

Desarrollo y caracterización de microcápsulas de Aflibercept para el tratamiento de DMAE

Development and characterization of Aflibercept microcapsules for the treatment of AMD

Luis Ramos Castelao

CURSO ACADÉMICO 2017-2018



Índice

1. Resumen	4
2. Introducción	6
2.1. Sistemas de liberación prolongada.....	6
2.2. Microcápsulas.....	7
2.2.1. Técnicas de microencapsulación.....	8
2.2.2. Microencapsulación de proteínas.....	9
2.3. DMAE.....	10
2.3.1.Tratamiento.....	12
2.4. Aflibercept.....	15
2.5. Características de la vía intraocular.....	16
2.6. Requerimientos para la vía intraocular.....	18
3. Objetivos	19
4. Materiales y métodos	20
4.1. Elaboración de microcápsulas.....	20
4.1.1. Variaciones del método.....	22
4.2. Caracterización de las microcápsulas.....	23
4.3. Ensayo del contenido en Aflibercept en las microcápsulas.....	24
4.4. Estudio de liberación.....	25
5. Resultados y discusión	27
5.1. Caracterización de las microcápsulas.....	27
5.2. Ensayo del contenido en Aflibercept en las microcápsulas.....	31
5.3. Estudio de liberación.....	32
6. Conclusiones	34
7. Bibliografía	35
8. Agradecimientos	40

1. Resumen

En la última década, ha crecido enormemente el interés por las propiedades terapéuticas de (los) fármacos de origen proteico, de origen químico y/o biológico, debido a su alta especificidad y eficacia para el tratamiento de distintas patologías, tales como el cáncer y enfermedades de origen inflamatorio. Aun siendo de gran interés, existen ciertos límites en cuanto al progreso en la optimización de nuevas formulaciones, debido a las dificultades de administración, a su baja biodisponibilidad y corta vida media en el organismo.

Así, se han diseñado estrategias para incrementar la eficiencia de estos tratamientos, utilizando técnicas como la microencapsulación, que permite la liberación de fármacos de origen proteico durante un tiempo más prolongado y sostenido y la conservación de la molécula encapsulada frente a mecanismos dañinos.

En este proyecto se han desarrollado una serie de formulaciones empleando distintas concentraciones de Aflibercept, por el método de emulsión- evaporación de disolvente (water-in-oil-in-water; W/O/W), variando distintos parámetros de la técnica, con el fin de averiguar la mejor relación de/en la inmovilización de anticuerpo, eficiencia de encapsulación y liberación *in vitro*. Asimismo, se llevó a cabo una caracterización de las microcápsulas formadas. El objetivo general de este trabajo experimental fue de obtener una formulación eficaz para la liberación de Aflibercept a nivel oftálmico con la finalidad de mejorar el tratamiento actual en la degeneración macular (DMAE), retinopatía diabética y el edema macular.

En este trabajo se ha conseguido desarrollar un método de elaboración de microcápsulas conteniendo anticuerpo monoclonal Aflibercept. Todas las formulaciones presentaron una población homogénea, de forma lisa y esférica, y con una razonable eficiencia de encapsulación. Asimismo, se obtuvieron perfiles de liberación del Aflibercept a lo largo de dos semanas.

Palabras clave: Microcápsulas, Aflibercept, DMAE, Encapsulación, PLGA, Tratamiento.

Abstract

In the last decade, interest in the therapeutic properties of protein origin drugs, chemical or biological origin, has grown enormously due to its high specificity and efficacy for the treatment of pathologies, tales such as cancer and diseases of inflammatory origin. . Although of great interest, there are certain limits in terms of progress in the optimization of new formulations, due to administration difficulties, low bioavailability and short half-life in the body.

Thus, strategies have been designed to increase the efficiency of these treatments, using techniques such as microencapsulation, which allows the release of drugs of protein origin for a longer and sustained time and the conservation of the encapsulated molecule against harmful mechanisms.

In this project, a series of formulations have been developed using different concentrations of Aflibercept, by the emulsion-solvent evaporation method (water-in-oil-in-water, W / O / W), varying different parameters of the technique, in order to find out the best ratio of antibody immobilization, encapsulation efficiency and in vitro release. Likewise, a characterization of the formed microcapsules was carried out. The general objective of this experimental work was to obtain an effective formulation for the release of Aflibercept at the ophthalmic level in order to improve the current treatment in macular degeneration (AMD), diabetic retinopathy and macular edema.

In this work it has been possible to develop a method of making microcapsules containing the monoclonal antibody Aflibercept. All the formulations presented a homogenous population, in a smooth and spherical way, and with a reasonable encapsulation efficiency. Likewise, Aflibercept release profiles were obtained over two weeks.

Key words: Microcapsules, Aflibercept, DMAE, Encapsulation, PLGA, Treatment.

2.Introducción

2.1. Sistemas de liberación prolongada.

El constante cambio y adaptación al nuevo conocimiento emergente para el desarrollo de nuevas formas de administración de fármacos, ha fomentado el desarrollo de la optimización de métodos capaces de solventar los distintos inconvenientes relacionados con diseño de nuevas formas de liberación de fármacos que presentan problemas para su formulación, como son los fármacos biológicos.

Uno de los numerosos caminos empleados para la optimización de fármacos, se ha centrado en la consecución de características de liberación prolongada de los preparados o sistemas de cesión sostenida. Con ello se pretende la cesión del fármaco desde el vehículo, el cual debe transferir la molécula/s necesarias para la acción farmacológica con una tiempo-efecto más eficiente.

Existen distintas estructuras que pueden ser empleadas para conseguir una cesión controlada de fármacos administrados por vía parenteral, haciendo así posible su transferencia al lugar de acción de una manera más precisa y constante, evitando posibles inconvenientes, como efectos adversos derivados de la alta concentración del fármaco necesaria para que ejerza su acción terapéutica. Entre las numerosas alternativas que se han propuesto para la administración parenteral de fármacos podemos citar:

- Sistemas coloidales: están constituidos por unidades (partículas, vesículas, glóbulos) de tamaño nanométrico lo que le confiere unas propiedades particulares (1). Dependiendo de la afinidad entre el coloide y la fase dispersante podemos clasificarlos en:
 - o Coloides liofóbicos. Constituidos por sistemas cuya fase interna presenta baja afinidad por el vehículo e incluyen:
 - Micelas: Son agregados de moléculas anfifílicas que se forman al alcanzar su concentración micelar crítica. Generalmente se forman a partir de moléculas de tensoactivo, en el caso de que se formen a partir de copolímeros anfifílicos, que se autoenlazan en un sistema acuoso se denominan micelas poliméricas. Las micelas en medio acuoso poseen un núcleo de carácter lipófilo, mientras que la parte hidrofílica constituye la corona del exterior de la micela. Poseen la ventaja de tener una buena estabilidad en sangre, alta

solubilidad, estables durante su almacenamiento, diámetro apropiado, biocompatibles ... (2, 3)

- Liposomas: Se caracterizan por ser vesículas que poseen un núcleo acuoso, capaz de almacenar fármacos hidrofílicos, rodeado de una bicapa lipídica, idóneo para albergar fármacos de naturaleza hidrofóbica. Sin embargo, no poseen una buena capacidad de mantener sus propiedades durante largos tiempos de almacenaje, y suelen presentar problema de correcta estabilidad en sangre...(4)
- Sistemas microparticulares: Estructuras de distinta naturaleza, capaces de albergar en un tamaño micrométrico, ya sea en el núcleo (microcápsulas) o en la propia matriz (microesferas) e incluso en su superficie, el correspondiente contenido en principio activo(5).
- Implantes biodegradables: Son formas de dosificación estériles y sólidas, que a través de una aguja por vía subdérmica o con cirugía, son implantados en la capa subcutánea de la piel., dando lugar a una absorción más lenta por su poca vascularización. Aunque no es una vía de administración apta para todos los fármacos, suele presentar ciertas ventajas en la administración de estos sistemas, elaborados con materiales biocompatibles, debido a la baja incidencia de problemas relacionados con la toxicidad (6).

2.2. Microcápsulas

El uso de microcápsulas poliméricas biodegradables como vehículos para la liberación controlada de fármacos ha sido ampliamente utilizado en la industria farmacéutica. Son sistemas de tamaño micrométrico (1-1000 micras), elaborados mediante distintos métodos y materiales y que pueden poseer distinta estructura. Teniendo en cuenta la distribución del ingrediente activo y la estructura interna, se distinguen dos categorías distintas de microcápsulas, las microesferas y las microcápsulas. Las microesferas presentan una estructura tipo matriz y están compuestas por una mezcla homogénea de ingrediente activo y material de cubierta. Las microcápsulas son microcápsulas en las que el principio activo se encuentra incluido en una especie de reservorio, que puede ser líquido o sólido, y que está envuelto por una fina película de material de recubrimiento.

