H, Wang Q, Ye L, Zhang A, et al. The synthesis and application of heparin-based smart drug carrier. *Carbohydr Polym*. 2016; 140: 260–8.
- Lipinski C. Poor aqueous solubility- an industry wide problem in drug discovery. *Am Pharm Rev*. 2002; 5: 82-85.
- Lu D, Wen X, Liang J, Gu Z, Zhang X, Fan Y. A pH-sensitive nano drug delivery system derived from pullulan/ doxorubicin conjugate. *J Biomed Mater Res*. 2009; 89B: 177-183.
- Luo Y, Prestwich GD. Synthesis and selective cytotoxicity of hyaluronic acid- antitumor bioconjugate. *Bioconjug*. 1999; 10: 755-763.

- Luo Y, Ziebell MR, Prestwich GD. A hyaluronic acid. Taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells. *Biomacromolecules*. 2000; 1: 208-218.
- Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review *J Control Release*. 2000; 65: 271-284.
- Marchal S, El Hor A, Millard M, Gillon V, Bezdetnaya L. Anticancer Drug Delivery: An Update on Clinically Applied Nanotherapeutics. *Drugs*. 2015; 75(14): 1601–11.
- Mei L, Liu Y, Zhang H, Zhang Z, Gao H, He Q. Antitumor and Antimetastasis Activities of Heparin-based Micelle Served As Both Carrier and Drug. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016; 8(15): 9577–89.
- Mocanu G, Constantin M, Carpov A. Chemical reactions on polysaccharides, 5. Reaction of mesyl chloride with pullulan. *Angew Macromol Chem*. 1996; 241: 1-10.
- Modi S, Prakash Jain J, Domb AJ, Kumar N. Exploiting EPR in polymer drug conjugate delivery for tumor targeting. *Curr Pharm Des*. 2006; 12(36): 4785–96.
- Móra M, Pató J. Polymeric prodrugs, 8. Synthesis and hydrolytic behaviour of dextran-bound anti-cancer agents. *Macromol Chem*. 1990; 191: 1051-1056.
- Munehika K, Sogame Y, Kishi N, Kawabata Y, Ueda Y, Yuamanouchi K et al. Tissue distribution of macromolecular conjugate, adriamycin linked to oxidized dextran, in rat and mouse bearing tumor cells. *Biol Pharmacol Bull*. 1994; 17: 1193-1198.
- Na K, Bum Lee T, Park KH, Shin EK, Lee YB, Choi HK. Self-assembled nanoparticles of hydrophobically-modified polysaccharide bearing vitamin H as a targeted anti-cancer drug delivery system. *Eur J Pharm Sci*. 2003; 18: 165-173.
- Nakashima M, Ichinose K, Kanematsu T, Masunaga T, Ohya Y, Ouchi T et al. In vitro characteristics and in vivo plasma disposition of cisplatin conjugated with oxidized and dicarboxymethylated dextrans. *Biol Pharm Bull*. 1999; 22: 756-761.
- Nichifor M, Mocanu G. Polysaccharide-drug conjugates as controlled drug delivery systems. En: Marchessault RH, Ravenelle F, Zhu XX. *Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications*. Oxford University Press; 2006. p.289-303.
- Nogusa H, Yano T, Okuno S, Hamana H, Inoue K. Synthesis of carboxymethylpullulan-peptide-doxorubicin conjugates and their properties. *Chem Pharm Bull*. 1995; 43: 1931-1936.
- Nomura T, Saikawa A, Morita S, Sakaeda T, Yamashita F, Honda K et al. Pharmacokinetic characteristics and therapeutic effects of mitomycin C-dextran conjugates after intratumoural injection. *J Control Release*. 1998; 52: 239-252.
- Norrby K, Ostergaard P. Basic-fibroblast-growth-factor-mediated de novo angiogenesis is more effectively suppressed by low-molecular-weight heparin. *Int J Microcirc*. 1996; 16: 8-15.
- Norrby K. Heparin and angiogenesis: a low-molecular-weight fraction inhibits and a high-molecular-weight fraction stimulated angiogenesis systemically. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 1993; 23 (1): 142-149.
- Nurunnabi M, Khatun Z, Moon W-C, Lee G, Lee Y-K. Heparin based nanoparticles for cancer targeting and noninvasive imaging. *Quant Imaging Med Surg*. 2012; 2(3): 219–26.