2.2.1. Técnicas de microencapsulación

Existen numerosas estrategias para abordar la encapsulación de compuestos. Se ha planteado algunas de las siguientes:

- Técnica de emulsión aceite en agua (o/w): Se utiliza para la incorporación de fármacos hidrófobos, con una baja solubilidad en componentes acuosos, en dos fases inmiscibles entre sí. Se disuelven tanto los polímeros biodegradables y/o el fármaco en el disolvente orgánico para formar la fase oleosa, que mediante agitación con una fase acuosa, conteniendo un emulsificante, y finalmente se eliminara el disolvente orgánico, una vez hayan emulsificado ambas fases, por evaporación del disolvente orgánico o extracción de dicha fase (7, 8).
- Técnica de doble emulsión agua en aceite en agua (w/o/w): Se fundamenta en la mezcla de una fase acuosa, conteniendo el fármaco, con o sin una espesante o gelificante que aumente la estabilidad de la estructura, añadiéndose a una fase oleosa de PLGA en disolvente orgánico Diclorometano (DCM) en agitación intensa para formar la primera emulsión w/o. Esta primera emulsión w/o se incorpora, junto con agitación, a una segunda fase acuosa, conteniendo un emulsificador, para formar la segunda emulsión w/o/w que, se procederá a la extracción del disolvente orgánico DCM por técnica de evaporación de disolvente o extracción de disolvente (8,9).
- Técnica del fluido supercrítico: Se basa en el uso de un fluido supercrítico (SCF), obteniéndose a unas temperatura y/o presión muy elevados, donde su tensión superficial es casi nula y su densidad elevada, pero altamente compresible. El SCF, por lo general, se mezclan con el fármaco y/o la matriz PLGA y, por diferentes métodos (spray, atomización, saturación...) forma las microcápsulas. No utilizan disolventes orgánicos, forman poblaciones más homogéneas, pero precisan de material muy específico y demasiadas fases (7,10).
- Secado por pulverización: Se limita en la preparación de disolvente con el fármaco y la matriz, se atomiza. Lo cual facilita el proceso de desecación posterior y se insufla una corriente el aire caliente. Este método permite realizar procesos de alto escalonado y alta calidad, pero no poseen muchos materiales adaptados y los termosensibles pueden resentirse en el proceso (7, 11).
- Electro spray coaxial (CES): Este método implica el uso de una corriente de alta tensión, que fluye hasta llegar a una mezcla de matriz y fármaco en sus respectivos medios, capaz de competir con la tensión superficial de la gota, alterando la forma y tamaño de la misma según el flujo eléctrico aplicado, para al final reunir las partículas y evaporar el disolvente.

Son capaces de obtener un buen ratio de encapsulación y útiles en moléculas hidrosolubles. Sin embargo, requiere una mejor recolección final de las partículas, no está bien protocolizado (12, 13).

- Microfluidos: El cumulo de dos microcapilares coaxiales, conteniendo el fármaco y la matriz en el solvente orgánico respectivamente, fluyendo en la misma dirección, circundados por una solución compactante en el mismo o distinto sentido del flujo. Se demuestra una distribución muy homogénea y liberación más lenta, pero tiene un consumo de tiempo elevado (13, 14).
- Plantilla de hidrogel: Se fundamenta en la integración de la combinación de fármaco en una solución de PLGA, para incorporarse en una plantilla con pocillos que dan forma y tamaño a las microcápsulas resultantes. A continuación, son resuspendidos en solvente acuoso, filtrados y desecados. Poseen unos buenos parámetros de encapsulación, aunque no es muy utilizada (13,15).

2.2.2. Microencapsulación de proteínas

La microencapsulación de proteínas ha sido diseñada para alcanzar, de manera sostenida o pulsátil, niveles terapéuticos en plasma, durante semanas o meses, de fármacos con una corta vida media. También, la encapsulación de los fármacos proteicos dentro del núcleo polimérico ofrece una mayor carga interna en una sola formulación, y por tanto, ofrece la posibilidad de conseguir mejores eficacias terapéuticas con dosis menores, aspecto muy positivo especialmente en el caso de fármacos que pueden dar lugar a serios efectos adversos (16).

Además, el recubrimiento mediante una cubierta o una matriz, normalmente, de tipo polimérico del fármaco proteico, tiene la capacidad de actuar como barrera ante componentes del medio externo, protegiendo así protegerá la molécula de la degradación o daño. Por otra parte, la encapsulación de proteínas ofrece también como ventaja la de actuar como factor de estabilidad del producto proteico, tanto por el impedimento de agresión externa (17), como el aumento de su corta vida media en el organismo y estabilidad en formulación, lo que permite que éstas puedan almacenadas durante razonables periodos de tiempo y una mejor manipulación del sólido (18).

2.3. Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)

La Degeneración Macular Asociada a la edad es una enfermedad ocular, que afecta a la mácula, perjudicando de manera progresiva y permanente a la visión central, encargada de la percepción del detalle, en consecuencia del declive funcional del complejo Epitelial Pigmentado de la Retina (EPR), siendo la primera causa de ceguera legal en la población de ≥ 55 años en los países desarrollados (occidentales).

Actualmente no existe una cura para esta patología, que presenta una serie de factores predisponentes ambientales y genéticos. Un diagnóstico temprano es la mejor estrategia para obtener los mejores resultados terapéuticos, disminuyendo la probabilidad de daño en la visión y/o reversión parcial del daño ocular.

El mecanismo (entramado) patogénico del DMAE es poco conocido, siendo una enfermedad compleja, en la cual se han hallado varios factores de riesgo:

- Edad: es el factor más pronosticador y prevalente. La degeneración en las estructuras oculares, acumulación de desechos intraoculares y debilitamiento funcional debido al paso del tiempo, aumenta el porcentaje de padecer la enfermedad de manera muy significativa.
- Genético/familiar: Se ha demostrado un patrón de genes susceptibles de intervenir en el proceso de la enfermedad, siendo diferente por razas pero no por sexos y. También la predisposición genética acentúa una respuesta diferente al tratamiento de DMAE.
- Estilos de vida: El tabaco es el factor ambiental modificable más influyente, aumentando casi al doble las probabilidades de padecer la enfermedad (19). La hipertensión es otro factor más, junto con el consumo de grasas saturadas, siendo estos parámetros más moderados pero consistentes.
- Cirugía de cataratas: Es un componente de riesgo de desarrollo de la patología de manera muy firme.
- Acumulación grasa androide: Especialmente en los varones, donde tiene una prevalencia moderada.

Existen dos tipos de principales de DMAE, conocidas como DMAE seca y húmeda. La DMAE seca, también conocida por como forma no exudativa, es la forma más común, abarcando en más de 80 % de los casos diagnosticados, donde se caracteriza por la degeneración progresiva de la macula en su fase tardía por atrofia del tejido retiniano y coriocapilar. La DMAE húmeda o exudativa, es menos

frecuente, pero su progresión hacia la pérdida de visión es más rápida, caracterizada por afectar al EPR (Epitelio pigmentario de la retina) y la neovascularización coroidal. La conversión de seca a húmeda es posible en alrededor del $\approx 15\%$ de los casos diagnosticados (19).

Existen varios tipos de clasificaciones para la DMAE, pero no hay consenso universal firme sobre el mismo. De forma convencional, la enfermedad se clasifica en distintas fases según la progresión en relación al daño pigmentario en la retina y la formación de drusas, entre el EPR y membrana de Bruch, como se indica en la tabla 1. Las drusas son acumulaciones de residuos o desechos celulares, que el organismo no es capaz de eliminar a través de la circulación sanguínea, y que se van depositando hasta alcanzar aspecto y composición variables que pueden obstruir el normal funcionamiento de la mácula.

Clasificación	Características
normal (sin cambios en la edad)	➤ ausencia de drusas
	➤ no daño pigmentario
normal (con cambios en la edad)	➤ solo drusas pequeñas: $\leq 63 \mu\text{m}$
	➤ no daño pigmentario
DMAE temprano	➤ drusas medianas: $>60 \mu\text{m}$ y $\leq 125 \mu\text{m}$
	➤ no daño pigmentario
DMAE intermedio	➤ drusas grandes: $> 125 \mu\text{m}$ y/o daño pigmentario
	➤ neovascularización y/o atrofia del tejido retiniano y coriocapilar

Tabla 1: Clasificación de los tipos de DMAE. Modificado de (20).

Los síntomas más frecuentes de esta enfermedad son la pérdida en la visión central (sin perder la periférica), encargada de la percepción del detalle, alteración de las formas y tamaños de las imágenes, impidiendo la realización de tareas cotidianas como la lectura y/o conducir, ver con claridad, sensibilidad a la luz, zonas oscuras en el campo visual (en fase avanzada)...

2.3.1. Tratamiento

Actualmente, no existe un tratamiento efectivo para la forma seca de esta patología. Aunque existen estudios innovadores sobre terapias con células madre, autohemoterapia ozonizada y prostaglandinas (21). Además, solo se aplican suplementos de antioxidantes a pacientes que tengan susceptibilidad de beneficiarse.

Se han desarrollado tratamientos más eficaces para la forma húmeda de la enfermedad. Principalmente, una vez llegado a la población de riesgo (>55 años), se ha de controlar los posibles síntomas de la patología, como la metamorfosis (deformación de las líneas rectas observadas debido al desplazamiento de los fotorreceptores) (22), el síntoma principal esclarecedor de un paciente con AMD, que puede reconocerse de manera temprana y sencilla por el propio paciente mediante la rejilla de Amsler o los Gráficos-M.

Método diagnóstico	Características
<ul style="list-style-type: none">Examen de fondo de ojo en pupila dilatada/ cámara no midriática	<ul style="list-style-type: none">clínicamente indispensable
<ul style="list-style-type: none">evaluación agudeza visual	<ul style="list-style-type: none">clínicamente indispensable
<ul style="list-style-type: none">tomografía de coherencia óptica (OCT)	<ul style="list-style-type: none">recomendable, método no invasivo
<ul style="list-style-type: none">angiografía con fluoresceína	<ul style="list-style-type: none">Indicada para sospecha de membrana de neovascularización coroidea
<ul style="list-style-type: none">Pruebas genéticas	<ul style="list-style-type: none">Indicada en casos de antecedentes familiares

Tabla 2: Métodos de diagnóstico y control de la DMAE. Inspirada en (19).

Al afianzar la sospecha de la enfermedad se ha de acudir al oftalmólogo para que evalúe el caso, realice las pruebas correspondientes (tabla 2), y confirmar el diagnóstico definitivo. El objetivo del diagnóstico precoz es frenar la progresión de esta enfermedad, para elegir el tratamiento más adecuado según la clasificación clínica de la DMAE en la que se encuentra el paciente, recogido en la tabla 3.

Clasificación DMAE	Características	Tratamiento/terapia
temprana	drusas medianas: >60 μm y $\leq 125 \mu\text{m}$ no daño pigmentario	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminar los factores de riesgo modificables: <ul style="list-style-type: none"> - Dejar el tabaco - No consumir grasas saturadas • Hábitos y cambios en estilo de vida: <ul style="list-style-type: none"> - Dieta equilibrada, rica en antioxidantes (fruta, verdura...), ácidos grasos poliinsaturados (pescado azul, nueces...) - Educar en el uso de pruebas de evaluación de la enfermedad (rejilla de Amsler, Gráficos-M...) • Control de factores de riesgo no modificables: <ul style="list-style-type: none"> - Hipertensión - Sobrepeso - Pruebas genéticas por antecedentes familiares
Intermedia	drusas grandes: > 125 μm y/o daño pigmentario	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminar los factores de riesgo modificables: <ul style="list-style-type: none"> - Dejar el tabaco - No consumir grasas saturadas • Hábitos y cambios en estilo de vida: <ul style="list-style-type: none"> - Dieta equilibrada, rica en antioxidantes (fruta, verdura...), ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ω-3 (pescado azul, nueces...) - Educar en el uso de pruebas de evaluación de la enfermedad (rejilla de Amsler, Gráficos-M...) - Consumo de suplementos de antioxidantes. - Revisiones cada 6 meses. • Control de factores de riesgo no modificables: <ul style="list-style-type: none"> - Hipertensión - Sobrepeso
Tardía	neovascularización y/o atrofia del tejido retiniano y coriocapilar	<ul style="list-style-type: none"> • Hay 4 diferentes inhibidores de VEGF: <ul style="list-style-type: none"> -Macugen (Pegaptanib): Primer inhibidor VEGF aprobado para el tratamiento de la DMAE -Lucentis (Ranibizumab): Medicación altamente efectiva en la DMAE -Avastin (Bevacizumab): Fármaco anticanceroso con función Anti-VEGF con aplicación extraoficial en la DMAE -Eylea (Aflibercept): Tratamiento muy efectivo y con baja frecuencia de dosificación para la DMAE

Tabla 3: Recomendaciones y Tratamiento para las clasificaciones de la DMAE. Inspirada en (20).

Las terapias anti-VEFG tienen unos riesgos asociados a la propia identidad del fármaco y la forma de administración. Aunque son tratamientos seguros, ya que son realizados por especialistas en retina, existe un porcentaje de riesgo que se debe contrastar con el beneficio. Algunos de estos efectos adversos son: infección ocular, incremento de presión ocular, desprendimiento de retina, partículas vítreas flotantes, inflamación corneal, visión borrosa, hemorragia conjuntival, irritación, dolor ocular...(23)

Dependiendo del tipo de actuación que indique el profesional sanitario, es importante enfatizar que la DMAE es una patología crónica que necesita de un especial control y tratamientos de por vida, en especial la forma húmeda. Son tratamientos regulares que actúan sobre el control de la angiogénesis y la preservación de la visión. Al abandonar o ignorar la pautas del especialista en retina, la visión puede deteriorarse y alcanzar el grado de ceguera.

2.4. Aflibercept

El Aflibercept es un anticuerpo monoclonal que se obtiene de una proteína de fusión, que está compuesta por porciones de los dominios extracelulares de los receptores 1 y 2 del factor de crecimiento vascular (VEFG) humano, asociados a la porción F_c de la IgG1 humana, mediante tecnología de DNA recombinante, representada en la figura 1 (23).



Figura 1:
Representación
Aflibercept, modificada
de (23).

Los VEGF y factor de crecimiento placentario (PlGF) son factores angiogénicos que pueden actuar como potentes agentes mitógenos, quimiotácticos y de permeabilización vascular para las células endoteliales. Su activación excesiva, puede provocar una neovascularización patológica y una permeabilidad vascular excesiva.

El mecanismo de acción del Aflibercept consiste en el bloqueo a la unión del VEGF y PlGF, a sus correspondientes receptores, siendo el monoclonal un receptor cebo más afín que los naturales, impidiendo la activación los mismos. La presencia de la porción Fc en Aflibercept puede permitir que la molécula se mueva a través de la barrera retiniana.

La efectividad del anticuerpo monoclonal radica en la potente unión a los factores VEGF y PlGF y la ventaja de necesitar menos inyecciones para conseguir la misma potencia terapéutica que las inyecciones de su monoclonal de referencia Lucentis (Ranibizumab) para dicha patología, siendo comparable la seguridad de ambos fármacos (23, 24).

La forma de administración del fármaco se basa en repetidas inyecciones intravítreas, por un profesional sanitario especializado. Inicialmente, consta de tres inyecciones administradas mensualmente durante tres dosis consecutivas. Después, el intervalo entre dos dosis no debe ser más corto de 8 semanas.

La elección del Aflibercept se explica por su longevidad de duración de acción con respecto a sus semejantes, que lo hace idóneo para un tratamiento crónico, que sumado a los crecientes estudios de liberación prolongada de fármacos proteicos, puede ser de gran utilidad en la calidad de vida del paciente.

2.5. Características de la vía intravítrea

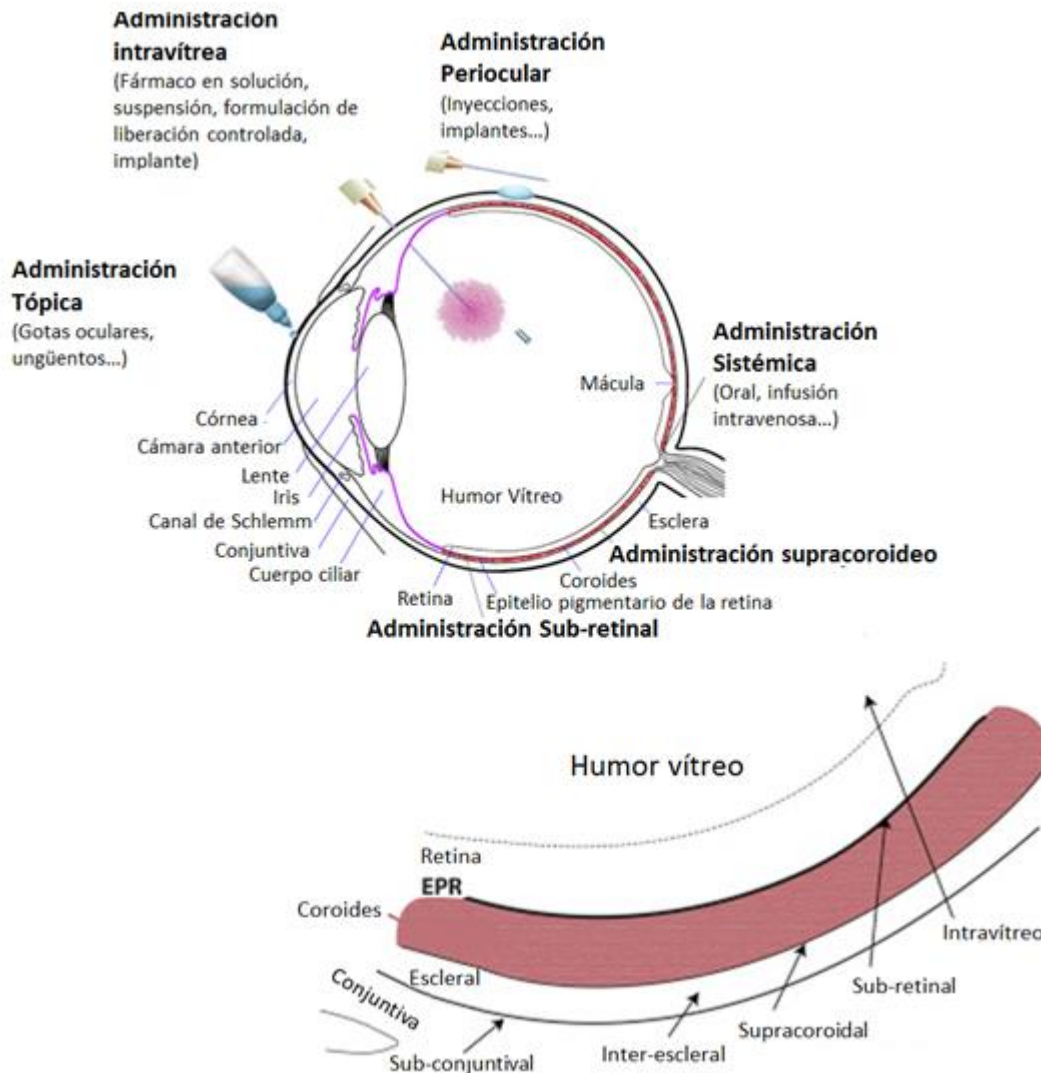


Figura 2: Rutas de administración de fármacos para la administración de fármacos retinianos. Modificado de (25,26).

El ojo presenta una estructura compleja que constituye una barrera muy complicada de penetrar, siendo un órgano prácticamente estéril pese a que se encuentre en contacto con el ambiente. La vía intravítrea es una ruta directa que se centra en la administración de fármacos en la zona del humor vítreo del ojo, como se muestra en la figura 2. El humor vítreo está compuesto principalmente por ácido hialurónico, un polímero hidrófilo aniónico de alto peso molecular, y fibras de colágeno, que proporcionan resistencia y consistencia a las fuerzas de tracción. En la figura 3 se muestra la distribución del ácido hialurónico, que no se encuentra uniformemente distribuido dentro

del vítreo, y sus concentraciones más altas se encuentran en la corteza vítrea posterior, siendo el vítreo central más líquido que el vítreo cortical. Este hecho hace que la difusión de fármacos a través de la cavidad no sea exactamente igual. También es dependiente del tamaño de la forma farmacéutica y del fármaco administrado. A medida que una persona envejece, las propiedades reológicas del vítreo cambian y tienden a una forma más líquida.