Ohya Y, Nonomura K, Hirai K, Ouchi T. Synthesis of 6-O-carboxymethylchitin immobilizing doxorubicins through tetrapeptide spacer groups and its enzymatic release behavior of doxorubicin in vitro. *Macromol Chem Phys*. 1994; 195: 2839-2853.

Ohya Y, Nonomura K, Ouchi T. In vivo and in vitro antitumor activity of CM-chitin immobilized doxorubicins by lysosomal digestible tetrapeptide spacer groups. *J Bioact Compat Polym*. 1995; 10: 223-234.

Ohya Y, Oue H, Nagatomi K, Ouchi T. Design of macromolecular prodrug of cisplatin using dextran with branched galactose units as targeting moieties to hepatoma cells. *Biomacromolecules*. 2001; 2: 927-933.

Park JH, Kwon S, Lee M, Chung H, Kim JH, Kim YS et al. Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing hydrophobic moieties as carriers for doxorubicin: in vivo biodistribution and anti-tumor activity. *Biomaterials*. 2006; 27: 119-126.

Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010; 62: 28-41.

Park K, Kim YS, Lee G, Park RW, Kim IS, Kim S et al. Tumor endothelial cell targeted cyclic RGD- modified heparin derivative: inhibition of angiogenesis and tumor growth. *Pharm Res*. 2008; 25: 2786-2798.

Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft für Pharm Verfahrenstechnik eV*. 2015; 93: 52-79.

Platt VM, Szoka FC. Anticancer therapeutics: Targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Mol Pharm*. 2008; 5: 474-486.

Qi J, Huang C, He F, Yao P. Heat-treated emulsions with cross-linking bovine serum albumin interfacial films and different dextran surfaces: effect of paclitaxel delivery. *J Pharm Sci*. 2013; 102(4): 1307-17.

Rao NV, Yoon HY, Han HS, Ko H, Son S, Lee M, et al. Recent developments in hyaluronic acid-based nanomedicine for targeted cancer treatment. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016; 13(2): 239-52.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci*. 2006; 31: 603-632.

Ringsdorf H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J Polym Sci PolymSymp*. 1975; 51: 135-153.

Rosato A, Banzato A, De Luca G, Reiner D, Bettella F, Pagano C et al. HYTAD1-p20: a new paclitaxel-hyaluronic acid hydrosoluble bioconjugate for treatment of superficial bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Invest*. 2006; 24: 207-215.

Sanchis J, Canal F, Lucas R, Vicent MJ. Polymer-drug conjugates for novel molecular targets. *Nanomedicine (Lond)*. 2010; 5(6): 915-35.

Saravanakumar G, Park JH, Kim K, Kwon Ich. Polysaccharide-Based Conjugates for tumor Targeting. En Kvatz, Senter P, Steinhagen H. *Drug Delivey in Oncology*. 1^a Ed. Weinheim (Germany). Wiley-VCH. Verlag and co. 2012. 701-746.