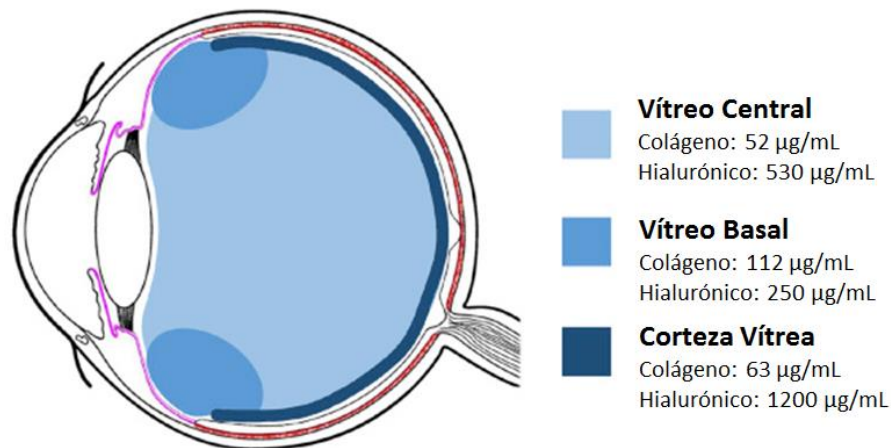


Figura 3: Representación de las zonas de concentraciones de ácido hialurónico en el vítreo. Modificado de (24).

En comparación con el plasma, la concentración y tamaño promedio de proteína en el vítreo humano saludable es baja en comparación con el plasma sanguíneo, pero que pueden aumentar en enfermedades retinianas. Las proteínas que podemos encontrar en el vítreo sano incluyen proteasas, que aumentan con el envejecimiento, y que pueden afectar en la degradación de fármacos, pero no está claro su impacto.

La situación de liberación en un medio de difusión denso dificulta la progresión y acción farmacológica, favoreciendo la agregación de fármaco (26). Además, las variaciones de temperatura y pH de la formulación al medio de actividad, que inducen fenómenos de desnaturalización para moléculas termolábiles y agregación (27).

Por otra parte, la duración de acción de los fármacos administrados por vía intravítrea está limitada por la presencia de mecanismos de eliminación de fármacos, a saber, la Trans-retinal posterior y anterior, vías de eliminación del humor acuoso, los transportadores de salida en el epitelio pigmentario de la retina y reparto en los tejidos circundantes oculares.

2.6. Requerimientos de la vía intravítrea.

Para la utilización de la vía intravítrea, se han de tener en cuenta una serie de consideraciones previas a la incorporación del fármaco para evitar el posible daño y deterioro intra y extraocular:

- pH: La vía intravítrea es capaz de aceptar una horquilla de valores bastante amplia (pH= 3-8). Aunque lo más adecuado sería adaptarlo al pH fisiológico del medio, no es necesario.
- Osmolaridad: En las preparaciones de formulaciones intraoculares es un factor a tener en cuenta, para los valores en el rango de 270-330 mOsm/kg, siendo deseable que se aproximen a los valores fisiológicos.(28)
- Esterilidad: Se ha de tener especial precaución, al ser una zona estéril que se va a poner en contacto con el exterior, siendo de máxima prioridad la eliminación de cualquier agente posible de desarrollar un proceso patológico. Se puede trabajar en la finalización del proceso con filtración esterilizante, autoclave o esterilización por calor seco. También es posible la elaboración en campana de flujo laminar durante todo el proceso con materias primas estériles.
- Limpidez: La existencia de partículas en solución han de ser limitadas o nulas en formulaciones de inyectables, ya que pueden ocasionar problemas. Sus límites vienen definidos en la farmacopea, indicado en la tabla 4.

	Met. De bloqueo de la luz		Met. microscópicos	
	≥ 10 μm	≥ 25 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm
Inyectables de gran volumen (>100 mL)	< 6000 /envase	< 600/envase	< 3000 /envase	< 300/envase
Inyectables de pequeño volumen (≤100 mL)	< 25/mL	< 3/mL	< 12/mL	< 2/mL

Tabla 4: Limite de partículas en solución en inyectables. Modificado de la Real farmacopea Española

- Apirogenicidad: Las formulaciones han de estar exentas de cualquier agente químico, biológico o cualquier otra sustancia con la capacidad de inducir una respuesta febril (29).

3. Objetivos

Este proyecto se ha realizado con el objetivo de elaborar y posteriormente, caracterizar una formulación capaz de aumentar el efecto terapéutico del fármaco Aflibercept en el interior vítreo (ocular) con la finalidad última de disminuir la frecuencia de dosificación en el tratamiento actual de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

Asimismo, aparte de aumentar los intervalos entre dosificaciones, la forma farmacéutica ha de garantizar la estabilidad y liberación del fármaco durante periodos relativamente amplios de tiempo.

Para ello, se han desarrollado las siguientes etapas para alcanzar los objetivos propuestos en el proyecto:

- Preparación de un método para elaborar de sistemas microparticulares de liberación prolongada, conteniendo Aflibercept.
- Caracterización morfológica y cuali-/cuantitativa de los sistemas microparticulares.
- Análisis comparativo de Aflibercept en ensayo pre/post rotura de sistemas microparticulares.
- Estudios de liberación del Aflibercept a partir de las formulaciones.

4. Materiales y métodos

- Eylea® (PHARMA BASE S.A.)
- Diclorometano (Avantor & VWR)
- ácido poliláctico-co-glicólico 503 25G (Evonik Industries)
- Agua MilliQ
- Alcohol polivinílico (Sigma-Aldrich)
- Cloruro sódico (Labkem)
- Sonicador: Sonopuls HD3400 (Bandelin)
- Microscopio óptico: Olympus BX60 (Olympus)
- Cámara: Olympus SC 100 (Olympus)
- Centrífuga: Centrifuge 5804 R (VWR)
- Espectrofotometro: Cary 60 UV-Vis (Agilent technologies)
- Incubador: Incubating mini Shaker(VWR)
- Estufa de vacío: Telstar (Heaeus)

4.1. Elaboración de microcápsulas

Para la preparación de los sistemas microparticulares, se ha tomado como base artículos de investigación de preparación de proteínas en formulaciones de microcápsulas y sus parámetros determinantes en el proceso, especialmente en PLGA, atendiendo a los atributos de encapsulación y liberación (7, 13, 30).

En la elaboración de las microcápsulas que se han preparado, hemos empleado distintas concentraciones de fármaco: Varios lotes de 40 µg/mL, otros con una concentración de 25 µg/mL y también de 10 µg/mL. Además, se han comprobado las rotaciones en algunas variables del método para visualizar alguna diferencia significativa en el resultado de elaboración del método.

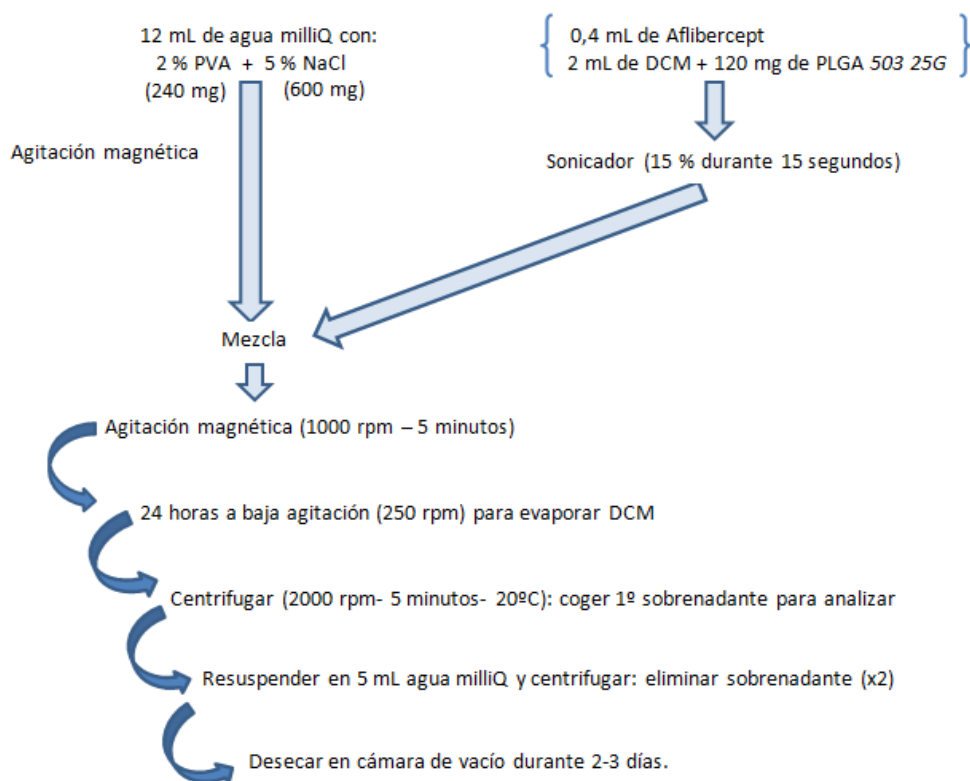


Figura 4: Representación esquemática del método de Microencapsulación.

El proceso que se siguió, representado en la figura 4 para la fabricación de los sistemas microparticulares consistió en:

Primeramente, preparamos una dispersión de PVA (2%) en agua milliQ empleando una balanza y un matraz vidrio de rosca hermético, y dejamos la preparación con agitación magnética. A continuación, repetimos la misma operación con un 5% de NaCl y lo dejamos disolver, en agitación, aplicando una fuente de calor de ser necesario, hasta que la preparación quede transparente.

Luego, en un tubo de centrifuga de 15 mL, pesamos en la balanza el PLGA 503 25G, en la mayor brevedad y precisión posible, y se disuelve en de DCM (DiCloroMetano) utilizando una micropipeta de 1 mL.

Incorporamos a la disolución de DCM una solución de fármaco, conservado en nevera, y se somete a un proceso de sonicación con unos parámetros determinados (15% de amplitud y 40 segundos de sonicación).