- Sarika PR, James NR, Nishna N, Anil Kumar PR, Raj DK. Galactosylated pullulan-curcumin conjugate micelles for site specific anticancer activity to hepatocarcinoma cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015; 133: 347–55.
- Schechter B, Pauzner R, Arnon R, Wilchek M. Cis-platinum (II) complexes of carboxymethyl-dextran as potential antitumor agents I. Preparation and characterization. *Cancer Biochem Biophys*. 1986; 8: 277-287.
- Sheldon K, Marks A, Baumal R. Sensivity of multidrug resistant KB-C1 cells to an antibody-dextran-adriamycin conjugate. *Anti-Cancer Res*. 1989; 9: 637-641.
- Shingel KI. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydr Res*. 2004; 339: 447-460.
- Solis MA, Chen Y-H, Wong TY, Bittencourt VZ, Lin Y-C, Huang LLH. Hyaluronan regulates cell behavior: a potential niche matrix for stem cells. *Biochem Res Int [Internet]*. 2012 [cited 2016 May 4]; 2012: 3469-72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22400115>
- Son YJ, Jang JS, Cho YW, Chung H, Park RW, Kwon IC et al. Biodistribution and anti-tumor efficacy of doxorubicin loaded glycol-chitosan nanoaggregates by EPR effect. *J Control Release*. 2003; 91: 135-145.
- Soyez H, Schacht E, Vanderkerken S. The crucial role of spacer groups in macromolecular prodrug design. *Adv Drug Deliv*. 1996; 21: 81-106.
- Su Y1, Hu Y1, Du Y1, Huang X2, He J1, You J1, Yuan H1 HF. Redox-responsive polymer-drug conjugates based on doxorubicin and chitosan oligosaccharide-g-stearic acid for cancer therapy. *Mol Pharm Mol Pharm*. 2015; 12(4): 1193–202.
- Sugahara SI, Kajiki M, Kuriyama H, Kobayashi TR. Complete regression of xenografted human carcinomas by paclitaxel-carboxymethyl dextran conjugate (AZ10992). *J Control Release*. 2007; 117: 40-50.
- Szabó I, Orbán E, Schlosser G, Hudecz F, Bánóczy Z. Cell-penetrating conjugates of pentaglutamylated methotrexate as potential anticancer drugs against resistant tumor cells. *Eur J Med Chem*. 201; 115: 361–8.
- Takakura Y, Kaneco Y, Fujita T, Hashida M, Maeda H, Sezaki H. Control of pharmaceutical properties of soybean trypsin inhibitor by conjugation with dextran I: synthesis and characterization. *J Pharm Sci*. 1989; 78: 117-121.
- Takakura Y, Matsumoto S, Hashida M, Sezaki H. Enhanced lymphatic delivery of mitomycin C conjugated with dextran. *Cancer Res*. 1984; 44: 2505-2510.
- Takakura Y, Takagi A, Hashida M, Sezaki H. Disposition and tumor localization of mitomycin C-dextran conjugates in mice. *Pharm Res*. 1987; 4: 293-300.
- Thierry B, Kujawa P, Tkaczyk C, Winnik FM, Bilodeau L, Tabrizian M. Delivery platform for hydrophobic drugs: prodrug approach combined with self-assembled multilayers. *J Am Chem Soc*. 2005; 127: 1626-1627.
- Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 528-539.
- Totaro K, Liao X, Bhattacharya K, Finneman JI, Sperry JB, Massa MA, et al. Systematic Investigation of EDC/sNHS-Mediated Bioconjugation Reactions for Carboxylated Peptide

Substrates. *Bioconjug Chem* [Internet]. 2016 Mar 14 [cited 2016 Mar 15]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26974183>.

U.S. Department of Health and Human Services/National Institutes of Health. National Cancer Institute. 2016 [en línea] [consultado en Marzo 2016]. Disponible en: www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer

Ueda Y, Munechika K, Kikukawa A, Kanoh Y, Yamanouchi K, Yokoyama K. Comparison of efficacy, toxicity and pharmacokinetics of free adriamycin and adriamycin linked to oxidized dextran in rats. *Chem Pharm Bull*. 1989; 37: 1639-1641.

Wadhwa S, Mumper RJ. Polymer-Drug Conjugates for Anticancer Drug Delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2015; 32(3): 215–45.

Wang X, Li J, Wang Y, Cho KJ, Kin G, Gjyzezi A et al. HFT-T, a targeting nanoparticle, enhances specific delivery of paclitaxel to folate receptor-positive tumors. *ACS Nano*. 2009; 3: 3165-3174.

Wang Y, Xin D, Liu K, Xiang J. Heparin-paclitaxel conjugates using mixed anhydride as intermediate: synthesis, influence of polymer structure on drug release, anticoagulant activity and in vitro efficiency. *Pharm Res*. 2009; 26: 785-793.

Xu C, He W, Lv Y, Qin C, Shen L, Yin L. Self-assembled nanoparticles from hyaluronic acid-paclitaxel prodrugs for direct cytosolic delivery and enhanced antitumor activity. *Int J Pharm*. 2015; 493(1-2): 172–81.

Xu W, Ding J, Xiao C, Li L, Zhuang X, Chen X. Versatile preparation of intracellular-acidity-sensitive oxime-linked polysaccharide-doxorubicin conjugate for malignancy therapeutic. *Biomaterials*. 2015; 54: 72–86.

Yoshinobu T, Satoshi M, Mitsuru H, Hitoshi S. Physicochemical properties and antitumor activities of polymeric prodrugs of mitomycin C with different regeneration rates. *J Control Release*. 1989; 10: 97-105.