Una vez sonicado, incorporamos el contenido del tubo a la disolución de PVA + NaCl con pipeta pasteur gota a gota y se deja en agitación magnética durante 5 minutos. Después, se rebaja a la agitación y se mantiene durante 24 horas, tapado con un parafilm con agujeros, para facilitar la evaporación del disolvente orgánico.

Después de las 24 horas, pasamos la disolución que estaba en agitación magnética a un tubo de 15 mL y se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos a 20°C. Después de la centrifugación, se recoge el sobrenadante para su posterior análisis, se rellena con agua milliQ el contenido que fue retirado y se repite el proceso de centrifugación dos veces más.

A continuación, el precipitado (microcápsulas) se desecó a vacío durante varios días (200 Torr).

A continuación, se extrajeron las microcápsulas de los tubos y se pesaron. Posteriormente, se guardaron en nevera para conservar el fármaco de la posible degradación, asegurar su estabilidad y realizar posteriores estudios.

4.1.1. Variaciones del método

Se han realizado varios lotes con y sin fármaco incorporado, evaluando diferentes parámetros para optimizar el proceso de fabricación de los sistemas microparticulares. Los parámetros evaluados se presentan en la siguiente tabla:

Parámetro	Variación	Conclusión
Orden de preparación de reactivos	Solución acuosa: NaCl y PVA	➤ Se ha comprobado que la disolución acuosa donde se incorpora en inicio el NaCl, no completa su disolución al añadirle el segundo reactivo, acarreado unas micropartículas estructuralmente inadecuadas.
Sonicación	tiempo de sonicación	➤ Se ha comprobado que a menor tiempo de sonicación, se observan micropartículas de un tamaño menor.
Agitación magnética durante 24 horas	rpm	➤ Se ha comprobado que a menor rpm, las micropartículas se aglomeran con mayor facilidad.
Lavado de las micropartículas	numero de lavados	➤ No se observaron cambios apreciables.

Tabla 5: Variaciones en el método de microencapsulación.

4.2. Caracterización de las microcápsulas

En este proyecto se ha realizado un reconocimiento estructural y cualitativo de las microcápsulas fabricadas, por lotes y concentraciones, utilizando aparataje de microscopia óptica, para la visualización y cuantificación de diferentes parámetros, con el objetivo de observar la calidad del sistema microestructural y su comparación con los demás lotes de concentraciones.

Para la visualización de las microcápsulas, se ha tomado una muestra de microcápsulas secas, que se han resuspendido en un medio líquido (agua milliQ).. Se ha utilizado un microscopio óptico (Olympus 60X) adaptado para la incorporación de una cámara, conectada a un soporte informático. Se ha añadido la muestra representativa en el portaobjetos, sobre el cual pasa un haz de luz, captado por la lente y, a su vez, por la cámara, que registrara la imagen en la pantalla del ordenador, a través del programa informático *OLYMPUS CellSens*.

Se han tomado un mínimo de 4 fotografías por muestra, de diferentes cuadrantes del portaobjetos, para mostrar la heterogeneidad del espécimen a representar y se han caracterizado las formulaciones microparticulares empleando el programa *ImageProPlus 6*. Primeramente, se procedió a la calibración de la imagen por contraste con una imagen de métrica patrón. A continuación, se mejoró el contraste del tono, se transformó la fotografía a escala de grises de 8 pixeles, y se ajustó la luminosidad. La imagen se convirtió al modo de blanco y negro mediante un ajuste manual del valor umbral y por último, se midió por medio de *Dark count*”, los objetos oscuros de la imagen, determinándose el diámetro medio de Feret y el parámetro esfericidad que es el inverso de la circularidad, es decir:

$$Esfericidad = \frac{Perímetro^2}{4 \cdot \pi \cdot Área}$$

Ecuación 1: Fórmula del cálculo de la esfericidad.

4.3. Ensayo del contenido en Aflibercept en las microcápsulas

En este ensayo se procedió a la destrucción de la cubierta de las microcápsulas, con la finalidad de averiguar el contenido de fármaco en su interior, y anotar las diferencias en contenido entre las distintas formulaciones y seleccionar la que mejor se podría ajustar para el tratamiento de la DMAE.

Para la realización de este proyecto, se utilizaron 20 mg de microcápsulas secas, de cada lote y una concentración de Aflibercept correspondientes (40 mg/mL, 25 mg/mL y 10 mg/mL)

A continuación, se preparó previamente una disolución 0,1 N de NaOH. Se llevaron 3 mL a un vial con 20 mg de microcápsulas y se matuvo una incubadora a 37°C con una leve agitación mecánica de 100 revoluciones por minuto (rpm) durante 24 horas.

Pasado el tiempo, se centrifugó, en los mismos parámetros que para el 1º sobrenadante, y se recoge el sobrenadante del NaOH para posterior análisis en el espectrofotómetro a 280 nm.

Para la determinación de Aflibercept, se recoge 1 mL de cada muestra del sobrenadante en un Eppendorf y se analiza en un espectrofotómetro de luz ultravioleta, a la longitud de onda de 280 nm.

Los cálculos posteriores consistieron en la determinación del contenido de Aflibercept encapsulado en las microcápsulas, mediante el uso de las ecuaciones del “Drug Loading” y la “Eficiencia de encapsulación”.

Drug Loading (DL)

La carga de fármaco se determinó la relación entre la medida obtenida en las microcápsulas tras su rotura con NaOH y la cantidad de microcápsulas utilizadas:

$$DL = \frac{\mu g \text{ Aflibercept medido}}{mg \text{ microparticulas utilizadas}}$$

Ecuación 2: Cálculo del Drug Loading.

Encapsulation efficiency (EE %):

La eficacia de encapsulación de las microcápsulas se determinó mediante la relación entre la carga de fármaco o Drug Loading de la prueba realizada con respecto a la cantidad teórica:

$$EE \% = \frac{\left(\mu g \text{ Aflibercept medido} / mg \mu P \text{ utilizadas en ensayo de rotura} \right)}{\left(\mu g \text{ Aflibercept iniciales} / mg \mu P \text{ inicial} \right)} \times 100$$

Ecuación 3: Cálculo de la Eficiencia de Encapsulación.

Posteriormente, el análisis estadístico de resultados fue realizado mediante el programa GradPad Prism 6.01.

4.4. Estudio de liberación

Este ensayo se ha utilizado para observar las diferencias existentes en la liberación entre las distintas formulaciones de microcápsulas de Aflibercept a diferentes concentraciones, atendiendo a las cantidades liberadas en los periodos de tiempo establecidos y seleccionar la más adecuada para el tratamiento de la DMAE.

Para llevar a cabo este experimento, se elaboró un lote de cada una de las concentraciones de microcápsulas de Aflibercept (40 mg/mL, 25 mg/mL y 10 mg/mL).

Los estudios de liberación del Aflibercept a partir de las microcápsulas se desarrollaron en células de difusión de Franz verticales (30). Estas células están compuestas por dos piezas diferenciadas (superior e inferior), separadas mediante una membrana. En la parte superior o compartimento donador, se introduce una solución de 2 mL de humor vítreo artificial, que actúa a modo de medio biológico, en el cual se incorporaría, una cantidad resuspendida de 10 mg de una formulación de microcápsulas de Aflibercept, con ayuda de una jeringa desde la parte superior. En la pieza inferior o compartimento receptor, se coloca 6 mL de un medio líquido de tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*; PBS), que simula el fluido extracelular de los mamíferos, a pH 7,4.

Composición PBS (100 mL)		Composición Humor Vítreo artificial	
KCl	0,02 g	Disol. 0,1 % agar	0,01 g/ 10 mL agua (en caliente)
KH ₂ PO ₄	0,02 g	Disol. 0,5 % Ac.	0,05 g/ 10 mL agua
NaCl	0,8 g	Hialurónico	
Na ₂ HPO ₄ • H ₂ O	0,1148 g	Ázida sódica	1-2 gotas

Tabla 6: Composición de tampón fosfato salino (30)

Tabla 7: Composición de Humor Vítreo artificial (30)

Entre ambos compartimentos, superior e inferior, se insertó una membrana de filtración de acetato de celulosa de 0,45 µm de tamaño de poro y un diámetro externo de 13 mm, que presenta una absorción no específica muy baja, por tanto son muy adecuadas para la filtración de muestras biológicas, en especial proteínas. Se selló con grasa de silicona para hacer vacío, se precintó los bordes externos con parafilm y se sujetó con unas tenacillas.

Una vez montado el aparataje de las células de Franz, se introduce el sistema completo en el interior de una incubadora a temperatura constante de 37 °C y con una agitación orbital de 100 rpm.

La recogida de muestras se realizó a los tiempos 0.5 días (d), 1.5 d, 3.5 d, 6.5 d, 10.5 y 13.5 d. Para la recolección de las muestras, se utilizó una jeringa de 1 mL de aguja larga que se introdujo por el brazo de muestreo hacia el medio receptor, retirando 1 mL para un Eppendorf, y reemplazando con 1 mL de PBS el volumen retirado. El ensayo se realizó para las tres formulaciones de Aflibercept (40 mg/mL, 25 mg/mL y 10 mg/mL), por triplicado de cada formulación, en total, 9 muestras por cada tiempo de muestreo.

Para la determinación de la cantidad de Aflibercept liberado, se ha empleado el método de cuantificación espectrofotométrico descrito en el apartado anterior.

5. Resultados y Discusión

5.1. Caracterización de las microcápsulas

➤ Tamaño

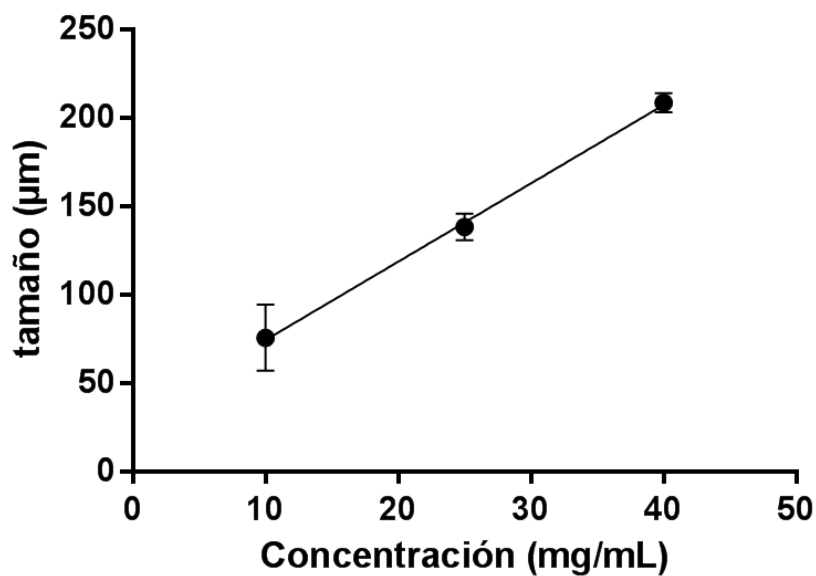


Figura 5: Dependencia del tamaño de partícula con respecto a la concentración de Aflibercept en el medio de preparación.

El tamaño medio de las microcápsulas elaboradas resultó estar en un intervalo de tamaño micrométrico entre las 50-250 micras, como se aprecia en la figura 5. Se realizó el análisis de la varianza de una sola vía, que nos indica que hay influencia significativa de la concentración del anticuerpo sobre el tamaño de la microcápsula obtenida ($p < 0.05$). El análisis de regresión realizado, sugiere una dependencia lineal del tamaño con la concentración de fármaco, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\text{Tamaño} = 30 + 4,429 * [\text{Aflibercept}]$$

$$R^2 = 0,9989$$

Ecuación 4: Ecuación de regresión lineal entre el tamaño de microcápsula y la concentración de Aflibercept.

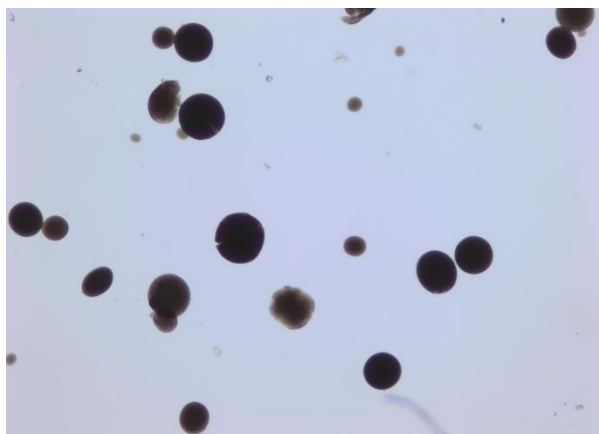


Figura 6: Microcápsulas de concentración 40 mg/mL de Aflibercept, observadas a microscopio óptico de objetivo(4X).



Figura 7: Microcápsulas de concentración 25 mg/mL de Aflibercept, observadas a microscopio óptico de objetivo(4X).

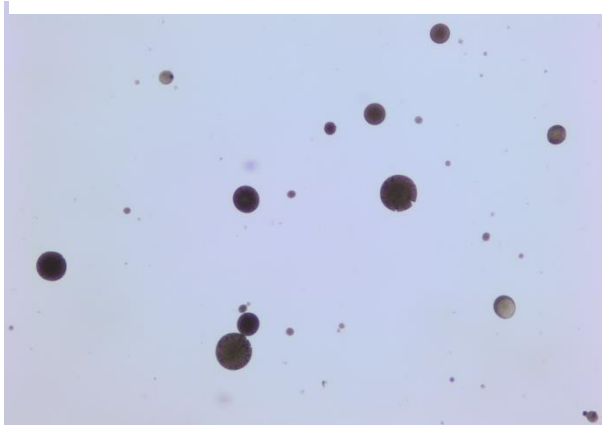


Figura 8: Microcápsulas de concentración 10 mg/mL de Aflibercept, observadas a microscopio óptico de objetivo (4X).

➤ Feret y Esfericidad

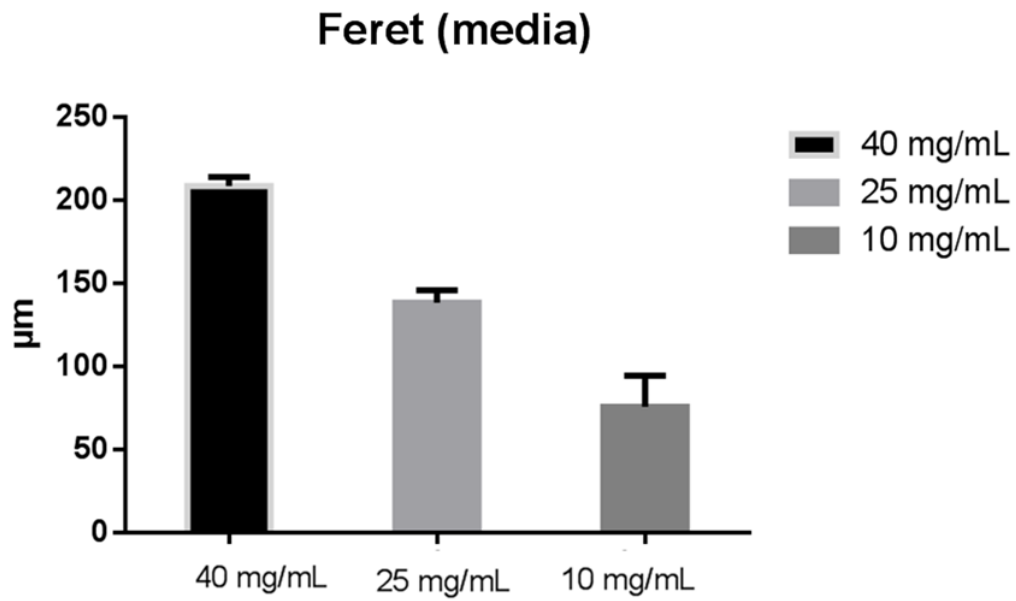


Figura 9: Distribución de diámetro de Feret medio en las formulaciones de micropartículas por concentraciones.

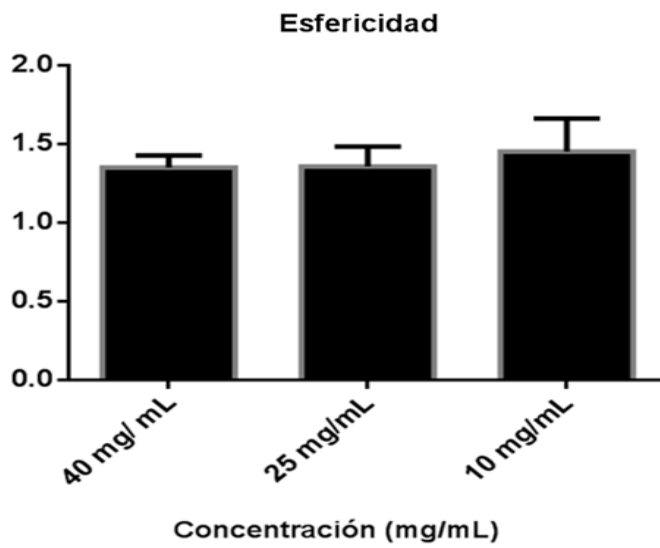


Figura10: Distribución de esfericidad en las formulaciones de micropartículas por concentraciones.

También se midió los parámetros de esfericidad (figura 10), que es determinada por la diferencia entre los radios mayor y menor del contorno medido en la microcápsulas, y el diámetro de Feret medio (figura 9), que se define como distancia entre los dos planos paralelos que restringen el objeto perpendicular a esa dirección.

En general, se observa una dependencia lineal del tamaño con la concentración de fármaco. Las formulaciones presentaron, por tanto, un tamaño medio adecuado para la vía intravítrea y no se produzca un aclaramiento por los vasos sanguíneos oculares de manera sencilla. Asimismo, con una buena esfericidad para una apropiada cubierta y su puesta en inyección.

5.2. Ensayo del contenido en Aflibercept en las microcápsulas

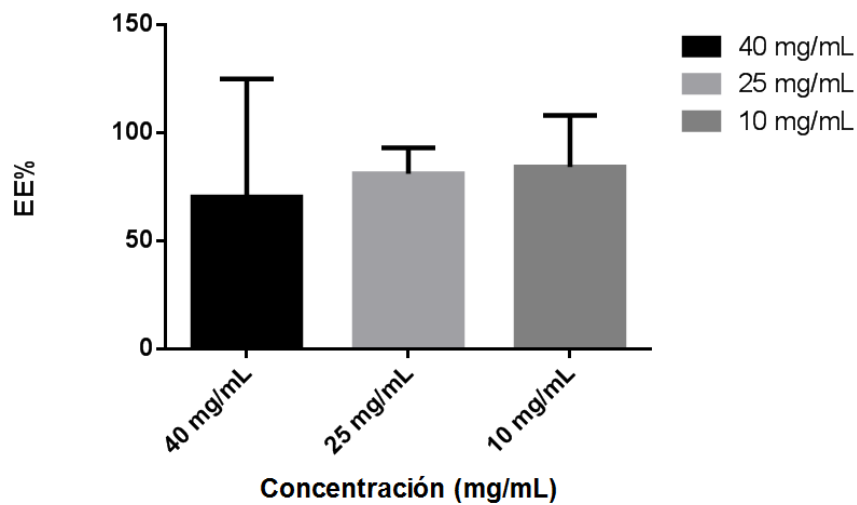


Figura 11: Representación de la Eficiencia de Encapsulación (EE%).

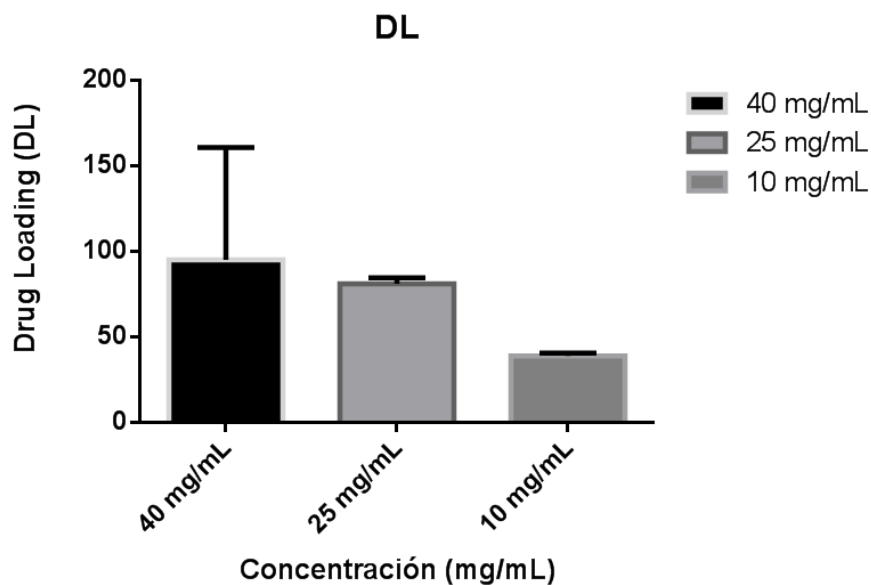


Figura 12: Representación de la Drug Loading (DL).

Se han realizado los cálculos mediante las ecuaciones descrita en el apartado de ensayo del contenido de microcápsulas. Los resultados nos indican que las microcápsulas tienen un alto porcentaje de encapsulación (figura 11), con valores comprendidos entre el 60-90 %. Además, el “Drug Loading” indica una cantidad de Aflibercept inmovilizado en las microcápsulas (figura 12), que se encuentra entre un 50-95 μg Aflibercept por cada mg de microcápsulas.

Por otro lado, se puede observar que el aumento de la cantidad de Aflibercept añadida a la hora de la elaboración de las distintas formulaciones, no dio lugar a un aumento significativo en la carga de las Microcápsulas. Sin embargo, si se observó una tendencia en la incorporación de mayor cantidad de anticuerpo con una mayor carga nominal en las formulaciones, aunque como se ha comentado, no de forma significativa.

5.3. Ensayo de liberación

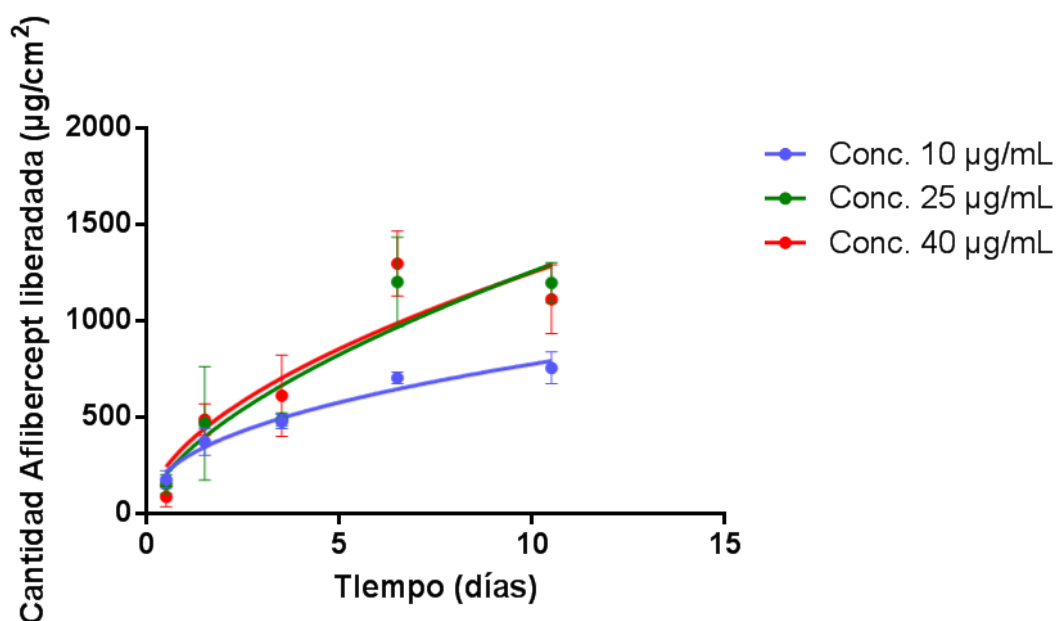


Figura 13: Perfiles de liberación de los micropartículas de Aflibercept obtenidos empleando células de Franz verticales.

En la figura 13 se muestran las cinéticas de liberación del Aflibercept a partir de las microcápsulas de PLGA. Los resultados de cantidad liberada frente al tiempo se ajustaron a la ecuación de Peppas (31), obteniéndose un valor del coeficiente $n = 0.4-0.52$, lo que sugiere que la liberación del anticuerpo se produce mediante la erosión del polímero y la difusión del fármaco. Se empleó un análisis estadístico (Anova de dos vías), incluyendo como factores el tiempo y la concentración de Aflibercept para comparar la liberación de las microcápsulas. El resultado indica que existen diferencias entre las diferentes formulaciones, siendo la liberación de la formulación preparada a partir de una carga de fármaco de 10 mg/mL más lenta que el resto, que sin embargo, se comportan de manera similar. La liberación de Aflibercept a partir de las microcápsulas finalizó a los 14 días de comienzo del ensayo, con la liberación total del fármaco.

El tamaño, la cantidad y la morfología de las microcápsulas en estos sistemas son parámetros de calidad importantes de un producto de microcápsulas de PLGA. Por ejemplo, si el tamaño de las microcápsulas disminuye, esto aumentará la relación superficie-área-volumen y, por lo tanto, intensificará la velocidad de difusión del fármaco fuera de las microcápsulas (32,33). Además, el líquido ingresará más fácilmente en las microcápsulas de menor tamaño debido a su área, que tiene una superficie más extensa, dando como resultado un efecto aumentado de liberación inicial, y una degradación hidrolítica más rápida de los polímeros de PLGA. Por otro lado, un aumento en el tamaño de microcápsulas de PLGA, da como resultado un descenso en el área de superficie de la micropartícula, lo que encaminará a una disminución en la velocidad de liberación del fármaco (34).

Examinando más detenidamente (figura 14) las microcápsulas utilizadas en el ensayo de liberación al microscopio óptico una vez finalizado, se observó la existencia de una razonable cantidad de microcápsulas de aspecto integro, no habiéndose producido aún la degradación completa de la envoltura de PLGA, pero si presentando roturas y deformaciones que pueden ser debido a la degradación del polímero y la liberación del fármaco.

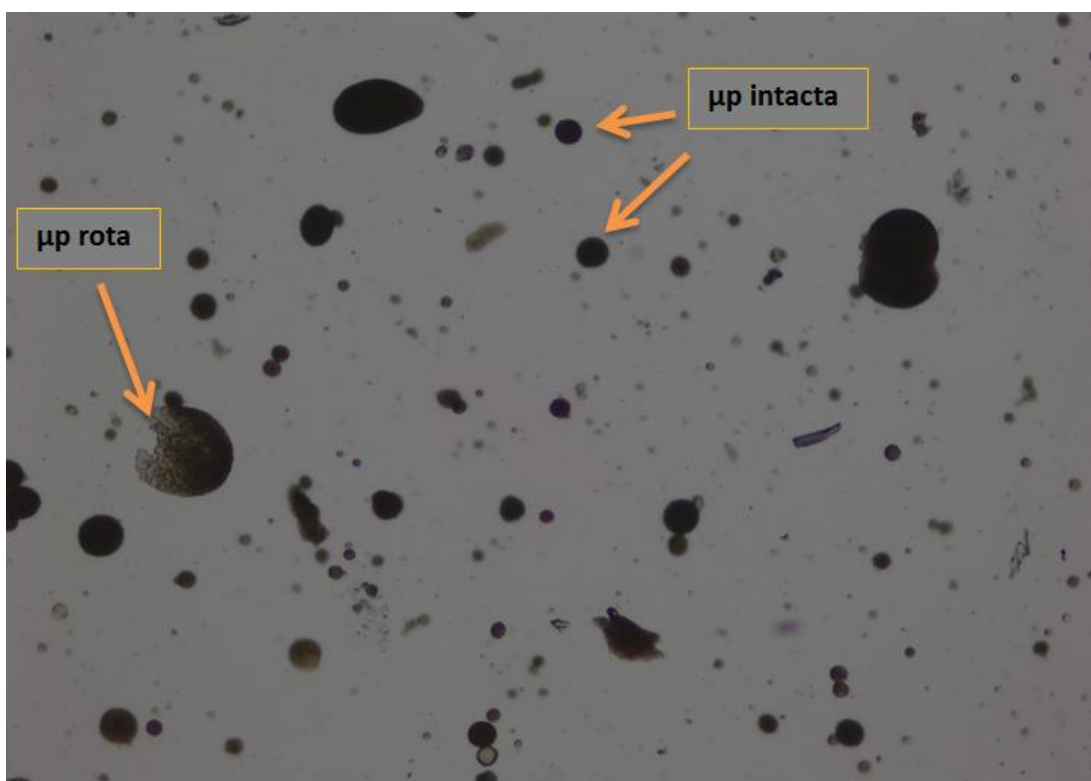


Figura 14: Examen microscópico de micropartículas en Humor Vítreo post-ensayo de liberación.

6. Conclusiones

En este proyecto se ha conseguido poner a punto un método para la obtención de microcápsulas de PLGA, conteniendo el anticuerpo monoclonal Aflibercept. Mediante el método empleado, se obtienen microcápsulas de un tamaño comprendido entre 50-250 μm , siendo este dependiente de la cantidad de Aflibercept utilizado en la síntesis.

Las microcápsulas presentaron un aspecto homogéneo en cada lote, una superficie suave y forma esférica.

La cantidad de Aflibercept inmovilizado depende, asimismo, de la concentración empleada durante la síntesis, observándose una carga mayor en las formulaciones elaboradas con 40 mg/mL.

Finalmente, los estudios de liberación indican que se produce la total liberación del anticuerpo a lo largo de dos semanas, mediante un mecanismo relacionado con la erosión del polímero y la difusión del Aflibercept.

Por último, para darle continuidad a este trabajo, sería conveniente la realización de nuevos estudios, para optimizar el método de preparación, y para garantizar la estabilidad del anticuerpo monoclonal Aflibercept durante su manipulación.

7. Bibliografía

1. Vasant V. Ranade, John B. Cannon. Nanoscience and Nanotechnology for Drug Delivery, En: Manfred A. Hollinger(ed.) *Drug delivery systems*. 3rd Edition. CRC Press; 2011. p.451-488
2. Sadashiv Alai, Wen Jen Lin, Shailaja Suresh Pingale. Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. *Journal of food and drug analysis* (2015); 23: 351-358.
3. Jorg Kreute. Ointments and creams as colloidal drug delivery systems, En: Jorg Kreuter(ed.) *colloidal drug delivery systems*. vol. 66. CRC Press; 1994. p.1-28
4. Jin-Seok Kim. Liposomal drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical investigation* (2016); 46: 387-392.
5. Majeti N. V. Ravi Kumar. Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices. *Journal of Pharmaceutical Science* (2000); 3(2): 234-258.
6. Sunil S. Iyer, William H. Barr, H. Thomas Karnes. Profiling In Vitro Drug Release from Subcutaneous Implants: A Review of Current Status and Potencial Implications on Drug Product Development. *Wiley InterScience* (2006); 27: 157-170.
7. Christian Wischke, Steven P. Schwendeman. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* (2008); 364: 298-327.
8. Patrick B. O'Donnell, James W. McGinity. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advance Drug Delivery Reviews* (1997); 28: 25-42.
9. Rajeev A. Jain. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* (2000); 21:2475-2490.

10. Ranjith Kumar Kankala, Yu Shrike Zhang, Shi-Bin Wang, Chia-Hung Lee, Ai-Zheng Chen. Supercritical Fluid Technology: An Emphasis on Drug Delivery and Related Biomedical Applications. *Advanced Healthcare Materials* (2017); 6: 1700433
11. Bhavesh B. Patel, Jayvadan K. Patel, Subhashis Chakraborty, Dali Shukla. Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement. *Saudi pharmaceutical journal* (2015); 23: 352-365.
12. Maedeh Zamani, Molamma P. Prabhakaran, Eng San Thian, Seeram Ramakrishna. Protein encapsulated core-shell structured particles prepared by coaxial electrospraying: Investigation on material and processing variables. *International Journal of Pharmaceutics* (2014); 473: 134-143.
13. Felicity Y. Han, Kristofer J. Thurecht, Andrew K. Whittaker, Maree T. Smith. Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading. *Frontiers in Pharmacology* (2016); 7:185.
14. Laura Zorzetto, Paola Brambilla, Elena Marcello, Nora Bloise, Manuela De Gregori, Lorenzo Cobianchi, Andrea Peloso, Massimo Allegri, Livia Visai, Paola Petrini. From micro- to nanostructured implantable device for local anesthetic delivery. *International Journal of Nanomedicine* (2016); 11: 26955-2709.
15. Malavia,N.,Reddy,L.,Szinai,I.,Betty,N.,Pi,J.,Kanagaraj,J., etal. (2015).Biodegradable sustained-release drug delivery systems fabricated using a dissolvable hydrogel template technology for the treatment of ocular indications. *IOVS* 56, 1296.
16. Himanshu K. Solanki, Dipak D. Pawar, Dushyant A. Shah, Vipul D. Prajapati, Girish K. Jani, Akil M. Mulla, and Prachi M. Thakar. Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent. *BioMed Research International* (2013); 2013: 620719 p. 1-22.

17. Jaspreet Singh Kochhar, Shui Zou, Sui Yung Chan, Lifeng Kang. Protein encapsulation in polymeric microneedles by photolithography. *International Journal of Nanomedicine* (2012); 7: 3143-3154.
18. A.M.M. Costa, J.C. Nunes, B.N.B Lima, C. Pedrosa, V. Calado, A.G. Torres, A.P.T.R. Pierucci. Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein. *Food Chemistry* (2015); 168: 157–166.
19. Waseem M Al-Zamil, Sanaa A Yassin. Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clinical Interventions in Aging* (2017); 12: 1313-1330.
20. Alfredo García-Layana, Francisco Cabrera-Lopez, José García-Arumí, Lluís Arias-Barquet, José M Ruiz-Moreno. Early and intermediate age-related macular degeneration: update and clinical review. *Clinical Interventions in Aging* (2017); 12: 1579-1587.
21. Fundación Retina España: Asociación Retina Madrid (ARM). Presente y futuro en los tratamientos para la DMAE seca.). [Online]. Disponible en: <http://www.retina.es/retina/novedades/noticias-cientificas/1229-presente-y-futuro-en-los-tratamientos-para-la-dmae-seca> [Consultada en 2/07/2018]
22. Katarzyna Nowomiejska, Agnieszka Oleszczuk, Agnieszka Brzozowska, Andrzej Grzybowski, Katarzyna Ksiazek, Ryszard Maciejewski, Piotr Ksiazek, Anselm Juenemann, Robert Rejda. M-charts as a tool for quantifying metamorphopsia in age-related macular degeneration treated with the bevacizumab injections. *BioMed Central Ophthalmology* (2013); 13:13
23. The Angiogenesis Foundation: The science of Age-related Macular Degeneration (AMD). [Online]. Disponible en: http://www.scienceofamd.org/wp-content/uploads/2012/04/La_Ciencia_de_la_DMAE_Prospecto_del_Paciente.pdf [Consultada en 2/07/2018]

24. European Medicines Agency (EMA): European public assessment report (EPAR) for Eylea (Aflibercept). [Online]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002392/WC500135815.pdf [Consultada en 2/07/2018]
25. Eva m. del Amo, Anna-Kaisa Rimpelä, Emma Heikkinen, Otto K. Kari, Eva Ramsay, Tatu Lajunen, Mechthild Schmitt, Laura Pelkonen, Madhushree Battacharya, Dominique Richardson, Astrid Subrizi, Tiina Turunen, Mika Reinisalo, Jaakko Itkonen, Elisa Toropainen, Marco Casteleijn, Heidi Kidron, Maxim Antopolsky, Kati-Sisko Vellonen, Marika Ruponen, Arto Urtti. Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery. *Progress in Retinal and Eye Research* (2017); 134-185.
26. del Amo, E.M., Ocular and Systemic Pharmacokinetic Models for Drug Discovery and Development. Doctoral dissertation. University of Helsinki; 2015.
27. Sulabh Patel, Gerd Müller, Jan Olaf Stracke, Ulrike Altenburger, Hanns-Christian Mahler, Dhananjay Jere. Evaluation of protein drug stability with vitreous humor in a novel ex-vivo intraocular model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic* (2015); 95: 407-417.
28. British Pharmacopoeia: New General Monograph of Intraocular injections on unlicensed medicines. Ed.2019
29. Bartlett JD, Jaanus SD. *Clinical Ocular Pharmacology*. Elsevier Health Sciences; 2008. 816
30. C. Martín-Sabroso, A.I. Fraguas-Sánchez, J. Aparicio-Blanco, M.F. Cano-Abad, A.I. Torres-Suárez. Critical attributes of formulation and of elaboration process of PLGA-protein microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* (2015); 480:27–36
31. Javier Aragón Fernández, Ramón González Santos, Gastón Fuentes Estévez. Cinética de liberación de cefalexina desde un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO₃. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 2009;75 (3): 345-363.

32. Miranda M.C. van Beers, Cees Slooten, Jelte Meulenaar, Ahmad S. Sediq, Ruud Verrijk, Wim Jiskoot. Micro-Flow Imaging as a quantitative tool to assess size and agglomeration of PLGA microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2017); 117: 91–104.
33. Kohane, D.S. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnology and Bioengineering*.(2007); 96 (2):203-209.
34. M.B. DeYoung, L. MacConell, V. Sarin, M. Trautmann, P. Herbert. Encapsulation of exenatide in poly-(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres produced an investigational long-acting once-weekly formulation for type 2 diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 13 (2011). 1145-1154.

8.Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más sincera gratitud a todas las personas que han contribuido a la realización de este proyecto

Primeramente, a mi tutora Asteria, por toda la ayuda recibida y darme la oportunidad de haber trabajado con ella.

A Fran, por cada gramo de tiempo y esfuerzo empleado en mí, con todo el entusiasmo e impulso que ha depositado para que todo fuera posible.

A todas las personas del grupo de investigación de Fran (Andrea L., Víctor, Xurxo, Victoria, Iria, Andrea C., Rubén...) por su constante ayuda, que me ha permitido aprender, siendo una guirnalda de luz en mi paso por el laboratorio.

A mi familia, por su apoyo incondicional durante todo el trayecto. A mi madre, por su incansable apoyo y cariño desde tiempos inmemoriales. A mi hermano, por su templanza y objetivismo, ayudando a superar mis objetivos. A mi abuela, por su sabiduría y amor por su familia.

A Carmen, por cada mililitro de sensatez, pasión e inteligencia invertido en mí, en cada duda del camino, apoyándome.

A mis amigos, por su apoyo y amistad, tan necesarios para sobrellevarlo todo.

Gracias